

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**  
**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Η. ΚΟΥΡΟΥΜΑΛΗΣ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΟΚΤΡΕΟΤΙΔΗΣ ΩΣ ΑΝΤΙΪΝΩΤΙΚΟΥ**  
**ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΑ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΒΟΥΜΒΟΥΡΑΚΗ ΑΡΓΥΡΩ**  
**ΙΑΤΡΟΣ - ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΟΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2010**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Κ. Παπαδάκης**

**Καθηγήτρια Κ. Θερμού**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Γ. Κολιός**

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Κ. Παπαδάκης**

**Καθηγήτρια Κ. Θερμού**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Γ. Κολιός**

**Καθηγητής Η. Κουρούμαλης**

**Καθηγήτρια Ε. Παπαδάκη**

**Αναπληρωτής καθηγητής Ι. Μουζάς**

**Επίκουρος Καθηγήτρια Μ. Τζαρδή**

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ

- 1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
- 1.2. ΗΠΑΤΙΚΑ ΑΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ
- 1.3. ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΕΜΠΛΕΚΟΜΕΝΕΣ ΣΤΗΝ ΗΠΑΤΙΚΗ ΙΝΟΓΕΝΕΣΗ
- 1.4. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ TOLL-LIKE (TLRS)
- 1.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 2. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΕΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ (ΜΜΡΣ) ΚΑΙ ΙΣΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥΣ (ΤΙΜΡΣ)

- 2.1. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΕΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ (ΜΜΡΣ), ΙΣΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥΣ (ΤΙΜΡΣ) ΚΑΙ ΗΠΑΤΙΚΗ ΙΝΩΣΗ
- 2.2. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΕΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ (ΜΜΡΣ)
- 2.3. ΙΣΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ (ΤΙΜΡΣ) ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ (ΜΜΡΣ)
- 2.4. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΗΠΑΤΟΣ
  - 2.4.1. ΠΡΟΓΕΛΑΤΙΝΑΣΗ- Α
  - 2.4.2. ΠΡΟΓΕΛΑΤΙΝΑΣΗ-Β
  - 2.4.3. ΠΡΟΣΤΡΩΜΕΛΥΣΙΝΗ 1
- 2.5. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΙΝΩΤΙΚΟΥ ΗΠΑΤΟΣ
  - 2.5.1. Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΠΡΟΟΔΟ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ
  - 2.5.2. Η ΥΠΟΣΤΡΟΦΗ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ
- 2.6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 3. ΑΚΤΙΒΙΝΗ

- 3.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
- 3.2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΑΚΤΙΒΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ
- 3.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΚΤΙΒΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΗΠΑΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΙΝΩΣΗ
- 3.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΚΤΙΒΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΗΠΑΤΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ
- 3.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΚΤΙΒΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ
- 3.6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 4. ΛΕΠΤΙΝΗ

### 5. ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ

### 6. TGF-Β ΚΑΙ ΗΠΑΤΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

- 6.1. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ TGF-B : ΣΥΓΓΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΡΟΛΟΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
- 6.2. ΠΕΡΙΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ TGF-B
- 6.3. TGF-B ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ
- 6.4. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ TGF-B1
- 6.5. ΗΠΑΤΙΚΗ ΙΝΩΣΗ
- 6.6. TGF-B ΚΑΙ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΤΩΝ ΗΠΑΤΙΚΩΝ ΑΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.
- 6.7. TGF-B ΚΑΙ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΣΤΟ ΗΠΑΡ
- 6.8. ΑΠΟΠΤΩΣΗ
- 6.9. TGF-B ΚΑΙ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ
- 6.10. TGF-B3
- 6.10.1. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΡΟΛΟΙ
- 6.10.2. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ
- 6.10.3. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ
- 6.11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## **7. ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΡΟΥ ΚΑΙ ΗΠΑΤΙΚΗ ΙΝΩΣΗ**

- 7.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
- 7.2. I ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΔΕΙΚΤΩΝ ΙΝΩΣΗΣ (ΑΜΕΣΟΙ)
- 7.3. II ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΔΕΙΚΤΩΝ ΙΝΩΣΗΣ (ΕΜΜΕΣΟΙ)
- 7.4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## **8. ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΟΚΤΡΕΟΤΙΔΗ**

- 8.1. ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ
- 8.1.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ
- 8.1.2. ΔΡΑΣΗ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ
- 8.1.3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ
- 8.2. ΟΚΤΡΕΟΤΙΔΗ
- 8.2.1. ΔΟΜΗ
- 8.2.2. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ
- 8.2.3. ΔΡΑΣΗ
- 8.3. ΟΚΤΡΕΟΤΙΔΗ ΚΑΙ ΗΠΑΤΙΚΗ ΙΝΩΣΗ
- 8.4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **1. ΥΛΙΚΑ**

### **2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

### **3. ΜΕΘΟΔΟΙ**

- 3.1. ΑΙΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
- 3.2. ELISA
- 3.3. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ
- 3.4. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΤΟΜΕΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ
- 3.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΗΠΑΤΟΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ KUPFFER ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ

- 3.6. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ (PBL)
- 3.7. PCR ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ (RT-PCR)
- 3.8. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ
- 3.9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

#### **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

##### **4.1. ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ, ΛΕΠΤΙΝΗ, ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ- IV, ΛΑΜΙΝΙΝΗ**

- 4.1.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
  - 4.1.1.1. ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΡΡΟΥ
  - 4.1.1.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ
- 4.1.2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ
- 4.1.3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

##### **4.2. ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ ΤGFβ**

- 4.2.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
  - 4.2.1.1. ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΡΡΟΥ
  - 4.2.1.2. ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ
  - 4.2.1.3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ FOXP3 ΣΤΟΝ ΗΠΙΑΤΙΚΟ ΙΣΤΟ ΚΑΙ ΣΤΑ CD3+VE ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ
  - 4.2.1.4. ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΩΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΙΝΩΣΕΩΣ ΣΤΙΣ ΧΡΟΝΙΕΣ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΕΣ.
- 4.2.2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ
- 4.2.3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

##### **4.3. ΑΚΤΙΒΙΝΗ**

- 4.3.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
  - 4.3.1.1. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΚΤΙΒΙΝΗΣ ΟΡΡΟΥ
  - 4.3.1.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ
  - 4.3.1.3. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΞΥ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ (ΙΟΓΕΝΟΥΣ ΚΑΙ ΠΧΚ)
  - 4.3.1.4. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΞΥ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΣΤΕΑΤΩΣΗΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ ΜΕ ΙΝΩΣΗ
  - 4.3.1.5. Η ΑΚΤΙΒΙΝΗ ΤΩΝ ΚΟΛΠΟΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ
- 4.3.2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

##### **4.3.3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

##### **4.4. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΕΣ (MMPS) ΚΑΙ ΙΣΤΙΚΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ**

##### **ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΩΝ (TIMP1) ΤΟΥ ΟΡΡΟΥ**

- 4.4.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
  - 4.4.1.1. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΕΣ
  - 4.4.1.2. TIMP1

#### **5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ & ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

#### **6. SUMMARY & CONCLUSIONS**

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# 1. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ

## 1.1. Εισαγωγή

Η ηπατική ίνωση αποτελεί την επουλωτική αντίδραση του ήπατος στην παρατεταμένη ή επαναλαμβανόμενη δράση διαφόρων βλαπτικών παραγόντων [1]. Πρόκειται για ιστολογική διάγνωση η οποία χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση αυξημένης ποσότητας, διαφορετικής σύνθεσης και τοπογραφικής αναλογίας εξωκυττάριας ουσίας [2,3] ενώ επίσης παρατηρείται και αλλαγή της δομής κάποιων μορίων της [4].

Τα ηπατικά κολποειδή προερχόμενα από κλάδους της πυλαίας φλέβας και της ηπατικής αρτηρίας των πυλαίων διαστημάτων αποτελούν την μικροαγγειακή μονάδα του ήπατος την οποία συναπαρτίζουν το διάτρητο ενδοθήλιο, τα κύτταρα Kupffer (KC), τα φυσικά κύτταρα φονείς (NK), παλαιότερα ονομαζόμενα κύτταρα Pit, τα αστεροειδή κύτταρα (HSCs) ή κύτταρα Ito, ο χώρος του Disse και τα εγγύς ηπατοκύτταρα.

Στο χώρο του Disse στο φυσιολογικό ήπαρ εναποτίθεται μικρή ποσότητα εξωκυττάριας ουσίας με σύσταση αραιής βασικής μεμβράνης (membrane like matrix) απαραίτητη για τη διακίνηση των ουσιών και τη διαφοροποίηση των κυτταρικών πληθυσμών του ηπατικού μικροπεριβάλλοντος.

Μετά από μία οξεία ηπατική βλάβη, τα παρεγχυματικά κύτταρα αναγεννώνται και αντικαθιστούν τα νεκρωτικά ή αποπεπτόκωτα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή συνδυάζεται με φλεγμονώδη αντίδραση και περιορισμένη εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας.

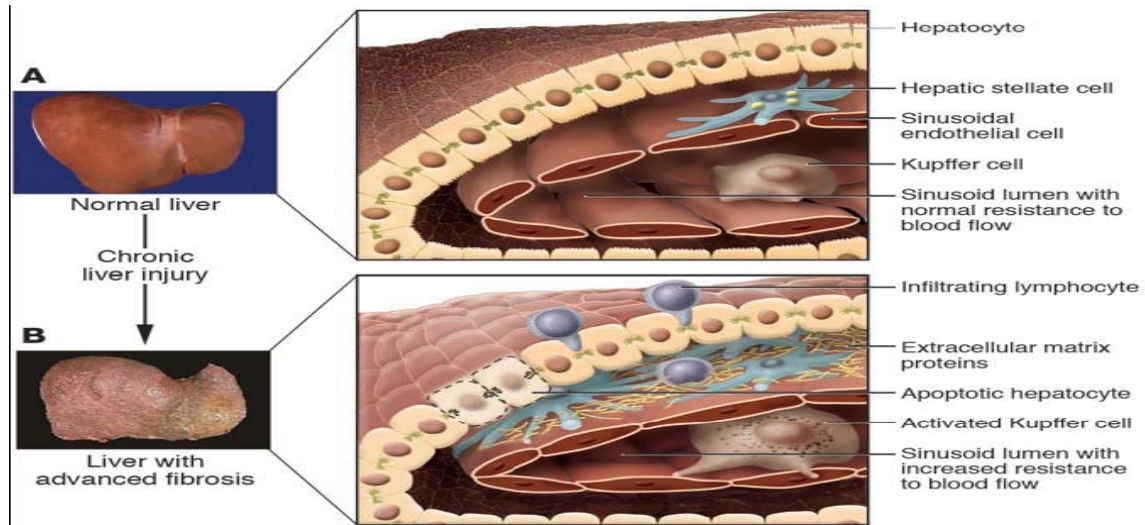
Εάν η ηπατική βλάβη επιμείνει, τελικώς η ηπατική αναγέννηση μειονεκτεί και τα ηπατοκύτταρα αντικαθίστανται από άφθονη εξωκυττάρια ουσία, πλούσια σε ινώδες κολλαγόνο [2] [\[Εικόνα1\]](#).

Η κατανομή της ινώδους ουσίας εξαρτάται από την φύση της ηπατικής βλάβης.

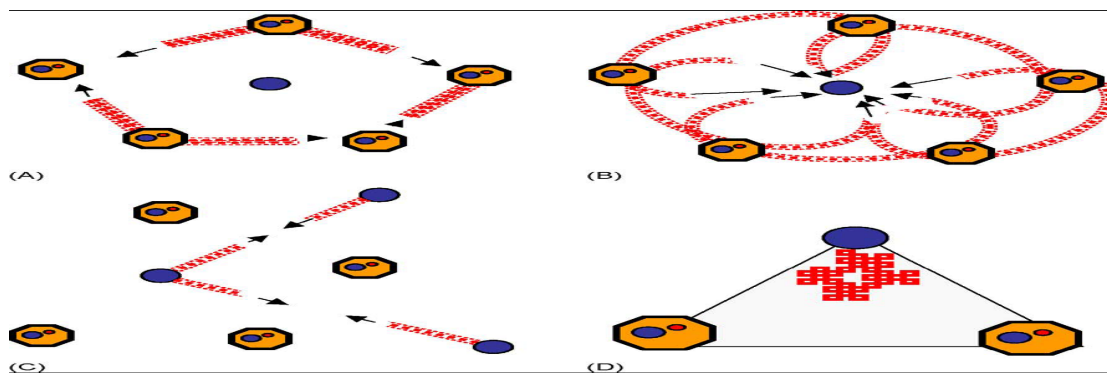
Στις ιογενείς και παρασιτικές λοιμώξεις, στα χολοστατικά σύνδρομα και στην αυτοάνοση ηπατίτιδα η ινώδης ουσία εναποτίθεται αρχικά γύρω από τα πυλαία διαστήματα ενώ στην αλκοολική ηπατική νόσο, στην μη-αλκοολική

στεατοηπατίτιδα, στην απόφραξη των ηπατικών φλεβών και σε περιπτώσεις φαρμακευτικής τοξικότητας η εναπόθεση παρατηρείται αρχικά περικεντρικά και περικυτταρικά [2].

Με την πρόοδο της νόσου παρατηρείται γεφυροποιός ίνωση και τελικά κίρρωση [Εικόνα 2].



**Εικόνα 1.** Αλλαγές στην ηπατική αρχιτεκτονική (A) σχετιζόμενες με την πρόοδο της ηπατικής ίνωσης (B). *J. Clin. Invest.* 115:209–218 (2005).



**Εικόνα 2.** Διαφορετικά πρότυπα ίνωσης. (A) Χολικός τύπος ίνωσης; (B) Γεφυροποιός ίνωση τυπική της HCV και HBV χρόνιας ηπατίτιδας; (C) Κεντρολοβιακή ίνωση με “ανάστροφη λοβιοποίηση”; (D) Περικυτταρική ίνωση. *Dig Liver Dis.* 2004 ; 36 : 231–42

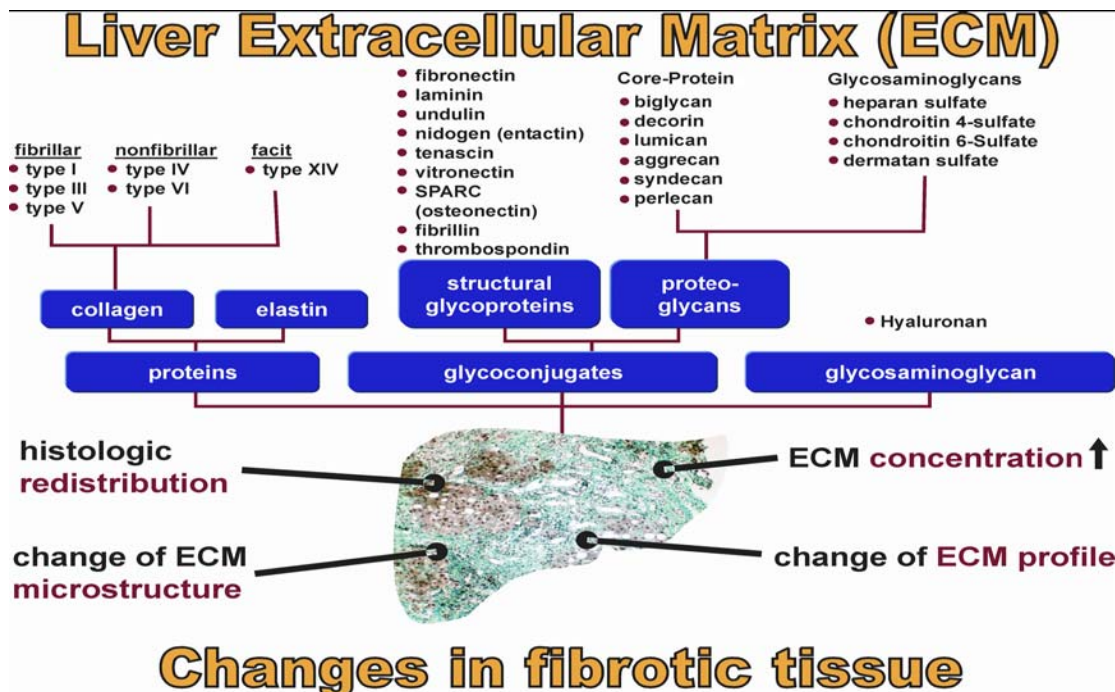


Η αυξημένη εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας στο χώρο του Disse, οδηγεί στην τριχοειδοποίηση των κολποειδών γεγονός που εμποδίζει την διαδικασία ανταλλαγής μεταξύ ηπατοκυττάρων και αίματος και επιπλέον στη στένωση του αυλού των κολποειδών με αποτέλεσμα την αυξημένη αιμοδυναμική παρεγχυματική αντίσταση (πυλαία υπέρταση) [5,6].

Η συσσώρευση της εξωκυττάριας ουσίας είναι αποτέλεσμα της αυξημένης σύνθεσης και της μειωμένης αποδόμησης της.

Η μειωμένη δράση των μεταλλοπρωτεασών, ενζύμων που επάγουν την αποδόμηση, μπορεί να οφείλεται στην μείωση της παραγωγής τους, στην μειωμένη δραστικότητα τους ή στην υπερέκφραση των ιστικών αναστολέων τους, TIMPs [7].

Σε προχωρημένα στάδια ίνωσης το ήπαρ περιέχει περίπου 6 φορές περισσότερο εξωκυττάρια υπόστρωμα, το οποίο περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες κολλαγόνο ( I, III και IV ) και ελαστίνη, δομικές γλυκοπρωτεΐνες όπως ινονεκτίνη, φιμπριλίνη, αντουλίνη, λαμινίνη, εντακτίνη και θρομβοσπονδίνη, πρωτεογλυκάνες και υαλουρονικά παράγωγα [Εικόνα 3 ].



**Εικόνα 3.** Τα βασικά συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας (συνδετικού ιστού) του ήπατος και οι 4 βασικές αλλαγές στην εξωκυττάρια ουσία του ινωτικού ήπατος.

*Comp Hepatol. 2007 Jul 30; 6:7*

## **1.2. Ηπατικά αστεροειδή κύτταρα**

Σε περίπτωση ηπατικής βλάβης, βασικοί τροποποιητές της εξωκυττάριας ουσίας είναι τα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος (HSCs), παλαιότερα ονομαζόμενα κύτταρα Ito, αποθηκευτικά κύτταρα βιταμίνης A ή περικολποειδικά λιποκύτταρα [8].

Οι πρωτοπόρες εργασίες των Leeuw et al. [9] και των Friedman et al. [10,11] σε απομονωμένα ζωικά και ανθρώπινα HSCs, αντίστοιχα, κατέστησαν δυνατές τις συστηματικές, *in vivo*, μελέτες αυτού του τύπου των μη παρεγχυματικών κυττάρων [12].

Τα HSCs βρίσκονται στο χώρο του Disse και είναι παρακείμενα των παρεγχυματικών κυττάρων. Περισσότερο συχνά παρατηρούνται εγγύτερα των κεντρικών φλεβών. Αντιστοιχούν στο 15% των συνολικών κυττάρων του ήπατος και πιθανώς προέρχονται από την νευρική ακρολοφία [13]. Η αντιστοιχία τους με τα ηπατοκύτταρα είναι 3,6-6 κύτταρα/100 παρεγχυματικά κύτταρα.

Στο φυσιολογικό ήπαρ βασική τους λειτουργία είναι η ομοιόσταση των ρετινοειδών και παρά τον κατά πολύ μικρότερο κυτταρικό τους όγκο αποθηκεύουν περίπου 50 φορές περισσότερη ρετινόλη (30 nmol/106 κύτταρα) απ' ό τι τα ηπατοκύτταρα (0,5-0,8 nmol/106 κύτταρα).

Έχουν κυτταροπλασματικές προεξοχές, που συσπώνται, σε στενή επαφή με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και με τον τρόπο αυτό μπορούν να ελέγχουν την ενδοηπατική ροή του αίματος.

Εξ' αιτίας της προνομιακής τους θέσης δηλ. της ταυτόχρονης επαφής τους με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα ηπατοκύτταρα, φαίνεται να έχουν βασικό ρόλο στην παρακρινή ρύθμιση κάποιων ηπατικών λειτουργιών [14].

Επίσης, συμμετέχουν στη διατήρηση της εξωκυττάριας ουσίας και του χώρου του Disse [15]. Ταυτόχρονα παίρνουν μέρος στη σύνθεση ερυθροποιητίνης, στην παραγωγή συστατικών του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης [16,17] ενώ πιθανώς δρουν και ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) στο ήπαρ.

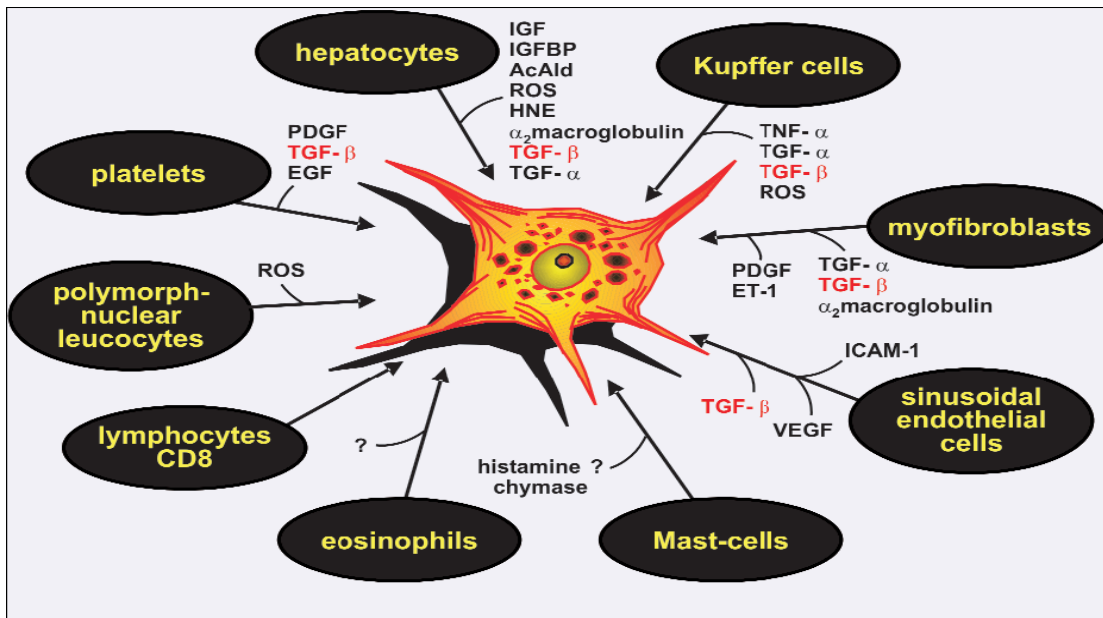
Τα HSCs αποκτούν ιδιαίτερος σημαντική λειτουργία σε περίπτωση ηπατικής βλάβης οπότε αλλάζουν μορφολογία και φυσιολογία μέσω της πορείας η οποία είναι γνωστή ως ενεργοποίηση [18].

Η ενεργοποίηση των HSCs *in situ* αποτελεί ιστικό φαινόμενο δηλ. πραγματοποιείται μέσω μεσολαβητών με παρακρινή δράση, οι οποίοι ελευθερώνονται από κύτταρα του ήπατος (ηπατοκύτταρα, κύτταρα του Kupffer και

ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών) αλλά και από κύτταρα που εισβάλλουν στο ήπαρ όπως τα αιμοπετάλια, τα λεμφοκύτταρα και διάφορες υποκατηγορίες λευκών αιμοσφαιρίων.

Επίσης, στην ενεργοποίηση των HSCs εμπλέκονται και μη-πεπτιδικοί μεσολαβητές όπως είναι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) [19-21], η ακεταλδεΐδη [22,23] και διάφοροι λιπιδικοί μεσολαβητές [24].

Άρα και η διαδικασία της ενεργοποίησης προχωρήσει μέσω του ενδιάμεσου τύπου κυττάρων (μεταβατικά κύτταρα), οι πλήρως ενεργοποιημένοι μυοϊνοβλάστες (MFB) εκκρίνουν μεσολαβητές με αυτοκρινή δράση ενώ παράλληλα εκφράζουν και τους αντίστοιχους υποδοχείς τους [25][**Εικόνα 4**].



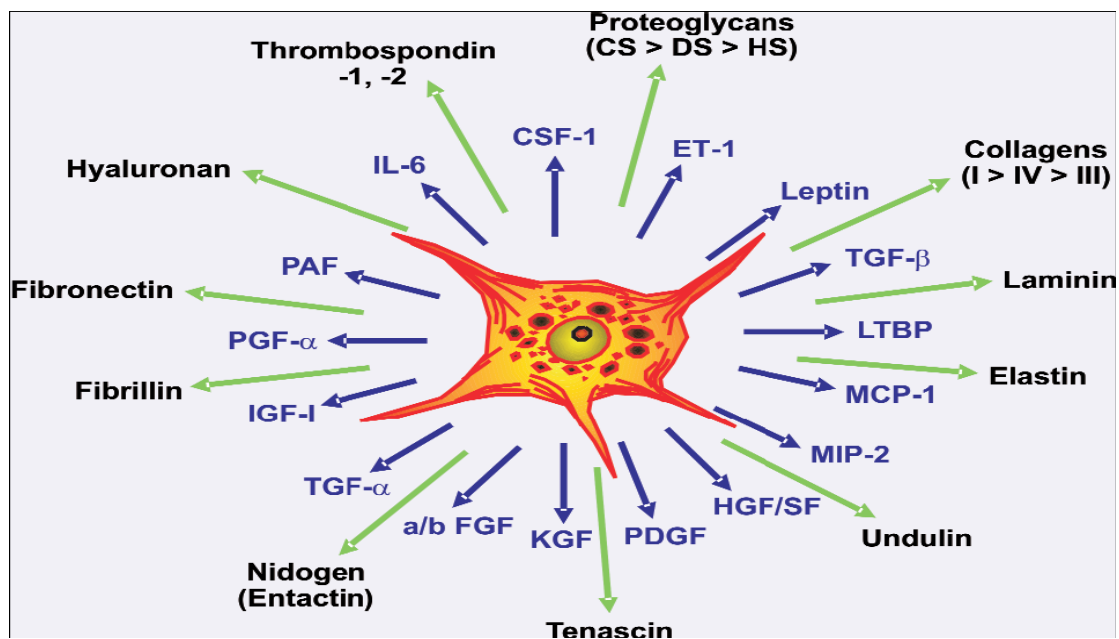
**Εικόνα 4.** Σύνοψη της αλληλεπίδρασης των κυττάρων που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση και μετατροπή των HSC σε MFB και κύριοι εμπλεκόμενοι πεπτιδικοί και μη-πεπτιδικοί μεσολαβητές. *J Cell Mol Med. 2006 Jan-Mar; 10 (1): 76-99*

Οι εργασίες των τελευταίων δεκαετιών ανέδειξαν ότι τα ενεργοποιημένα HSCs παρουσιάζουν έναν υπερβολικά δυναμικό φαινότυπο με βασική λειτουργία την ανάπτυξη της ίνωσης in vivo και in vitro [26,13].

Στο φυσιολογικό ήπαρ ο κυτταρικός αυτός υποπληθυσμός χαρακτηρίζεται από άφθονες σταγόνες λιπιδίων, χαμηλή δυνατότητα πολλαπλασιασμού και χαμηλή συνθετική ικανότητα.

Στον ενεργοποιημένο φαινότυπο δηλ. στον μυοϊνοβλάστη η ποσότητα των λιπιδίων είναι μειωμένη ενώ ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός καθώς και η σύνθεση των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας παρουσιάζουν αύξηση. Επιπλέον, αποκτά συστατικότητα ως απάντηση στην επίδραση διαφόρων παραγόντων όπως της ενδοθηλίνης και του NO [27,28].

Ο νέος φαινότυπος του μυοϊνοβλάστη (MFB) που προκύπτει εκφράζει και εκκρίνει μόρια της εξωκυττάριας ουσίας, κυτταροκίνες, χημειοκίνες [Εικόνα 5], μεταλλοπρωτεάσες (MMPs) καθώς και τους αντίστοιχους ιστικούς αναστολείς τους (TIMPs) [29,30] .



**Εικόνα 5.** Μόρια της εξωκυττάριας ουσίας και κυτταροκίνες/χημειοκίνες εκκρινόμενες από τα HSC και MFB. *J Cell Mol Med 2006 Jan-Mar;10 (1):76-99.*

Με τον τρόπο αυτό τα ενεργοποιημένα HSCs συμμετέχουν παθοφυσιολογικά και στην διαδικασία της ινογένεσης αλλά και στην διαδικασία της ινόλυσης δηλ. της ενζυματικής διάλυσης της εξωκυττάριας ουσίας και κατά συνέπεια στον ιστικό ανασχηματισμό.

Μεταξύ ενός μεγάλου αριθμού προϊονογενετικών μεσολαβητών, βάση λειτουργικής ιεραρχίας, ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγων-β (TGF-β) [26] και ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγων (PDGF) [31,32] αναδεικνύονται ως οι περισσότερο δραστικοί.

Τα HSCs και/ή MFB εκφράζουν σημαντική δομική και λειτουργική ετερογένεια [33,34], γεγονός το οποίο οδηγεί στην παρατήρηση ότι ένα σημαντικό ποσοστό (>20%) μπορεί να προέρχεται από ινοκύτταρα ή παρόμοιου τύπου κύτταρα του μυελού των οστών, που καταφθάνουν στο σημείο της ιστικής βλάβης μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας [35,36]. Εκτός από τους HSCs/MFB, πυλαίοι ινοβλάστες μπορεί να συμμετέχουν στην ινογένεση.

Η συμμετοχή τους στην ηπατική ινογένεση εξαρτάται από τη φύση της ηπατικής βλάβης. Ενώ τα HSCs είναι τα κύρια ινογενετικά κύτταρα περικεντρικά, οι πυλαίοι ινοβλάστες υπερισχύουν όταν η ηπατική βλάβη επισυμβαίνει γύρω από τα πυλαία διαστήματα.

Τα HSCs εκφράζουν σημαντικό αριθμό νευροενδοκρινικών δεικτών (π.χ reelin, nestin, νευροτροφίνη, συναπτοφυσίνη, Glial Fibrillary Acid Protein) ενώ φέρουν και υποδοχείς νευροδιαβιβαστών [37,38,39].

Τα εν ηρεμία HSCs εκφράζουν δείκτες οι οποίοι είναι χαρακτηριστικοί των λιποκυττάρων (PPARγ, Cellular Retinol Binding Protein-1 και λεπτίνη) ενώ τα ενεργοποιημένα HSCs εκφράζουν δείκτες χαρακτηριστικούς μυοκυττάρων (α-Smooth Muscle Actin, c-myb και myocyte enhancer factor-2).

Συμπερασματικά, μία σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών τύπων ηπατικών κυττάρων παρατηρείται στη διαδικασία της ηπατικής ινογένεσης [40].

Τα ηπατοκύτταρα αποτελούν το στόχο πολλών ηπατοτοξικών παραγόντων όπως ηπατοτρόπων ιών, μεταβολιτών αιθυλικής αλκοόλης και χολικών οξέων [41].

Τα κατεστραμμένα ηπατοκύτταρα ελευθερώνουν ROS και ινογενετικούς μεσολαβητές που ενεργοποιούν τα κύτταρα του Kupffer και προάγουν την στρατολόγηση των λευκών αιμοσφαιρίων μέσω φλεγμονωδών κυτταροκινών.

Η απόπτωση των κατεστραμμένων ηπατοκυττάρων αποτελεί ερέθισμα για την ινογενετική δράση των ηπατικών μυοϊνοβλαστών [42].

Φλεγμονώδη κύτταρα, λεμφοκύτταρα ή πολυμορφοπύρρηνα, επάγουν την έκκριση κολλαγόνου από τους μυοϊνοβλάστες [43]. Τα ενεργοποιημένα HSCs εκκρίνουν

φλεγμονώδεις χημειοκίνες , εκφράζουν μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και ρυθμίζουν τη δράση των λεμφοκυττάρων [44].

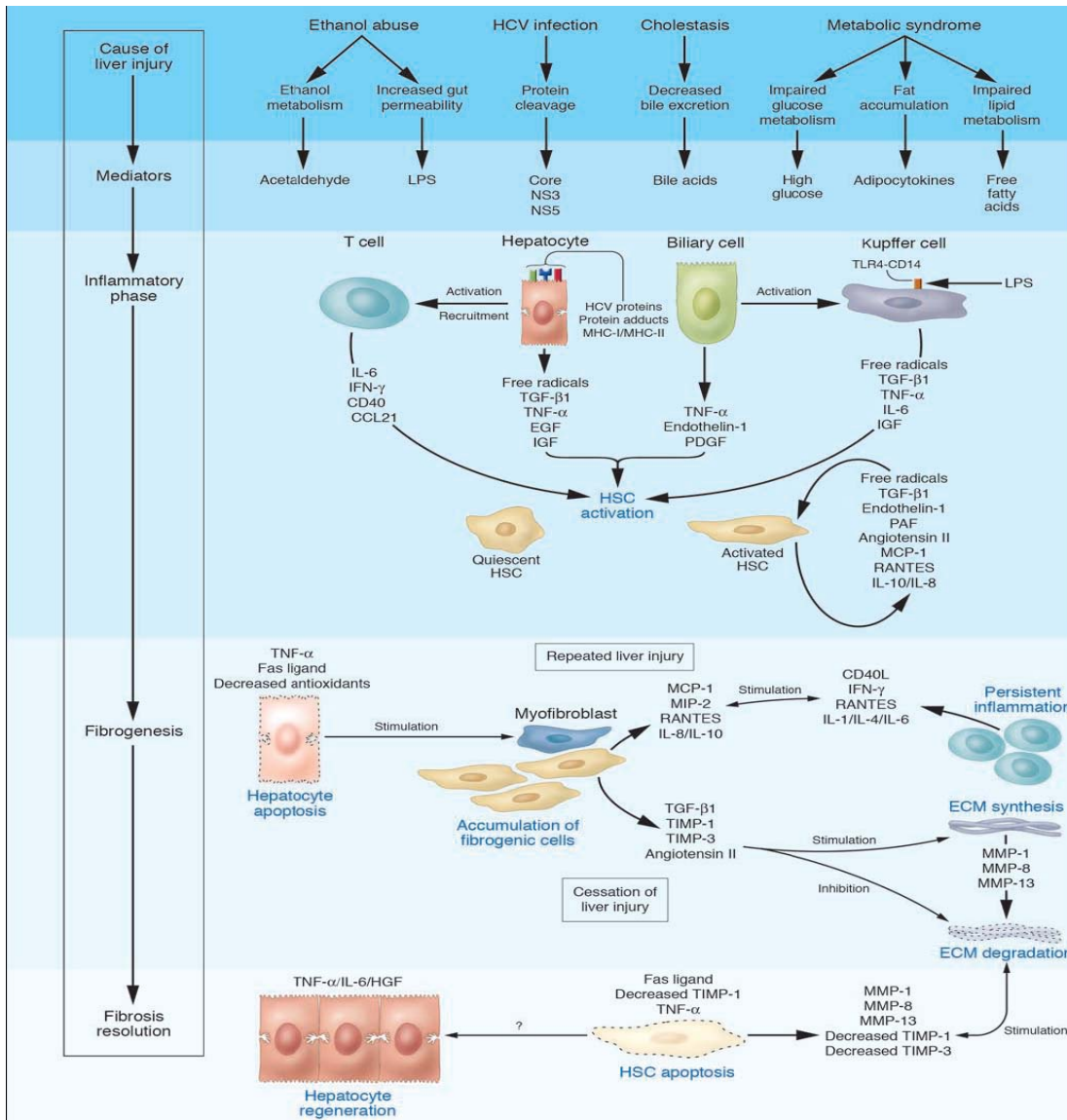
Έτσι παρατηρείται ένας φαύλος κύκλος στον οποίο υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ φλεγμονωδών και ινογενετικών κυττάρων [45] **[Εικόνα 6]**.

Εάν η ηπατική βλάβη επιμείνει επέρχεται συσσώρευση των ενεργοποιημένων HSCs και των πυλαίων ινοβλαστών με αποτέλεσμα τη σύνθεση μεγάλης ποσότητας εξωκυττάριας ουσίας που οδηγεί σε ιστική ίνωση.

Η διάσπαση της εξωκυττάριας ουσίας εμποδίζεται από την δράση κυτταροκινών, όπως των TIMPs.

Μετά την αφαίρεση του βλαπτικού παράγοντα και αφού δεν έχει εδραιωθεί η κίρρωση η ίνωση μπορεί να αναστραφεί.

Η φάση αυτή περιλαμβάνει την απόπτωση των ενεργοποιημένων HSCs και την αναπαραγωγή των ηπατοκυττάρων. Το κολλαγόνο διασπάται με την αυξημένη δράση των MMPs, αποτέλεσμα της μειωμένης έκφρασης των TIMPs.



**Εικόνα 6.** Σχηματική αναπαράσταση των κυτταρικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ηπατική ίνωση. *J. Clin. Invest.* 115:209–218 (2005).

### 1.3. Κυτταροκίνες εμπλεκόμενες στην ηπατική ινογένεση

Οι κυτταροκίνες ρυθμίζοντας την φλεγμονώδη αντίδραση στην βλάβη ρυθμίζουν την ηπατική ινογένεση *in vivo* και *in vitro* [46].

Οι MCP-1 και RANTES επάγουν την ινογένεση ενώ οι IL-10 και IFN-γ ασκούν αντίθετη δράση [47,48].

Μεταξύ των αυξητικών παραγόντων ο TGF-β1 φαίνεται να είναι ο μεσολαβητής κλειδί στην ινογένεση του ανθρώπινου ήπατος [49]. Στα HSCs, ο TGF-β ευνοεί την μετάπτωση σε μυοϊνοβλάστες, επάγει την σύνθεση της εξωκυττάριας πρωτεΐνης και εμποδίζει την διάσπασή της. Σε πειραματικά μοντέλα, οι στρατηγικές που στοχεύουν στην διάσπαση της σύνθεσης του μειώνουν σημαντικά την ίνωση [50]. Ο PDGF (αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας) είναι ο βασικός παράγοντας που οδηγεί στην μίτωση των HSCs [51] και η καταστολή πειραματικά, οδηγεί σε εξασθένηση της ηπατικής ινογένεσης [52]. Επίσης οι κυτταροκίνες με αγγειοκινητικές ιδιότητες έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην διαδικασία της ινογένεσης του ήπατος . Οι αγγειοδιασταλτικές ουσίες (π.χ νιτρικό οξύ, ρελαξίνη) ασκούν αντιϊνωτική δράση ενώ οι αγγειοσυσπαστικές (π.χ νορεπινεφρίνη, αγγειοτενσίνη II) έχουν αντίθετη δράση [53,54].

Η ενδοθηλίνη-1, ισχυρός αγγειοσυσπαστικός παράγοντας, επάγει την ινογένεση μέσω του τύπου A υποδοχέα της [55]. Μεταξύ των αγγειοκινητικών παραγόντων η αγγειοτενσίνη II φαίνεται να έχει τον μεγαλύτερο ρόλο στην ηπατική ινογένεση. Η αγγειοτενσίνη II είναι το δραστικό πεπτιδίο στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης αποτελώντας το βασικό ρυθμιστή της ομοιόστασης της αρτηριακής πίεσης στον ανθρώπινο οργανισμό.

Βασικό συστατικό αυτού του συστήματος εκφράζεται τοπικά στην χρόνια ηπατική βλάβη και ενεργοποιώντας τα HSCs παράγεται de novo αγγειοτενσίνη II [56,57]. Φαρμακολογική και/ ή γενετική εξάλειψη του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης, πειραματικά, οδηγεί σε αξιοσημείωτη μείωση της ηπατικής ίνωσης [58,59-64].

Η αγγειοτενσίνη II επάγει την φλεγμονή του ήπατος και την ινωτική δράση των HSCs στην οποία περιλαμβάνονται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική μετανάστευση, η έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και η σύνθεση κολλαγόνου [65-67].

Οι λιποκυτταροκίνες οι οποίες είναι κυτταροκίνες κυρίως παραγόμενες από τον λιπώδη ιστό, ρυθμίζουν την ινογένεση του ήπατος.

Η λεπτίνη είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των HSCs και την ανάπτυξη της ίνωσης (68,69). Αντίθετα, η αδιπονεκτίνη μειώνει σημαντικά την ινογένεση του ήπατος *in vivo* και *in vitro* [70].



Η δράση αυτών των κυτταροκινών μπορεί να εξηγήσει το λόγο για τον οποίο η παχυσαρκία επηρεάζει την ανάπτυξη της ίνωσης σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C [71].

#### **1.4. Υποδοχείς Toll-like (TLRs)**

Αν και τα ευρήματα της σημασίας των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και λιποκυτταροκινών, στην δημιουργία ηπατικής ίνωσης, έχουν πληθύνει, η μοριακή σύνδεση μεταξύ ηπατικής φλεγμονής και ίνωσης παραμένει ασαφής.

Πολύ πρόσφατα ευρήματα έχουν προσφέρει σημαντική πρόοδο στην κατανόηση αυτής της σύνδεσης.

Κεντρική σημασία στην διεργασία αυτή, αποτελούν οι υποδοχείς Toll-like (TLRs) και ειδικά ο TLR4 και ο ψευδοϋποδοχέας του TGF-β BAMBΙ, ο οποίος αναστέλλει το μονοπάτι που διεγείρει ο TGF-β και οδηγεί στην ίνωση [72].

Οι TLRs, αποτελούν μία ομάδα υποδοχέων που αναγνωρίζουν επιτόπους βακτηριδίων και επιτρέπουν στον ξενιστή να αντιδρά στις μικροβιακές λοιμώξεις [73]. Ενέχονται όμως και σε μη λοιμώδεις φλεγμονές σε διάφορα συστήματα, περιλαμβανομένου του ήπατος [74].

Ο TLR4 δρα ως υποδοχέας για την πολυσακχαρίδη (LPS) συστατικού του τοιχώματος Gram-αρνητικών βακτηριδίων .

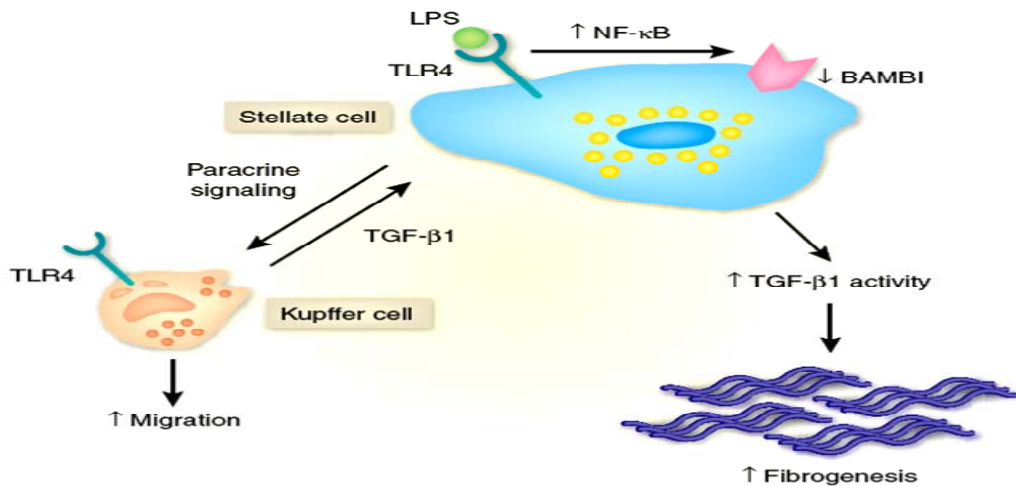
Μετά από ηπατική βλάβη, τα επίπεδα LPS στο αίμα αυξάνουν τόσο στην πυλαία όσο και στην συστηματική κυκλοφορία λόγω αυξημένης διαβατότητας του εντερικού τοιχώματος. Ο κύριος στόχος της LPS είναι τα κύτταρα Kupffer, πλούσια σε TLR4[75].

TLR4 όμως υπάρχει και στα αστεροειδή κύτταρα και μάλιστα ευαίσθητος σε χαμηλές συγκεντρώσεις LPS [76].

Ο υποδοχέας BAMBΙ (bone morphogenic prote and activin bound inhibitor), είναι ένας διαμεμβρανικός TGF-β ψευδοϋποδοχέας που καταστέλλει τα σήματα του TGF-β [77].

Πρόσφατα έχει αποδειχθεί σε πειραματόζωα, ότι η διέγερση του TLR4 των αστεροειδών κυττάρων από LPS, οδηγεί στην μείωση της έκφρασης του BAMBΙ και επομένως επιτρέπει μία μη καταστέλλομενη επίδραση του υπερπαραγόμενου από τα κύτταρα του Kupffer TGF-β, ύστερα από την επίδραση σε αυτά της LPS [78].

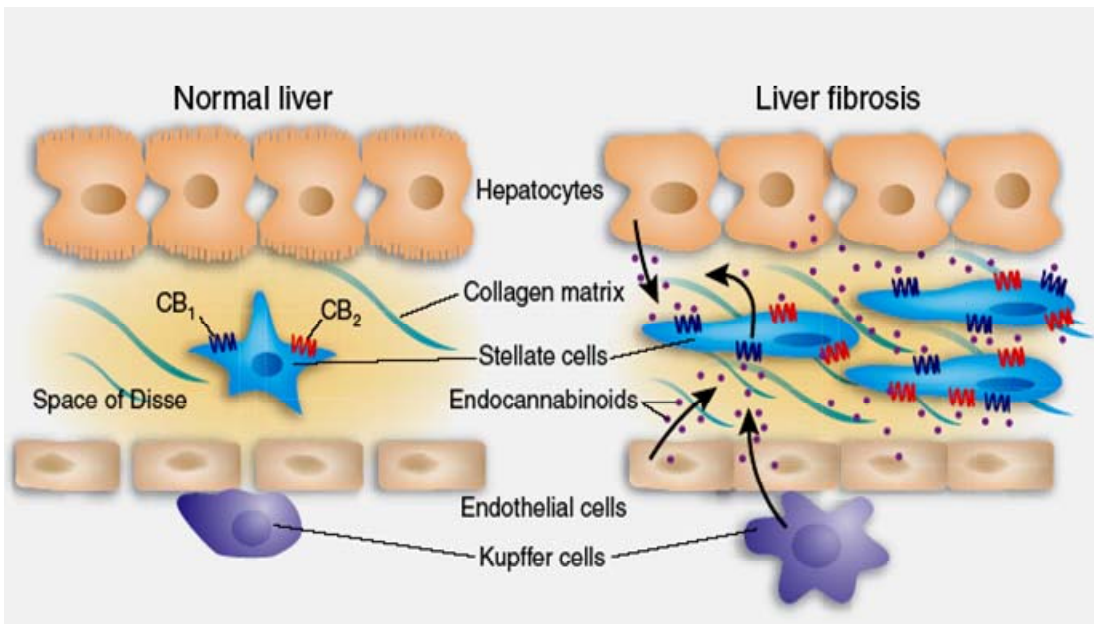
Η καταστολή του BAMBΙ, επάγεται μέσω του συστήματος MyD88 – NF-kB [Εικόνα 7].



**Εικόνα 7.** Ινογενετικά σήματα επαγόμενα από τον TLR4 στα HSCs και ο ρόλος των κυττάρων του Kupffer. *Nat Med.* 2007 Nov ;13 (11) :1324-32.

Τέλος σύμφωνα με μία σημαντική πληροφορία που δημοσιεύτηκε πρόσφατα υποδοχείς κανναβινοειδών CB1 και CB2 υπάρχουν στα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος .

Ο CB1 διεγερόμενος οδηγεί σε ηπατική ίνωση, ενώ η αναστολή του παρεμποδίζει την ίνωση στα πειραματόζωα [79][**Εικόνα 8**].



**Εικόνα 8.** Τα κανναβινοειδή επηρεάζουν την ίνωση στο ήπαρ. *Nat Med.* 2006 Jun;12(6):608-10.

## **1.5. Βιβλιογραφία**

1. Friedman, S.L. 2003. Liver fibrosis - from bench to bedside. *J. Hepatol.* 38 (Suppl. 1): S38–S53.
2. Pinzani, M. 1999. Liver fibrosis. *Springer Semin.Immunopathol.* 21:475–490.
3. Benyon, R.C., and Iredale, J.P. 2000. Is liver fibrosis reversible? *Gut.* 46:443–446.
4. Gressner A.M, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- $\beta$  as major players and therapeutic targets. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 10, No 1, 2006 pp. 76-99
5. Schaffner F, Popper H. Capillarization of hepatic sinusoids in man. *Gastroenterology* 1963; 44: 239–42.
6. Dubuisson L, Boussarie L, Bedin CA, Balabaud C, Bioulac-Sage P Transformation of sinusoids into capillaries in a rat model of selenium-induced nodular regenerative hyperplasia: an immunolight and immunoelectron microscopic study.*Hepatology* 1995; 21: 805–14.
7. Arthur, M.J. 2000. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279:G245–G249.
8. Aterman K. The parasinusoidal cells of the liver: a historical account. *Histochem J.* 1986; 18: 279–305.
9. de Leeuw AM, McCarthy SP, Geerts A, Knook DL. Purified rat liver fat-storing cells in culture divide and contain collagen. *Hepatology* 1984; 4: 392–403.
10. Friedman SL, Roll FJ. Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan. *Anal Biochem.* 1987; 161: 207–18.
11. Friedman SL, Rockey DC, McGuire RF, Maher JJ, Boyles JK, Yamasaki G. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver:

morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology* 1992; 15: 234-43.

12. Cassiman D, Roskams T. Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. *J Hepatol.* 2002; 37: 527-35.

13. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000; 275: 2247-50.

14. Kawada N. The hepatic perisinusoidal stellate cell. *Histol Histopathol.* 1997; 12: 1069-80.

15. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis.* 2001; 21: 311-29.

16. Eckardt KU, Pugh CW, Meier M, Tan CC, Ratcliffe PJ, Kurtz A. Production of erythropoietin by liver cells in vivo and in vitro. *Ann NY Acad Sci.* 1994; 718: 50-60.

17. Leyland H, Gentry J, Arthur MJ, Benyon RC. The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells. *Hepatology* 1996; 24:1172-8.

18. Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis.* 2001; 21: 397-412.

19. Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 2000; 21: 49-98.

20. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol.* 2001; 35:297-306.

21. Garcia-Trevijano ER, Iraburu MJ, Fontana L, Dominguez-Rosales JA, Auster A, Covarrubias-Pinedo A, Rojkind M. Transforming growth factor  $\beta$ 1 induces the expression of  $\alpha$ 1(I) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-

C/EBP $\beta$ -dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 29: 960–70.

22. Casini A, Galli G, Salzano R, Ceni E, Franceschelli F, Rotella CM, Surrenti C. Acetaldehyde induces c-fos and c-jun proto-oncogenes in fat-storing cell cultures through protein kinase C activation. *Alcohol Alcohol.* 1994; 29: 303–14.

23. Greenwel P, Dominguez-Rosales JA, Mavi G, Rivas-Estilla AM, Rojkind M. Hydrogen peroxide: a link between acetaldehyde-elicited  $\alpha 1(I)$  collagen gene upregulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000; 31: 109–16.

24. Ikeda H, Yatomi Y, Yanase M, Satoh H, Maekawa H, Ogata I, Ozaki Y, Takuwa Y, Mochida S, Fujiwara K. Biological activities of novel lipid mediator sphingosine 1-phosphate in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 279: G304–10.

25. Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner AM. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest.* 1992;89: 19–27.

26. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF- $\beta$  in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 2002; 7: d793–807.

27. Rockey DC. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis.* 2001; 21: 337–49.

28. Rockey D. The cellular pathogenesis of portal hypertension:stellate cell contractility, endothelin, & nitric oxide. *Hepatology* 1997; 25: 2–5.

29. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005; 115: 209–18.

30. Gressner AM. Perisinusoidal lipocytes and fibrogenesis. *Gut* 1994; 35: 1331–3.

31. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15:255–73.
32. Campbell JS, Hughes SD, Gilbertson DG, Palmer TE, Holdren MS, Haran AC, Odell MM, Bauer RL, Ren HP, Haugen HS, Yeh MM, Fausto N. Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 3389–94.
33. Magness ST, Bataller R, Yang L, Brenner DA. A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations. *Hepatology* 2004; 40: 1151–9.
34. Knittel T, Kobold D, Saile B, Grundmann A, Neubauer K, Piscaglia F, Ramadori G. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 1999; 117: 1205–21.
35. Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 126: 955–63.
36. Ishii G, Sangai T, Sugiyama K, Ito T, Hasebe T, Endoh Y, Magae J, Ochiai A. In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem Cells* 2005; 23: 699–706.
37. Geerts, A. 2001. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* 21:311–335.
38. Sato, M., Suzuki, S., and Senoo, H. 2003. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct. Funct.* 28:105–112.
39. Oben, J.A., Yang, S., Lin, H., Ono, M., and Diehl, A.M. 2003. Norepinephrine and neuropeptide Y promote proliferation and collagen gene expression of hepatic myofibroblastic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302:685–690.

40. Kmiec, Z. 2001. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 161:III–XIII, 1–151.
41. Higuchi, H., and Gores, G.J. 2003. Mechanisms of liver injury: an overview. *Curr. Mol. Med.* 3:483–490.
42. Canbay, A., Friedman, S., and Gores, G.J. 2004. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology.* 39:273–278.
43. Casini, A., et al. 1997. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology.* 25:361–367.
44. Vinas, O., et al. 2003. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology.* 38:919–929.
45. Maher, J.J. 2001. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin. Liver Dis.* 21:417–426.
46. Marra, F. 2002. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front. Biosci.* 7:d1899–d1914.
47. Schwabe, R.F., Bataller, R., and Brenner, D.A. 2003. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285:G949–G958.
48. Shi, Z., Wakil, A.E., and Rockey, D.C. 1997. Strainspecific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:10663–10668
49. Gressner, A.M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K., and Dooley, S. 2002. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front. Biosci.* 7:d793–d807.
50. Shek, F.W., and Benyon, R.C. 2004. How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? *Eur. J. Gastroenterol.*

Hepatol. 16:123–126.

51. Pinzani, M., Gesualdo, L., Sabbah, G.M., and Abboud, H.E. 1989. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fatstoring cells. *J. Clin. Invest.* 84:1786–1793.

52. Borkham-Kamphorst, E., Stoll, D., Gressner, A.M., and Weiskirchen, R. 2004. Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321:413–423.

53. Oben, J.A., et al. 2004. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut.* 53:438–445.

54. Williams, E.J., et al. 2001. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo. *Gut.* 49:577–583.

55. Cho, J.J., et al. 2000. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology.* 118:1169–1178.

56. Paizis, G., et al. 2002. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile ductligated rat liver. *Gastroenterology.* 123:1667–1676.

57. Bataller, R., et al. 2003. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology.* 125:117–125.

58. Kanno, K., Tazuma, S., and Chayama, K. 2003. AT1A-deficient mice show less severe progression of liver fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308:177–183.

59. Jonsson, J.R., et al. 2001. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology.* 121:1148-1155



60. Paizis, G., et al. 2001. Effect of angiotensin II type1 receptor blockade on experimental hepatic fibrogenesis. *J. Hepatol.* 35:376–385.
61. Ramalho, L.N., et al. 2002. Effect of losartan, an angiotensin II antagonist, on secondary biliary cirrhosis. *Hepatogastroenterology.* 49:1499–1502.
62. Wei, H.S., et al. 2000. The regulatory role of AT 1 receptor on activated HSCs in hepatic fibrogenesis: effects of RAS inhibitors on hepatic fibrosis induced by CCl(4). *World J. Gastroenterol.* 6:824–828.
63. Wei, H.S., et al. 2000. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl(4). *World J. Gastroenterol.* 6:540–545.
64. Tuncer, I., Ozbek, H., Ugras, S., and Bayram, I. 2003. Anti-fibrogenic effects of captopril and candesartan cilexetil on the hepatic fibrosis development in rat. The effect of AT1-R blocker on the hepatic fibrosis. *Exp. Toxicol. Pathol.* 55:159–166.
65. Bataller, R., et al. 2003. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 112:1383–1394. doi:10.1172/JCI200318212.
66. Bataller, R., et al. 2000. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human HSCs. *Gastroenterology* 118:1149–1156.
67. Bataller, R., et al. 2003. Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver. *Am.J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285:G642–G651.
68. Marra, F. 2002. Leptin and liver fibrosis: a matter of fat. *Gastroenterology.* 122:1529–1532.
69. Ikejima, K., et al. 2002. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology.* 122:1399–1410.

70. Kamada, Y., et al. 2003. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology*. 125:1796–1807.
71. Ortiz, V., Berenguer, M., Rayon, J.M., Carrasco, D., and Berenguer, J. 2002. Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression. *Am. J. Gastroenterol.* 97:2408–2414.
72. Friedman SL. A deer in the headlights: BAMBI meets liver fibrosis. *Nat Med.* 2007 Nov;13(11):1281-2.
73. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jul;4(7):499-511.
74. Tsung A, Hoffman RA, Izuishi K, Critchlow ND, Nakao A, Chan MH, Lotze MT, Geller DA, Billiar TR. Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells. *J Immunol.* 2005 Dec 1;175(11):7661-8.
75. Schwabe RF, Seki E, Brenner DA. Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology.* 2006 May;130(6):1886-900.
76. Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner DA. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2003 May;37(5):1043-55.
77. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massagué J, Niehrs C. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature.* 1999 Sep 30;401(6752):480-5.
78. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med.* 2007 Nov;13(11):1324-32.
79. Kunos G, Osei-Hyiaman D, Bátkai S, Gao B. Cannabinoids hurt, heal in cirrhosis. *Nat Med.* 2006 Jun;12(6):608-10.

## **2. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΕΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ (MMPs) ΚΑΙ ΙΣΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥΣ (TIMPs)**

### **2.1. Μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας ουσίας (MMPs), ιστικοί αναστολείς τους (TIMPs) και ηπατική ίνωση**

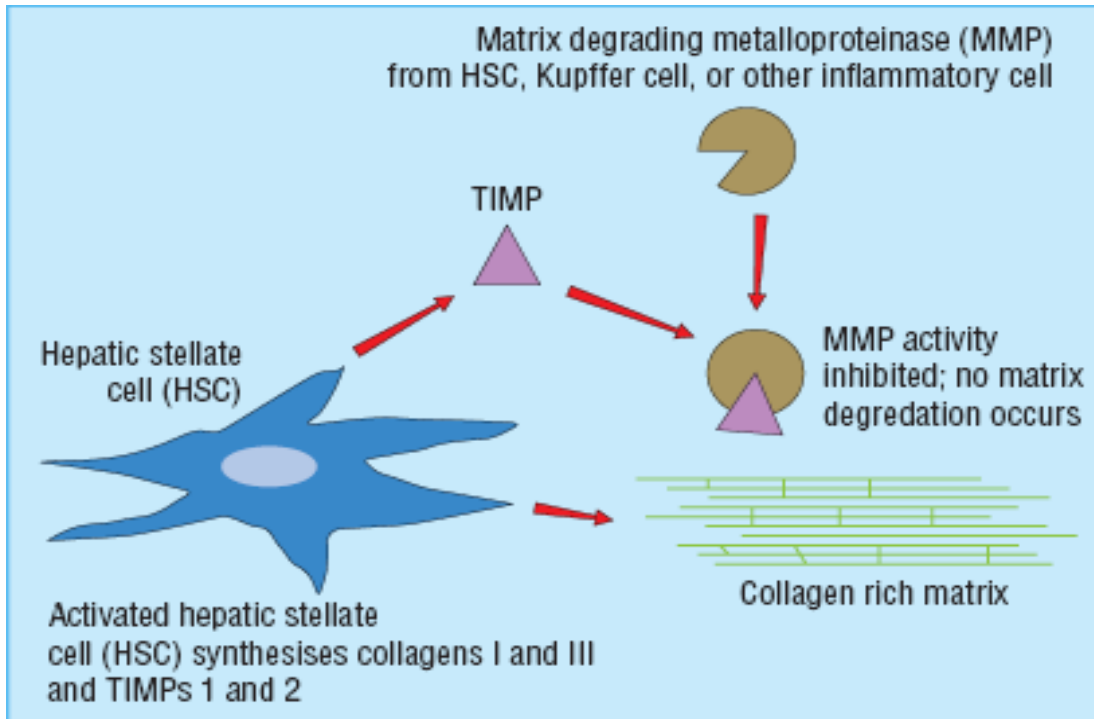
Η ηπατική ίνωση αρχικά θεωρήθηκε ως μία προϊούσα παθολογική διαδικασία όπου σειρά πολλαπλών μοριακών και κυτταρικών γεγονότων οδηγεί σε υπερβολική παραγωγή και εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας (πλούσια σε κολλαγόνο I και III) από τα ενεργοποιημένα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα στον χώρο του Disse. Η διαδικασία αυτή σε συνδυασμό με την αναποτελεσματική αναγέννηση και την ιστική επιδιόρθωση, έχει σαν αποτέλεσμα την διαρκώς αυξανόμενη καταστροφή της αρχιτεκτονικής του φυσιολογικού ήπατος και τελικώς την κίρρωση [1].

Μελέτες του ρόλου των ηπατικών αστεροειδών στην διαδικασία της ηπατικής ίνωσης και περισσότερο λεπτομερείς γνώσεις της κυτταρικής βιολογίας τους, οδήγησαν σε σημαντικά ερωτήματα σχετικά με την ισχύ του <<προοδευτικά-μόνο>> μοντέλου.

Έτσι, μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν ότι η ηπατική ίνωση είναι μία δυναμική και αμφίδρομη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει φάσεις επιδείνωσης και υποστροφής [1].

Στον χώρο του Disse η αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας επέρχεται κυρίως ως συνέπεια της δράσης μίας οικογένειας ενζύμων που ονομάζονται μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας ουσίας (MMPs). Εκκρίνονται από διάφορα κύτταρα μέσα στον εξωκυττάριο χώρο, ως προένζυμα, τα οποία ενεργοποιούνται από έναν αριθμό ειδικών, συνήθως σχετιζόμενων με την κυτταρική επιφάνεια, μηχανισμών διάσπασης. Τα ενεργοποιημένα ένζυμα στην συνέχεια αναστέλλονται από την οικογένεια των ιστικών αναστολέων των μεταλλοπρωτεασών (TIMP-1 έως TIMP-4) παραγόμενων από τα ενεργοποιημένα ηπατικά αστεροειδή [Εικόνα 1].

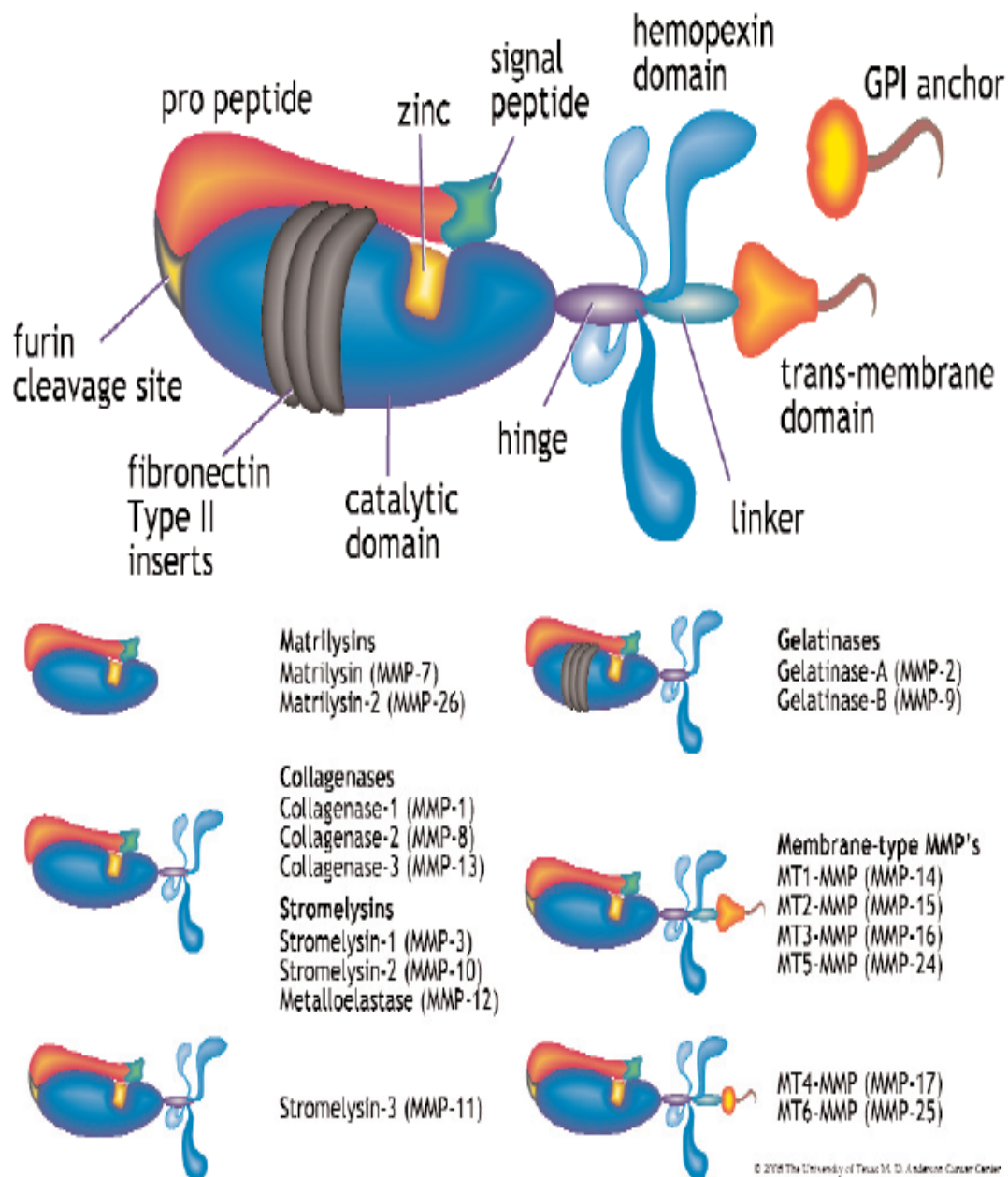
Ο συνδυασμός των δύο αυτών βασικών μηχανισμών ρυθμίζει την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας αποτρέποντας την ασύδοτη ιστική καταστροφή [1].



**Εικόνα 1.** Οι ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών (TIMPs) εκκρινόμενοι από τα ενεργοποιημένα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα εμποδίζουν την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας, αναστέλλοντας την ενζυμική δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεασών (MMPs) *BMJ 2003; 327: 143-147*

## **2.2. Μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας ουσίας (MMPs)**

Οι μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας ουσίας (matrix metalloproteinases-MMPs) αποτελούν υποομάδα της μεγάλης οικογένειας των metrinicin , άλλα μέλη της οποίας είναι οι serralysins, οι astacins και οι ADAMS [2]. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 25 μέλη, με 23 να ανήκουν στον άνθρωπο, τα οποία αριθμούνται από 1 έως 28 (οι MMP-4, -5 και -6 έχουν διαγραφεί ) [3,4]. Οι MMPs μπορούν περαιτέρω να διαιρεθούν με βάση τις διαφορές στην δομή τους και την δραστικότητα τους έναντι των διαφορετικών υποστρωμάτων σε 6 υποομάδες (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2.** Basic structural domains of the MMPs. *J Cell Mol Med.* 2005 Apr-Jun 9(2) 267-85

Οι 3 κύριες λειτουργικές υποομάδες είναι οι κολλαγενάσες με ιδιαίτερη προτίμηση στην διάσπαση των κολλαγόνων I, II και III, οι γελατινάσες με προτίμηση στην διάσπαση του κολλαγόνου IV και οι στρωμελίσινες με ειδικότητα στην λαμινίνη. Στις υπόλοιπες 3 υποομάδες ανήκουν οι μεμβρανικές μεταλλοπρωτεάσες και οι

ματριλυσίνες ενώ η τελευταία υποομάδα περιλαμβάνει όλες τις υπόλοιπες ιστικές μεταλλοπρωτεάσες [Πίνακας 1].

Οι πλειοψηφία των MMPs εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο, μία μικρή μερίδα εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια ενώ σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες κάποιες άλλες όπως για παράδειγμα οι MMP-1, MMP-2 και MMP-11 μπορούν να βρεθούν στον ενδοκυττάριο χώρο όπου πιθανόν να έχουν δράση στις ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες [5-8].

Κατά την έκκριση τους βρίσκονται σε ανενεργό μορφή (προ-ένζυμα ή ζυμογόνα) και είναι απαραίτητη η αφαίρεση του προπεπτιδικού επιτόπου για να επιτευχθεί η ενζυμική τους δραστηριότητα[9].

Οι MMPs συμμετέχουν σε ένα μεγάλο μέρος των διεργασιών της ανατροπής και της αναδόμησης των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας και των βασικών μεμβρανών, στην κυτταρική μετανάστευση και στην ενεργοποίηση και απενεργοποίηση διαφόρων διαλυτών παραγόντων.

Οι MMPs εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα πρωτεολυτικών γεγονότων στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και στην φυσιολογική ιστική αναδόμηση καθώς επίσης στην επούλωση του τραύματος και στην φλεγμονή[10].

Υπό κανονικές συνθήκες, ο φυσιολογικός ρόλος των MMPs περιλαμβάνει την εμφύτευση του εμβρύου, την ανάπτυξη του μαζικού αδένου, την ωρίμανση του σπέρματος, την επιμήκυνση των οστών, την αγγειογένεση, την ωογένεση, την ανάπτυξη των θυλακίων των τριχών, την ανάπτυξη των νευρώνων, την εμμηνόρροια, τον σχηματισμό σμάλτου, την παλινδρόμηση της μήτρας και την κατεργασία και παρουσίαση των αντιγόνων. Δυσλειτουργία στο επίπεδο και στον έλεγχο των MMPs οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις (ανάπτυξη και μετάσταση του όγκου, αρθρίτιδα, ίνωση, κίρρωση, αορτικά ανευρύσματα) και νοσήματα (γλαύκωμα, σκληροδερμία, λύκος, HIV κ.α ) [11,12].

Οι πρωτεολυτική δραστηριότητα των MMPs ρυθμίζεται σε τρία βασικά επίπεδα: κατά την μεταγραφή, την ενεργοποίηση των προενζύμων και την αδρανοποίηση από μη-ειδικούς (α2-μακροσφαιρίνη) και ειδικούς ιστικούς αναστολείς (TIMP-1 ως -4) [13].

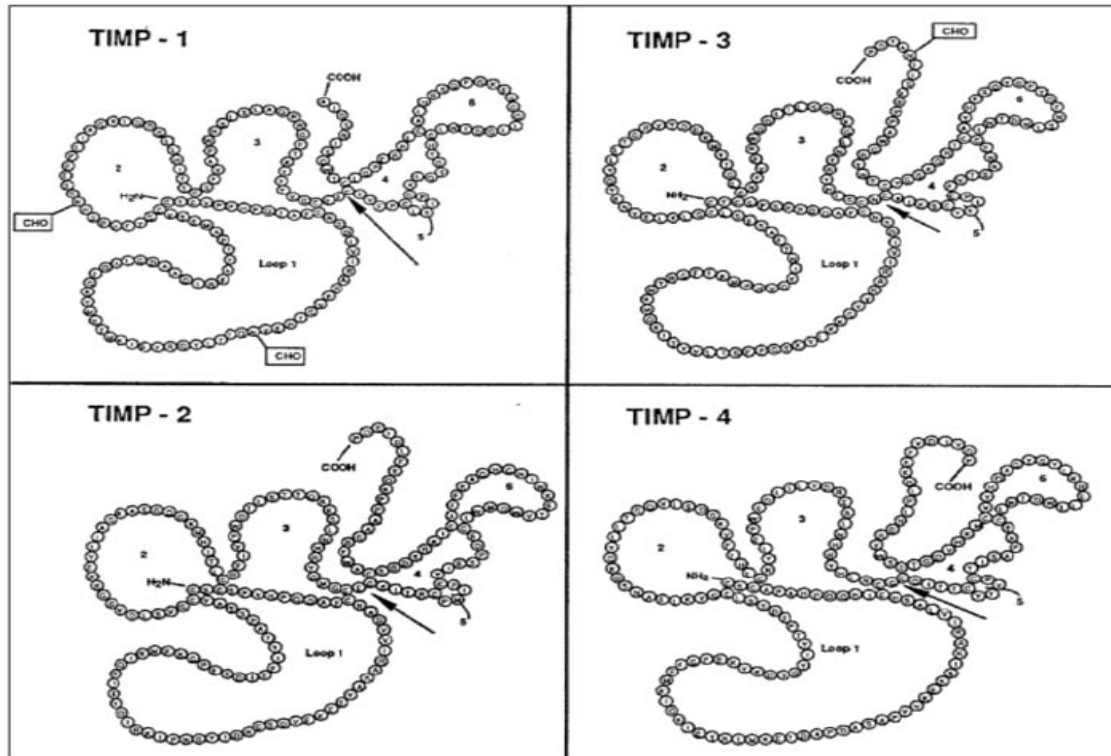
MMP Designation	Other name(s)	Latent/active (kDa)	Collagen substrates	Other substrates	Pro-MMP substrates
MMP-1	Collagenase-1, Fibroblast collagenase, interstitial collagenase, ColA, ColB	55/45	I, II, III, VI, VII, X	Agg. EN/NL, FN, Gel, LN, PG, VN, MBP, serpins, $\alpha_2$ M, Per, TNF precursor, $\alpha_1$ -ACT, $\alpha_1$ -PI, IGFBPs	-2 -9
MMP-2	Gelatinase A, 72 kDa gelatinase, 72 kDa type IV collagenase	72/66	I, III, IV, V, VII, X, XI, XIV	Agg. EL, EN/NL, FN, Gel, LN, PG, VN, Dec, Fib, CCL-7, CXCL12, MBP, TNF precursor, plas, $\alpha_1$ -PI, IGFBPs, pro TGF $\beta$	-1 -9 -13
MMP-3	Stromelysin-1 Transin-1	57/45	III, IV, IX, X, XI	Agg. EL, EN/NL, FN, Gel, LN, PG, VN, Dec, Fib, E-cadherin, Latent TGF- $\beta$ 1, MBP, TNF precursor, plas, $\alpha_1$ -PI, IGFBPs, osteopontin	-1 -7 -8 -9 -13
MMP-7	Matrilysin, PUMP, Uterine metalloproteinase	28/19	IV, X	Agg. EL, EN/NL, FN, Gel, LN, casein, PG, VN, Dec, Fib, Pro- $\alpha$ -defensins, Fas ligand (CD95L), Latent TNF, Syndecan-1, E-cadherin, MBP, $\alpha_1$ -PI, plas, $\beta$ 4-integrins, $\alpha$ prodefensin, osteopontin	-1 -2 -9
MMP-8	Collagenase-2 Neutrophil collagenase	75/58	I, II, III, V, VII, VIII, X	Agg. EL, FN, Gel, LN, Mouse CXCL5, ser, $\alpha_2$ M	
MMP-9	Gelatinase B, 92 kDa gelatinase, 92 kDa type IV collagenase	92/86	IV, V, VII, X, XIV	Agg. EL, Gel, LN, PG, VN, Dec, Fib, FBN, Agg. Zona occludens 1, Latent TGF- $\beta$ 1, Latent VEGF, NG2 proteoglycan, TNF precursor, $\alpha_1$ -PI, MBP, pro-IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-2R $\alpha$ (CD25)	
MMP-10	Stromelysin-2 Transin-2	57/44	III, IV, V, IX, X	Agg. EL, FN, Gel, LN, PG, nidogen, carboxymethylated transferin	-1 -8 -7
MMP-11	Stromelysin-3	51/44		IGFBP's, $\alpha_1$ -PI	
MMP-12	Metalloelastase macrophage metalloelastase (MME), Human metalloelastase (MME)	54/45/22	I, IV	Agg. EL, EN/NL, FN, Gel, LN, caesin, PG especially heparin and chondritin sulphates, LN, Fib, latent TNF, plas plasminogen, $\alpha_1$ -PI	
MMP-13	Collagenase-3 Rat collagenase	60/48	I, II, III, IV, VII, IX, X, XIV	Agg. FN, Gel, Fib, Ser, PAL, $\alpha_1$ -ACT	-9
MMP-14	MT1-MMP Membrane-type MMP	66/56	I, II, III	Agg. EN/NL, FN, Gel, $\gamma$ 2-subunit of LN-5, FBN, syndecan-1, CD44 (Pgp-1), integrin $\alpha$ V, factor XII, $\alpha_2$ M, pro-TNF, latent TGF $\beta$ , $\alpha_1$ -PI	-2 -13
MMP-15	MT2-MMP	72/60		Agg. FN, Gel, LN, FBN	-2
MMP-16	MT3-MMP	64/52	III	FN, FBN, VN, LN, Gel, syndecan-1	-2
MMP-17	MT4-MMP	57/53		Fib, FBN, TNF $\alpha$ precursor	-2
MMP-18	Collagenase 4	70/53	I		
MMP-19	RASI 1	54/45	IV, I	FN, Gel, LN, COMP	
MMP-20	Enamelysin	54/22		Agg. amelogenin, COMP	
MMP-21	Xenopus MMP	70/53		ND	
MMP-22	Chick embryo MMP	51/42		Caesin, Gel	
MMP-23	CA-MMP			Gel	
MMP-24	MT5-MMP			Gel	-2
MMP-25	Leukolysin MT6-MMP		IV	Gel, Casein, FN, TACE substrate, $\alpha$ 1-PI	
MMP-26	Endometase Matrilysin-2	28/19	IV	FN, Gel	-9
MMP-27				ND	
MMP-28	Epilysin	56/45		Caesin	

**Πίνακας 1.** MMPs Ορισμοί και υποστρώματα. *Journal of Leucocyte Biology* Volume 80, November 2006.

### 2.3. Ιστικοί αναστολείς (TIMPs) των μεταλλοπρωτεασών της εξωκυττάριας ουσίας (MMPs)

Ο πρώτος TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases) περιγράφηκε σε καλλιέργεια ανθρώπινων ινοβλαστών το 1975 ως μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος

28,5 KDa, η οποία ήταν ικανή να αναστείλει την δραστηριότητα των κολλαγενασών [14,15]. Έκτοτε άλλοι 3 TIMPs ανακαλύφθηκαν στους οποίους δόθηκαν οι ονομασίες TIMP2, TIMP3 και TIMP4 [16-19]. Τα γονίδια που τους κωδικοποιούν βρίσκονται στα χρωμοσώματα xp11,3-xp11,23, 17q25, 22q12,1-q13,2 και 2p25 αντίστοιχα [20-23]. Όλοι εμφανίζουν ομολογία 40% στην ακολουθία των αμινοξέων και περιέχουν 6 αγκύλες που συνδέονται μεταξύ τους στον -N και -C τελικό επίτοπο [Εικόνα 3].



**Εικόνα 3.** Η πρωτογενής πρωτεϊνική δομή των TIMPs. Σε κάθε TIMP, 6 ζεύγη κυστεϊνών είναι συνδεδεμένα το ένα με το άλλο σχηματίζοντας 6 δισουλφιδικές γέφυρες. Τα βέλη υποδεικνύουν τις συνδέσεις μεταξύ των N-τελικών και C-τελικών επιτόπων των πρωτεϊνών. *Crit Rev Oncol Hematol 49:187-198.*

Παράγονται σε διάφορους ιστούς χωρίς όμως κάθε ιστός να εκφράζει και τους 4 TIMPs. Γενικά, πολλά επιδερμικά και μεσεγχυματικά κύτταρα είναι ικανά να παράγουν TIMPs [24]. Επίσης λευκά αιμοσφαίρια παράγουν TIMP-1, TIMP-2 και TIMP-3 [25,26]. Ευρήματα μελετών των τελευταίων δεκαετιών αποδεικνύουν ότι οι TIMPs είναι πολύ-λειτουργικές πρωτεΐνες.



Η πρώτη γνωστή λειτουργία των TIMPs η οποία οδήγησε και στην ανακάλυψη τους είναι η αναστολή της δράσης των κολλαγενασών. Σχεδόν όλες οι MMPs μπορούν να ανασταλούν και από τους 4 TIMPs, αν και έχουν δημοσιευτεί διαφορές στην συνδυαστική συγγένεια [27].

Εκτός από την αναστολή των MMPs έχουν περιγραφεί και πολλές άλλες βιολογικές λειτουργίες των TIMPs από τις οποίες πολλές μπορούν να εξηγηθούν μέσω της αναστολής της δράσης των MMPs ενώ άλλες είναι ανεξάρτητες αυτών.

Οι TIMPs λαμβάνουν μέρος στην ενεργοποίηση κάποιων άλλων MMPs και συγκεκριμένα οι TIMP-2 και TIMP-3 ενεργοποιούν την προ-MMP-2 μέσω του σχηματισμού 3πλου συμπλέγματος με την MT1-MMP [28-30] και την MT3-MMP αντίστοιχα [29] επάγοντας με τον τρόπο αυτό την κυτταρική μετανάστευση και τις διαδικασίες της καρκινικής μετάστασης και διήθησης.

Μία άλλη σημαντική λειτουργία των TIMPs είναι η συμμετοχή τους στον πολλαπλασιασμό διαφόρων κυττάρων. Ο TIMP-1 επάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού [31], των λείων μυϊκών κυττάρων της αορτής [32] και των κερατινοκυττάρων [33], ενώ βρίσκεται και στον πυρήνα των ινοβλαστών [34]. Ο TIMP-2 με την σειρά του επάγει τον πολλαπλασιασμό των λευκοκυττάρων, των επιθηλιακών κυττάρων, των ινοβλαστοειδών κυττάρων του οδοντικού πολφού και των ινοβλαστών των ουλών [35], ενώ η υπερέκφραση του αναστέλλει, *in vivo*, την αγγειογένεση [36], την αύξηση του όγκου, την μετάσταση και την διήθηση [37,38]. Επίσης σε *in vitro* μελέτες ο TIMP-2 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων [39]. Σχετικά με την απόπτωση των κυττάρων ο TIMP-1 έχει αντι-αποπτωτική δράση στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού και στα β-λεμφοκύτταρα [40,41]. Ο TIMP-2 εκφράζει επίσης αντι-αποπτωτική δράση σε κυτταρικές σειρές του μελανώματος [42] ενώ οι TIMP-3 και -4 έχουν προ-αποπτωτική δράση σε κυτταρικές σειρές του καρκίνου του παχέος εντέρου και των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων αντίστοιχα [43-48].

Πέραν της καταστολής των MMPs οι TIMPs καταστέλλουν και την δράση άλλων μεταλλοπρωτεασών όπως των ADAMS και των ADAMS-TS οι οποίοι λαμβάνουν μέρος στην γονιμοποίηση, στην αγγειογένεση, στην νευρογένεση και στην μυογένεση [49,50].

Τέλος οι TIMPs εμφανίζουν έμμεσα, μέσω της αναστολής των MMPs, συστηματική δράση [51]. Για παράδειγμα η MMP-2 μπορεί να αυξήσει την ΑΠ είτε

μέσω της ενεργοποίησης της ενδοθηλίνης-1 η οποία έχει αγγειοσυσπαστική ιδιότητα είτε μέσω της διάσπασης του πεπτιδίου adreno-medullin που έχει αγγειοδιασταλτική δράση [51-53].

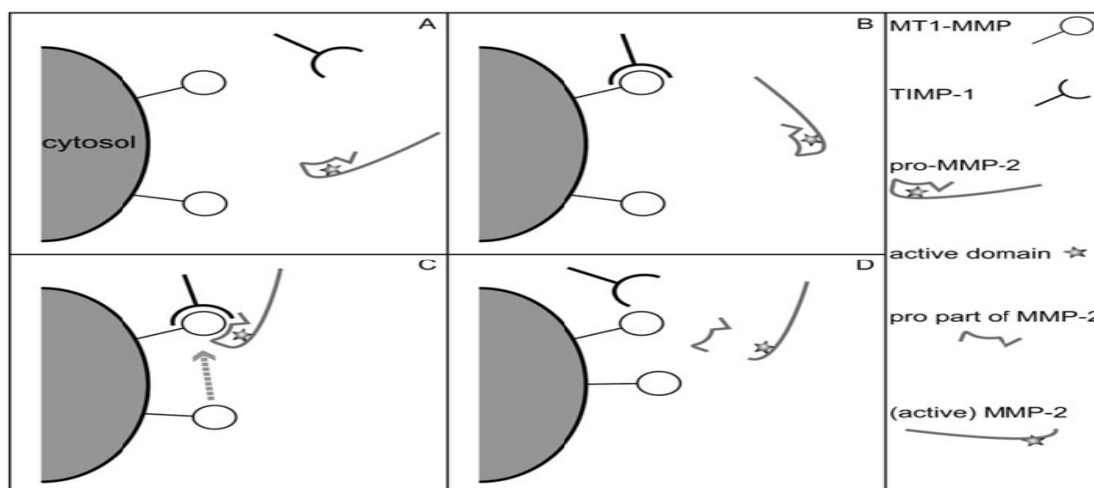
## **2.4. Αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας του φυσιολογικού ήπατος**

Στο φυσιολογικό ήπαρ, τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα στο χώρο του Disse διατηρούνται σε ηρεμία, εν μέρει διότι είναι σε επαφή με μία σύνθετη εξωκυττάρια ουσία που αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνη και πρωτεογλυκάνες. Όταν μετακινηθούν από το περιβάλλον αυτό ενεργοποιούνται και μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες παράγοντας μεγάλα ποσά ινώδους κολλαγόνου.

Οι παρατηρήσεις αυτές υπαινίσσονται ότι η αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας του φυσιολογικού ήπατος μπορεί να συνεισφέρει στην παθογένεια της ηπατικής ίνωσης, ιδιαίτερα στα πρώιμα στάδια της απάντησης στην ηπατική βλάβη. Μέχρι σήμερα η υπόθεση αυτή βασίζεται κυρίως στην παρατήρηση ότι οι MMPs οι οποίες είναι ικανές για την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας του φυσιολογικού ήπατος εκφράζονται στην ηπατική βλάβη και ίνωση. Οι 3 περισσότερο σχετικές MMPs είναι η γελατινάση A (MMP-2), η γελατινάση B (MMP-9) και η στρωμελυσίνη (MMP-3), οι οποίες έχουν μελετηθεί στο ήπαρ [1].

### **2.4.1. Προγελατινάση- A**

Μελέτες σε καλλιέργειες ηπατικών αστεροειδών κυττάρων έχουν αποδείξει ότι η προγελατινάση-A (MMP-2) εκκρίνεται από τα κύτταρα αυτά κατά την ενεργοποίηση και μετατροπή τους σε μυοϊνοβλάστες [54]. Το προένζυμο αυτό στην συνέχεια, ενεργοποιείται στην κυτταρική επιφάνεια σε μία τριμοριακή αλληλεπίδραση, κατά την οποία σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα μεταξύ της μεμβρανικής μεταλλοπρωτεΐνωσης MT1-MMP (επίσης ονομαζόμενη MMP-14) του αναστολέα TIMP-2 και της προ-MMP-2 **[Εικόνα 4]**.



**Εικόνα 4.** Σχηματική αναπαράσταση της ενεργοποίησης της προ-MMP-2 από την MT1-MMP και τον TIMP-1. Η MT1-MMP είναι συνδεδεμένη στην κυτταρική επιφάνεια **(A)**. Ο TIMP-1 συνδέεται με την MT1-MMP **(B)**. Η προ-MMP-2 συνδέεται με το σύμπλεγμα αυτό και ενεργοποιείται. Οι μη-συνδεδεμένες MT1-MMPs μπορούν να στρατολογηθούν και να βοηθήσουν στην ενεργοποίηση της προ-MMP-2 **(C)**. Ακολούθως, το σύμπλεγμα διαχωρίζεται **(D)**. Τα σημεία σύνδεσης για τον σχηματισμό του συμπλέγματος βρίσκονται στον N-τελικό και το C-τελικό επίτοπο του TIMP-2, τον προσομοιάζοντα με αιμοπηξίνη επίτοπο της προ-MMP-2 και στην ενεργό πλευρά της MT1-MMP. *J Dent Res. 2006 Dec 85(12):1074-84.*

Και τα τρία μόρια του συστήματος αυτού εκφράζονται από τα ενεργοποιημένα αστεροειδή. Ο σχηματισμός της ενεργούς γελατινάσης-A ρυθμίζεται από την έκφραση και την δραστηριότητα της μεμβρανικής μεταλλοπρωτεΐνης MT1-MMP [55,56]. Επειδή η MT1-MMP είναι ένα διαμεμβρανικό μόριο το συμπέρασμα είναι ότι η ενεργή γελατινάση A σχηματίζεται στην κυτταρική επιφάνεια των ηπατικών αστεροειδών, σε θέση ιδανική για να διαταράξει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ηπατικών αστεροειδών και της εξωκυττάριας ουσίας.

Σύμφωνα με μία ενδιαφέρουσα πρόσφατη παρατήρηση, η ενεργοποίηση της προγελατινάσης A από τα ηπατικά αστεροειδή επάγεται σημαντικά από την παρουσία του κολλαγόνου τύπου I (κύρια πρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας του ινωτικού ήπατος) [56]. Αυτό θα μπορούσε να συνεισφέρει στην περαιτέρω αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας του φυσιολογικού ήπατος, οδηγώντας στην αύξηση της ενεργοποίησης των ηπατικών αστεροειδών και στην αύξηση της

σύνθεσης του κολλαγόνου τύπου I. Αυτός ο θετικός ρυθμιστικός μηχανισμός (feedback) θα μπορούσε θεωρητικά να προάγει την διαδικασία της ηπατικής ίνωσης. Στην ανθρώπινη ηπατική βλάβη και σε ζωικά μοντέλα ηπατικής ίνωσης, υπάρχουν δεδομένα αυξημένης έκφρασης προγελατινάσης-A και αυξημένος σχηματισμός του ενεργού ενζύμου [57,58].

#### **2.4.2. Προγελατινάση-B**

Η προγελατινάση-B (MMP-9) έχει επίσης βρεθεί στο ήπαρ, με κύρια κυτταρική πηγή τα κύτταρα του Kupffer [59]. Η έκφραση της προγελατινάσης-B αυξάνεται σημαντικά με την ενεργοποίηση των κυττάρων του Kupffer. Στην πλειονότητα της εκκρίνεται ως προένζυμο το οποίο ενεργοποιείται από την πλασμίνη και την στρωμελυσίνη. Η ενεργοποίηση της προγελατινάσης-B πιθανώς να πραγματοποιείται στην κυτταρική επιφάνεια των κυττάρων του Kupffer [60] αλλά και των ηπατικών αστεροειδών δεδομένου ότι τα ενεργοποιημένα σε καλλιέργεια ηπατικά αστεροειδή εκφράζουν uPA (urokinase-type plasminogen activator) και uPA υποδοχείς με αποτέλεσμα την παραγωγή πλασμίνης παρουσία πλασμινογόνου [61]. Αυξημένη δραστηριότητα γελατινάσης-B έχει παρατηρηθεί στο ήπαρ αρουραίων μετά από περίδεση του χοληδόχου πόρου, γεγονός που υπαινίσσεται ότι το ένζυμο αυτό πιθανόν να παίζει ρόλο στην διαδικασία της ηπατικής ίνωσης [62].

#### **2.4.3. Προστρωμελυσίνη 1**

Η προστρωμελυσίνη 1 (MMP-3) επίσης εκκρίνεται από τα ηπατικά αστεροειδή σε καλλιέργεια, αλλά σε αντίθεση με την γελατινάση-A η έκφραση της είναι παροδική και επέρχεται κυρίως τις πρώτες 48-72 ώρες της καλλιέργειας. Η έκφραση της προστρωμελυσίνης είναι αυξημένη στις πρώιμες φάσεις της οξείας ηπατικής βλάβης και συγκεκριμένα ανιχνεύεται εντός των πρώτων 6 ωρών φθάνοντας στο μέγιστο της στις 48-72 ώρες μετά την βλάβη [63]. Δεν έχει υπάρξει κανένα δημοσιευμένο στοιχείο για την έκφραση της στρωμελυσίνης στην χρόνια ηπατική βλάβη και στην προηγμένη ηπατική ίνωση.

### **2.5. Αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας του ινωτικού ήπατος**

Στο ινωτικό ήπαρ υπάρχει καθαρή εναπόθεση ινώδους ουσίας η οποία συμπεριλαμβάνει κυρίως κολλαγόνα του διάμεσου ιστού, τύπου I και III.

Τα μόρια αυτά των τριπλών αλύσεων είναι σχετικά ανθεκτικά στην δραστηριότητα των πρωτεασών αλλά διασπώνται σε ειδική Gly-Ile/Leu περιοχή της α-αλύσου από τις κολλαγενάσες του διάμεσου ιστού (MMP-1 για τον άνθρωπο και MMP-13 για τους αρουραίους) και από την κολλαγενάση των ουδετερόφιλων (MMP-8). Κι άλλες όμως MMPs μπορούν να συνεισφέρουν στην αποδόμηση των ινωδών κολλαγόνων. Οι ενεργές μορφές αυτών των MMPs μπορούν να ανασταλούν από όλους τους TIMPs, οι οποίοι όπως προαναφέρθηκε είναι σημαντικά ρυθμιστικά μόρια στην ιστική ανασύσταση και επιδιόρθωση.

### **2.5.1. Η αναστολή της αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας οδηγεί σε πρόοδο της ηπατικής ίνωσης**

Η υπόθεση ότι η πρόοδος της ηπατικής ίνωσης σχετίζεται με την αναστολή της αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας προκύπτει έντονα από τις μελέτες των σχετικών MMPs και TIMPs σε καλλιέργειες αστεροειδών κυττάρων [64-66].

Στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα των αρουραίων, η MMP-13 εκφράστηκε παροδικά στα πρώιμα στάδια της καλλιέργειας (ημέρες 1-4), ενώ αργότερα εμφάνισε πτώση και έγινε μη ανιχνεύσιμη σε καθυστερημένη καλλιέργεια. Σε αντίθεση η έκφραση των TIMP-1 και TIMP-2 αυξήθηκε δραματικά με την διάρκεια της καλλιέργειας των αστεροειδών κυττάρων.

Παρόμοια αποτελέσματα επιτυγχάνονται σε καλλιέργειες ανθρώπινων αστεροειδών κυττάρων με την διαφορά όμως ότι η έκφραση της MMP-1 παρατηρείται μόνον όταν τα κύτταρα εκτίθενται στον TNF-α.

Από μελέτες ανθρώπινων ηπατικών δειγμάτων (που αποκτήθηκαν από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση ήπατος) έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση του TIMP-1, TIMP-2 ή και των δύο σε ασθενείς με σκληρυντική χολαγγειίτιδα, ατρησία χοληφόρων, πρωτοπαθή χολική κίρρωση και αυτοάνοση χρόνια ενεργό ηπατίτιδα [65,67]. Αυτές οι αλλαγές στο mRNA του TIMP-1 συνοδεύοντουσαν με ανάλογες αλλαγές στην TIMP-1 πρωτεΐνη η οποία ήταν αυξημένη περίπου 5 φορές στο ινωτικό σε σχέση με το κανονικό ανθρώπινο ήπαρ.

Οι ζωικές μελέτες έχουν παράσχει επίσης γνώσεις σχετικά με την χρονική ακολουθία των μοριακών γεγονότων μετά από ηπατική βλάβη προερχόμενη είτε από περίδεση του χοληδόχου πόρου είτε από χορήγηση CCl<sub>4</sub> [64,68]. Οι μελέτες αυτές καταδεικνύουν ότι η έκφραση των TIMP-1, TIMP-2 ταχέως και σημαντικά

αυξάνεται εντός 3-6 ωρών από την βλάβη και παραμένει επίμονα αυξημένη στην χρόνια φάση και των δύο μοντέλων.

Οι αλλαγές αυτές στους TIMPs συγκρούονται με εκείνες που παρατηρούνται είτε για την MMP-1 είτε για την MMP-13 στο ινωτικό ήπαρ, διότι η έκφραση τους παραμένει αμετάβλητη από αυτήν που παρατηρείται στο φυσιολογικό ήπαρ σε οποιοδήποτε στάδιο της ινωτικής διαδικασίας. Επίσης αυτό συγκρούεται εμφανώς με τις αλλαγές που αναφέρονται για την γελατινάση-A και την MT1-MMP.

Τέλος η αυξημένη έκφραση των TIMPs προηγείται της αυξημένης έκφρασης του προκολλαγόνου I mRNA, υποδηλώνοντας ότι οι ινώδεις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας εμφανίζονται σε ένα εξωκυττάριο περιβάλλον στο οποίο η αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας είναι ήδη κατασταλαμμένη.

### **2.5.2. Η υποστροφή της ηπατικής ίνωσης σχετίζεται με την αυξημένη αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας**

Είναι πλέον αποδεκτό ότι η ηπατική ίνωση μπορεί να υποστρέψει αυτόματα μετά από επιτυχή θεραπεία ή απλά απόσυρση, όταν πρόκειται για πειραματικά ζωικά μοντέλα, του αιτίου της χρόνιας ηπατικής βλάβης.

Η παρατήρηση αυτή στηρίχθηκε κυρίως σε πειράματα που έγιναν σε αρουραίους. Συγκεκριμένα, μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση CC14 2 φορές εβδομαδιαίως για 4 εβδομάδες, αναπτύχθηκε σημαντικού βαθμού ηπατική ίνωση με σχηματισμό ινωδών διαφραγμάτων. Η συνέχιση της χορήγησης CC14 για άλλες 4 εβδομάδες οδήγησε σε πρόοδο της ηπατικής ίνωσης και εμφάνιση κίρρωσης ενώ η διακοπή της είχε σαν αποτέλεσμα την υποστροφή της ηπατικής ίνωσης και την αποκατάσταση της φυσιολογικής ιστολογίας του ήπατος [69].

Το πολύτιμο αυτό μοντέλο διευκολύνει την μελέτη μιας σειράς κυτταρικών και μοριακών γεγονότων που υπόκεινται της φυσικής λύσης της ηπατικής ίνωσης. Δύο είναι οι βασικές παρατηρήσεις στην μελέτη αυτή.

Πρώτον, τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα υφίστανται απόπτωση. Το ποσοστό απόπτωσης των ηπατικών αστεροειδών, σε σχέση με το ποσοστό πολλαπλασιασμού τους, αυξάνεται δραματικά μετά την απόσυρση του αιτίου της βλάβης οδηγώντας σε κατά 50% μείωση του αριθμού των ενεργοποιημένων ηπατικών αστεροειδών εντός 72 ωρών.

Δεύτερον, παρατηρείται στο ήπαρ 5πλάσια αύξηση του επιπέδου της ανιχνεύσιμης ενεργού κολλαγενάσης γεγονός που συμπίπτει χρονικά με την

παρατηρημένη αποδόμηση της ινώδους εξωκυττάριας ουσίας του. Η δραστηριότητα της MMP-13 παραμένει σε σταθερά αυξημένο επίπεδο σε όλη την περίοδο της υποτροφής του μοντέλου. Το σταθερά αυξημένο επίπεδο της MMP-13 υποδηλώνει ότι τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα δεν είναι η κύρια κυτταρική πηγή για τα ένζυμα αυτά, εκτός εάν υπάρχει ειδική υποομάδα ενεργοποιημένων αστεροειδών η οποία είναι ανθεκτική στην απόπτωση και συνεχίζει την έκφραση της MMP-13. Μία εναλλακτική και πιθανότερη εξήγηση είναι ότι η MMP-13 παράγεται από άλλα κύτταρα, όπως για παράδειγμα τα κύτταρα του Kupffer [70].

Περαιτέρω ανάλυση ανέδειξε ότι η παρατηρημένη αύξηση της ηπατικής ενεργού κολλαγενάσης σχετίζεται με την ταχεία και σημαντική μείωση του επιπέδου έκφρασης των TIMP-1 και TIMP-2. Η πτώση της έκφρασης του TIMP-1 μπορεί απλά να αφορά την μαζική απόπτωση των ηπατικών αστεροειδών που αποτελούν και την κύρια κυτταρική πηγή παραγωγής τους αλλά το αντίστροφο, επίσης πιθανόν, είναι ότι η μειωμένη έκφραση του TIMP-1 μπορεί να συνεισφέρει στην αυξημένη απόπτωση των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων, αν και μέχρι σήμερα έχει αποδειχθεί ότι ο TIMP-1 έχει αντι-αποπτωτική δράση στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού και στα β-λεμφοκύτταρα [71,72].

Παρά την από μακρού χρόνου υπόθεση ότι η αποδόμηση της ινώδους εξωκυττάριας ουσίας του ήπατος (δηλ. του κολλαγόνου τύπου I και III ) γίνεται με την μεσολάβηση των κολλαγενασών του διάμεσου ιστού (MMP-1 για τον άνθρωπο και MMP-13 για τους αρουραίους), πρόσφατες μελέτες υπαινίσσονται ότι η αληθινή εικόνα in vivo μπορεί να είναι περισσότερο σύνθετη εμπλέκοντας και άλλες MMPs.

Βιοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι η MT1-MMP μπορεί να λειτουργήσει ως <<κολλαγενάση>> ικανή να διασπάσει το κολλαγόνο τύπου I και III [73]. Ιδιαίτερα αξιοσημείωτη είναι η πρόσφατη παρατήρηση ότι ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου της MT1-MMP (MMP-14) έχουν τον φαινότυπο νανώδους ζώου με σκελετική δυσπλασία, αρθρίτιδα, οστεοπενία και γενικευμένη βλάβη των μαλακών ιστών [74]. Οι ανωμαλίες αυτές συνδυάζονται με αυξημένη ίνωση στην περιστεϊκή οστεογενετική στοιβάδα των μακρών οστών η οποία επέρχεται ως αποτέλεσμα ανεπαρκούς αποδόμησης του κολλαγόνου του διάμεσου ιστού.

Επιπλέον, η γελατινάση A επίσης έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να λειτουργήσει ως <<κολλαγενάση>>, με την διάσπαση του τύπου I κολλαγόνου να επέρχεται στον

ίδιο Gly-Ile/Leu δεσμό της α-αλύσου όπως ακριβώς έχει περιγραφεί και για τις MMP-1, MMP-13 [75]. Στοιχεία του ρόλου της γελατινάσης-A στην διάσπαση των κολλαγόνων της διάμεσης ουσίας για όλους τους ιστούς, παρέχονται από μελέτες περιστεϊκού δείγματος κουνελιού. Στο μοντέλο αυτό η διάσπαση του τύπου I κολλαγόνου συσχετιζόταν με την δραστηριότητα της γελατινάσης-A (και όχι της MMP-1) και ήταν σχεδόν εντελώς κατηρημένη (~80%) παρουσία των ειδικών αναστολέων της [75].

Κατά την διάρκεια της υποστροφής της ηπατικής ίνωσης η έκφραση της γελατινάσης-A και της MT1-MMP βαθμιαία επιστρέφει στην αρχική βασική τιμή των ομάδων ελέγχου, με παρόμοιο τρόπο με αυτόν που περιγράφηκε για τον TIMP-1 και TIMP-2.

Οι μελέτες αυτές ενισχύουν την πιθανότητα ότι τέτοιοι εναλλακτικοί μηχανισμοί μπορεί να υπόκεινται της αποδόμησης της ινώδους εξωκυττάριας ουσίας του ήπατος. Περαιτέρω όμως εργασίες είναι αναγκαίες για τον ακριβή διαχωρισμό του ρόλου των διαφορετικών MMPs στην αποδόμηση του κολλαγόνου του διάμεσου ιστού στο ινωτικό ήπαρ, ιδιαιτέρως κατά την διάρκεια της υποστροφής της ηπατικής ίνωσης.



## 2.6. Βιβλιογραφία

1. Arthur MJ. Fibrogenesis. II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279 : G245-G249, 2000.
2. Bode, W., Gomis-Ruth, F. X., Stockler, W. (1993) Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* 331, 134–140.
3. Nagase, H., Visse, R., Murphy, G. (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 69, 562–573.
4. Snoek-van Beurden PAM, Von den Hoff JW (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 38:73-83.
5. Limb GA, Matter K, Murphy G, Cambrey AD, Bishop PN, Morris GE, Khaw PT. Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis. *Am J Pathol* 2005; 166:1555–1563.
6. Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 2002;106:1543–1549.
7. Kwan JA, Schulze CJ, Wang W, Leon H, Sariahmetoglu M, Sung M, Sawicka J, Sims DE, Sawicki G, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *FASEB J* 2004;18:690–692.
8. Luo D, Mari B, Stoll I, Anglard P. Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 2002; 277: 25527–25536.

9. Nagase H, Woessner JF Jr (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491-21494.
10. Hijova, E. (2005) Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl. Lek. Listy.* 106, 127–132.
11. Elkington, P. T., O’Kane, C. M., Friedland, J. S. (2005) The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin. Exp. Immunol.* 142, 12–20.
12. Parks, W. C., Wilson, C. L., Lopez-Boado, Y. S. (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 617–629.
13. Overall CM, Lopez-Otin C (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2:657-672.
14. Bauer EA, Stricklin GP, Jeffrey JJ, Eisen AZ (1975). Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 64:232-240.
15. Woolley DE, Roberts DR, Evanson JM (1975). Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein. *Biochem Biophys Res Commun* 66:747-754.
16. Blenis J, Hawkes SP (1983). Transformation-sensitive protein associated with the cell substratum of chicken-embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:770-774.
17. Staskus PW, Masiarz FR, Pallanck LJ, Hawkes SP (1991). The 21 kDa protein is a transformation-sensitive metalloproteinase inhibitor of chicken fibroblasts. *J Biol Chem* 266:449-454.
18. Pavloff N, Staskus PW, Kishnani NS, Hawkes SP (1992). A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. *J Biol Chem* 267:17321-17326.

19. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE (1996). Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 271:30375-30380.
20. Willard HF, Durfy SJ, Mahtani MM, Dorkins H, Davies KE, Williams BRG (1989). Regional localization of the TIMP gene on the human X chromosome. Extension of a conserved synteny and linkage group on proximal Xp. *Hum Genet* 81:234-238.
21. De Clerck Y, Szpirer C, Aly MS, Cassiman JJ, Eeckhout Y, Rousseau G (1992). The gene for tissue inhibitor of metalloproteinases-2 is localized on human-chromosome arm 17q25. *Genomics* 14:782-784.
22. Apte SS, Mattei MG, Olsen BR (1994). Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22. *Genomics* 19:86-90.
23. Olson TM, Hirohata S, Ye J, Leco K, Seldin MF, Apte SS (1998). Cloning of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-4 gene (TIMP4) and localization of the TIMP4 and Timp4 genes to human chromosome 3p25 and mouse chromosome 6, respectively. *Genomics* 51:148-151.
24. Rowe TF, King LA, MacDonald PC, Casey ML (1997). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in human amnion mesenchymal and epithelial cells. *Am J Obstet Gynecol* 176:915-921.
25. Oelmann E, Herbst H, Zühlendorf M, Albrecht O, Nolte A, Schmitmann C, et al. (2002). Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 is an autocrine and paracrine survival factor, with additional immune-regulatory functions, expressed by Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 99:258-267.
26. Bjerkeli V, Halvorsen B, Damås JK, Nordøy I, Yndestad A, Aukrust P, et al. (2004). Expression of matrix metalloproteinases in patients with Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 63:1659-1663.

27. Olson MW, Gervasi DC, Mobashery S, Fridman R (1997). Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem* 272:29975-29983.
28. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI, Versteeg PS & Von den Hoff J (1995). Mechanism of cell-surface activation of 72-kDa type-IV Collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270:5331-5338.
29. Zhao H, Bernardo MM, Osenkowski P, Sohail A, Pei D, Nagase H, et al. (2004). Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem* 279:8592-8601.
30. Imai K, Ohuchi E, Aoki T, Nomura H, Fujii Y, Sato H, et al. (1996). Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. *Cancer Res* 56:2707-2710.
31. Luparello C, Avanzato G, Carella C, Pucci-Minafra I (1999). Tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP)-1 and proliferative behaviour of clonal breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 54:235-244.
32. Akahane T, Akahane M, Shah A, Thorgeirsson UP (2004). TIMP-1 stimulates proliferation of human aortic smooth muscle cells and Ras effector pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 324:440-445.
33. Bertaux B, Hornebeck W, Eisen AZ, Dubertret L (1991). Growthstimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Invest Dermatol* 97:679-685.
34. Zhao WQ, Li H, Yamashita K, Guo XK, Hoshino T, Yoshida S, et al. (1998). Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1

(TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *J Cell Sci* 111(Pt 9):1147-1153.

35. Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A (1994). Cell growthpromoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci* 107(Pt 9):2373-2379.

36. Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, et al. (2003). TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell* 114:171-180.

37. Imren S, Kohn DB, Shimada H, Blavier L, DeClerck YA (1996). Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by retroviralmediated gene transfer in vivo inhibits tumor growth and invasion. *Cancer Res* 56:2891-2895.

38. Montgomery AMP, Mueller BM, Reisfeld RA, Taylor SM, DeClerck YA (1994). Effect of tissue inhibitor of the matrix metalloproteinases-2 expression on the growth and spontaneous metastasis of a humanmelanoma cell-line. *Cancer Res* 54:5467-5473.

39. Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG (1993). Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol* 157:351-358.

40. Guedez L, Courtemanch L, Stetler-Stevenson M (1998a). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and anantiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood* 92:1342- 1349.

41. Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A, et al. (1998b). In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 102:2002-2010.

42. Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, et al. (1998). TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* 75:246-253.

43. Jomary C, Neal MJ, Jones SE (1995). Increased expression of retinal TIMP3 mRNA in simplex retinitis pigmentosa is localized to photoreceptorretaining regions. *J Neurochem* 64:2370-2373.
44. Jones SE, Jomary C, Neal MJ (1994). Expression of TIMP3 mRNA is elevated in retinas affected by simplex retinitis pigmentosa. *FEBS Lett* 352:171-174.
45. Schwartz SB, Aleman TS, Cideciyan AV, Swaroop A, Jacobson SG, Stone EM (2003). De novo mutation in the RP1 gene (Arg677ter) associated with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:3593-3597.
46. Smith MR, Kung H, Durum SK, Colburn NH, Sun Y (1997). TIMP 3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine* 9:770-780.
47. Tummalapalli CM, Heath BJ, Tyagi SC (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 instigates apoptosis in transformed cardiac fibroblasts. *J Cell Biochem* 80:512-521.
48. Guo YH, Gao W, Li Q, Li PF, Yao PY, Chen K (2004). Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 suppresses vascular smooth muscle cell migration and induces cell apoptosis. *Life Sci* 75:2483-2493.
49. Andreini C, Banci L, Bertini I, Elmi S, Rosato A (2005). Comparative analysis of the ADAM and ADAMTS families. *J Proteome Res* 4:881- 888.
50. Handsley MM, Edwards DR (2005). Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 115:849-860.
51. Overall CM (2004). Dilating the degradome: matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) cuts to the heart of the matter. *Biochem J* 383:e5-e7.
52. Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST (1999). Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 85:906-911.

53. Martínez A, Oh HR, Unsworth EJ, Bregonzio C, Saavedra JM, Stetler-Stevenson WG, et al. (2004). Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem J* 383(Pt 3):413-418.
54. Arthur MJP, Friedman SL, Roll FJ, and Bissell DM. Lipocytes from normal rat liver release a neutral metalloproteinase that degrades basement membrane (type IV) collagen. *J Clin Invest* 84: 1076–1085, 1989.
55. Benyon RC, Hovell CJ, Gaca MDA, Jones EH, Iredale JP, and Arthur MJP. Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. *Hepatology* 30: 977–986, 1999.
56. Theret N, Lehti K, Musso O, and Clement B. MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology* 30: 462–468, 1999.
57. Takahara T, Furui K, Funaki J, Nakayama Y, Itoh H, Miyabayashi C, Sato H, Seiki M, Ooshima A, and Watanabe A. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology* 21: 787–795, 1995.
58. Takahara T, Furui K, Yata Y, Jin B, Zhang LP, Nambu S, Sato H, Seiki M, and Watanabe A. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. *Hepatology* 26: 1521–1529, 1997.
59. Winwood PJ, Schuppan D, Iredale JP, Kawser CA, Docherty AJP, and Arthur MJP. Kupffer cell-derived 95 kDa type IV collagenase/gelatinase B: Characterisation and expression in cultured cells. *Hepatology* 22: 304–315, 1995.
60. Xidakis C, Ljumovic D, Manousou P, Notas G, Valatas V, Kolios G, Kouroumalis E. Production of pro- and anti-fibrotic agents by rat Kupffer cells; the effect of octreotide. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 935-941

61. Leyland H, Gentry J, Arthur MJP, and Benyon RC. The plasminogen activating system in hepatic stellate cells. *Hepatology* 24: 1172–1178, 1996.
62. Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS, Urbanski LS, Stabbler AL, Zhang CL, Phillips BW, Zhang Y, and Urbanski SJ. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am J Pathol* 153: 1895–1902, 1998.
63. Herbst H, Heinrichs O, Schuppan D, Milani S, and Stein H. Temporal and spatial patterns of transin/stromelysin RNA expression following toxic injury in rat liver. *Virchows Arch* 60: 295–300, 1991.
64. Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJP, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Clark N, and Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 24: 176–184, 1996.
65. Iredale JP, Goddard S, Murphy G, Benyon RC, and Arthur MJP. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and interstitial collagenase expression in autoimmune chronic active hepatitis and activated human hepatic lipocytes. *Clin Sci (Colch)* 89: 75–81, 1995.
66. Iredale JP, Murphy G, Hembry RM, Friedman SL, and Arthur MJP. Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1): Implications for regulation of matrix degradation in liver. *J Clin Invest* 90: 282–287, 1992.
67. Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, and Arthur MJP. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases- 1 and -2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 110: 821–831, 1996.
68. Herbst H, Wege T, Milani S, Pellegrini G, Orzechowski HD, Bechstein WO, Neuhaus P, Gressner AM, and Schuppan D. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 150: 1647–1659, 1997.



69. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, and Arthur MJP. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis: hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 102: 538–549, 1998.
70. Hironaka K, Sakaida I, Matsumura Y, Kaino S, Miyamoto K, and 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* 267: 290–295, 2000.
71. Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A, and Stetler-Stevenson M. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 102: 2002–2010, 1998.
72. Li GY, Fridman R, and Kim HRC. Tissue inhibitor of metalloproteinase- 1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res* 59: 6267–6275, 1999.
73. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, and Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 272: 2446–2451, 1997.
74. Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, and Birkedal-Hansen H. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 99: 81–92, 1999.
75. Kerkvliet EH, Docherty AJ, Beertsen W, and Everts V. Collagen breakdown in soft connective tissue explants is associated with the level of active gelatinase A (MMP-2) but not with collagenase. *Matrix Biol* 18: 373–380, 1999.

## 3. ΑΚΤΙΒΙΝΗ

### 3.1. Δομή και λειτουργία

Ο όρος ακτιβίνη εισήχθη στην επιστημονική βιβλιογραφία το 1986, όταν μία διμερής πρωτεΐνη απομονώθηκε από το υγρό του ωθυλακίου του χοίρου, αποτελούμενη από δύο υπομονάδες β της προηγουμένως ταυτοποιημένης ινχιμπίνης, βρέθηκε ότι διεγείρει την έκκριση της ωθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) από τα κύτταρα της υπόφυσης [1].

Η ινχιμπίνη, αναστολέας της έκκρισης της FSH από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, είχε καθαρθεί και χαρακτηριστεί ακριβώς έναν χρόνο πριν ως διμερές αποτελούμενο από μία υπομονάδα α και από μία από τις υπομονάδες β, βΑ ή βΒ [2-5].

Η ύπαρξη ενός ρυθμιστή αρνητικής ανατροφοδότης της λειτουργίας της υπόφυσης, προερχόμενου από τις γονάδες, είχε γίνει αποδεκτή το 1923 από τους Mottram και Cramer [6] και το 1932 του δόθηκε πλέον, από τον McCullagh, η ονομασία ινχιμπίνη [7].

Πολύ σύντομα μετά την απομόνωσή τους έγινε κατανοητό ότι οι δύο υπομονάδες β (βΑ και βΒ) και η μία υπομονάδα α, που κωδικοποιούνται από γονίδια των θηλαστικών, μπορούν να σχηματίσουν δύο διαφορετικούς τύπους ινχιμπίνης που ονομάστηκαν ινχιμπίνη Α (α:βΑ) και ινχιμπίνη Β (α:βΒ), καθώς και τρεις διαφορετικές ακτιβίνες, ακτιβίνη Α (βΑ:βΑ), ακτιβίνη Β (βΒ:βΒ) και ακτιβίνη ΑΒ (βΑ:βΒ).

Μερικά χρόνια αργότερα δύο ακόμη υπομονάδες β, η βC και η βE ανακαλύφθηκαν στα θηλαστικά [8-12] ενώ περιγράφηκε και η υπομονάδα βD σε Xenopus [13].

Όπως και σε άλλα μέλη της οικογένειας TGF-β, οι δύο υπομονάδες που σχηματίζουν τις ακτιβίνες και τις ινχιμπίνες είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες με έναν μονό δισουλφιδικό δεσμό.

Όλες οι υπομονάδες β καθώς και η υπομονάδα α παράγονται ως πρόδρομες μορφές μεταξύ 350 και 420 αμινοξέων.

Ο Ν-τελικός προεπίτοπος αφαιρείται για να απελευθερώσει τα ώριμα πεπτίδια που κυμαίνονται από 112 έως 134 αμινοξέα.

Ο διμερισμός και η επεξεργασία της ακτιβίνης πραγματοποιείται ενδοκυττάρια πριν την απελευθέρωση της [14].

Η ακτιβίνη εκκρίνεται ως διμερές βιοενεργό πεπτίδιο , σε αντίθεση με τον TGF-β1 ο οποίος εκκρίνεται σε λανθάνουσα μορφή [15].

Αναλύσεις της ιστικής έκφρασης των υπομονάδων της ακτιβίνης ανέδειξαν ότι οι υπομονάδες βΑ και βΒ εκφράζονται σε περισσότερους ιστούς και τύπους κυττάρων [10,16] ενώ οι υπομονάδες βC και βE παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης στο ήπαρ και σχεδόν μέτρια επίπεδα σε περιορισμένο αριθμό άλλων κυττάρων και οργάνων [8,10,11,17-19].

Απ' όλες τις ακτιβίνες, η ακτιβίνη Α έχει μελετηθεί εκτενέστερα.

Έχει διαπιστωθεί ότι κατέχει σημαντικό ρόλο σ' έναν αριθμό βιολογικών λειτουργιών όπως, επουλωτική αντίδραση, ίνωση, συστηματική φλεγμονή, επαγωγή κυτταρικού θανάτου, βιολογία της αναπαραγωγής και των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, και διαφοροποίηση της ερυθροειδούς σειράς [20-28].

Ποντίκια με έλλειψη της βΑ υποομάδας παρουσιάζουν ελάττωμα στην ανάπτυξη του προσωπικού κρανίου και πεθαίνουν σύντομα μετά την γέννηση τους [29] ενώ ποντίκια με έλλειψη της υποομάδας βΒ εμφανίζουν ελάττωμα στην ανάπτυξη των βλεφάρων και δυσλειτουργία στην αναπαραγωγή των θηλέων, αλλά εν τούτοις είναι βιώσιμα [30].

Στα ποντίκια με έλλειψη και των δύο υπομονάδων, βΑ και βΒ, τα ελαττώματα στην ανάπτυξη είναι προσθετικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα γονίδια βΑ και βΒ έχουν χαμηλή λειτουργική ενεργότητα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη [29].

Περιορισμένες είναι οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την λειτουργικότητα των υπομονάδων βC και βE. Η αφαίρεση των γονιδίων της κάθε υποομάδας ή και των δύο μαζί οδηγούν σε μη εμφανή ελαττώματα [31].

### **3.2. Υποδοχείς ακτιβίνης και ενδοκυττάρια μεταβίβαση πληροφορίας**

Η μεταβίβαση των ενδοκυτταρίων σημάτων της ακτιβίνης-Α όπως και των άλλων μελών της TGF-β οικογένειας, πραγματοποιείται μέσω δύο τύπων διαμεμβρανικών υποδοχέων σερίνης-θρεονίνης κινάσης, που ονομάζονται υποδοχείς ακτιβίνης

τύπου I και τύπου II [32] και οι οποίοι σε μεγάλο βαθμό είναι κοινοί για διαφορετικά μέλη της TGF- $\beta$  οικογένειας.

Μέχρι σήμερα, στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί επτά τύπου I υποδοχείς, οι ALKs 1-7 (activin receptor-like kinases ) και πέντε τύπου II υποδοχείς, οι T $\beta$ R-II, ActR-II, ActR-IIB, BMPR-II, AMHR-II [33].

Η ακτιβίνη A δρα κυρίως μέσω των υποδοχέων ALK-4 (επίσης ονομαζόμενος και ActR-IB), ActR-IIB, και ActR-II αλλά, με 3-4 φορές χαμηλότερη συγγένεια.

Η ακτιβίνη-A αρχικά συνδέεται στον τύπου II υποδοχέα, ο οποίος με την σειρά του στρατολογεί και φωσφορυλιώνει τον τύπου I υποδοχέα [34].

Οι φωσφορυλιωμένοι υποδοχείς, αναγνωρίζονται από ενδοκυττάριους μεσολαβητές που ονομάζονται Smads, οι οποίοι μεταβιβάζουν την σηματοδότηση από την ακτιβίνη στον πυρήνα [32].

Οι Smads ταξινομούνται στους Smads υποδοχείς (Smads 1, 2, 3, 5 και 8) στον κοινό μεσολαβητή Smad (Smad 4) και στους καταστολείς Smads (Smads 6 και 7).

Οι υποδοχείς της ακτιβίνης A καθώς και των TGF- $\beta$  στρατολογούν και φωσφορυλιώνουν τους υποδοχείς Smads 2 και 3, ενώ οι υποδοχείς Smads 1, 5 και 8 στρατολογούνται και φωσφορυλιούνται από τους BMP υποδοχείς [35].

Πολλές λειτουργίες της ακτιβίνης έχει αποδειχθεί ότι εξαρτώνται από την διαβιβαστική οδό μέσω των Smads.

Έχει αποδειχθεί για παράδειγμα ότι η από την ακτιβίνη επαγωγή της απόπτωσης και καταστολή της αύξησης των κυτταρικών σειρών του ηπατώματος, HepG2 και Hep3B μπορεί να ανασταλεί από την έκφραση των Smads 2 και 3, αντίστοιχα [36,37].

Ομοίως η επαγωγή των λιπιδωφωσφατασών SHIP από την ακτιβίνη-A εξαρτάται από τους Smads 2,3 και 4 [38].

Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα οι ακτιβίνες B και AB, σε αντίθεση με την ακτιβίνη A, προτιμούν τον τύπου I υποδοχέα ALK-7 [39], ενώ άγνωστοι παραμένουν οι υποδοχείς για τις υπομονάδες  $\beta$ C και  $\beta$ e της ακτιβίνης C και E.

Η ινχιμπίνη έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με τους τύπου II υποδοχείς μέσω των  $\beta$  υπομονάδων της . Καθώς όμως η  $\alpha$  υπομονάδα δεν έχει την ικανότητα σύνδεσης με τους τύπου I υποδοχείς η σηματοδότηση είναι κατασταλαμμένη [40].

### **3.3. Ο ρόλος της ακτιβίνης στην ηπατική φλεγμονή και ίνωση**

Προ- και αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα έχουν περιγραφεί από την δράση της ακτιβίνης-A.

Κατά την διάρκεια της συστηματικής φλεγμονής δρα ταχέως, καταστέλλοντας την οξεία φάση της αντίδρασης ενώ μπορεί να ανταγωνιστεί και την δράση της ιντερλευκίνης 6 [21].

Αντιφλεγμονώδες αποτέλεσμα έχει παρατηρηθεί και με την ακτιβίνη-C. Επώαση των πρωτογενών ηπατοκυττάρων του ποντικού με ανθρώπινη ανασυνδυασμένη ακτιβίνη C ανέδειξε μεταβολές πρωτεϊνών σύμφωνες με την καταστολή της οξείας φάσης της αντίδρασης.

Οι αναλογίες σύνθεσης του T-κινινογόνου της β και γ αλύσου του ινωδογόνου και της φετουΐνης A ήταν μειωμένες, ενώ της τρανσθυρετίνης, της αλβουμίνης και της απολιποπρωτεΐνης A-1 ήταν αυξημένες [41].

Η σηματοδότηση από την ακτιβίνη εμπλέκεται στην ιστική επιδιόρθωση και ίνωση σε πολλά όργανα, συμπεριλαμβανομένων του δέρματος, των πνευμόνων, του παγκρέατος και των νεφρών [22].

Έτσι, ένας μεγάλος αριθμός παρατηρήσεων καταμαρτυρεί τον σημαντικό ρόλο της ακτιβίνης στην διαδικασία της ηπατικής φλεγμονής και της ηπατικής ίνωσης οι οποίες είναι στενά συνδεδεμένες.

Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων βA, βC και βE της ακτιβίνης αυξάνονται κατά την διάρκεια ηπατικής ίνωσης από τετραχλωράνθρακα και έχουν εμπλοκή στην καταστροφή των ηπατοκυττάρων και στην αυξημένη παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας [42-45].

Επίσης αυξημένη έκφραση της υπομονάδας βA παρατηρείται στην ηπατική ίνωση και κίρρωση, προκαλούμενη από την ενέσιμη χορήγηση διμεθυλονιτροσαμίνης ή ορού χοίρου σε ποντίκια [46].

Η ηπατική έκφραση της υπομονάδας βE διεγείρεται κατά την διάρκεια της επώασης με βακτηριακή λιποπολυσακχαρίδη (LPS) [11].

Η ακτιβίνη A έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί τα μακροφάγα [47,48] και επάγει την σύνθεση της α-SMA, της φιμπρονεκτίνης και του κολλαγόνου τύπου I στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα [46,49,50], ενώ ενεργοποιημένα αστεροειδή με την σειρά τους εκφράζουν αυξημένα επίπεδα ακτιβίνης A [42,51].

Η χορήγηση εξωγενούς φολιστατίνης, πρωτεΐνης η οποία συνδέει την ακτιβίνη και περιορίζει την διαθεσιμότητα της, σε ποντίκια στα οποία χορηγείται CCL4, εξασθενεί τον σχηματισμό ινωτικού ιστού στο ήπαρ [51].

Αυξημένα επίπεδα ακτιβίνης-A στον ορό έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνια ιογενή ηπατίτιδα ή αλκοολική κίρρωση του ήπατος [52-54].

Οι Lee et al. απέδειξαν ότι η υπέρ ενεργοποίηση της ενδοκυττάριας οδού των Smad λόγω αλληλεπίδρασης της ογκοπρωτεΐνης X του HBV με τον Smad 4, συνεισφέρει στην από τον HBV προαγόμενη ηπατική ίνωση [55].

### **3.4. Ο ρόλος της ακτιβίνης στην ηπατική ανεπάρκεια**

Η οξεία ηπατική ανεπάρκεια χαρακτηρίζεται από μαζική ηπατική βλάβη και ανεπαρκή αναγέννηση [56].

Οι αιτιολογικοί παράγοντες ποικίλουν και περιλαμβάνουν φάρμακα, αυτοάνοσα νοσήματα και την επίδραση των ιών [57].

Τα επίπεδα της ακτιβίνης A και της φολιστατίνης στον ορό, έχει βρεθεί ότι αυξάνονται στους ασθενείς με οξεία ηπατική ανεπάρκεια οφειλόμενη σε τοξικότητα από παρακεταμόλη και στην non-A non-E ηπατίτιδα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αύξηση της παραγωγής ακτιβίνης A μπορεί να επιβαρύνει την ηπατική αναγέννηση [58].

Οι Lin et al. [59] έχουν πρόσφατα δημοσιεύσει ότι η μείωση του λόγου φολιστατίνη/ακτιβίνη-A στο αίμα μπορεί να αποτελέσει δείκτη σοβαρότητας της οξείας ηπατικής βλάβης.

### **3.5. Ο ρόλος της ακτιβίνης στον καρκίνο του ήπατος**

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η ακτιβίνη-A συνεισφέρει στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καταστέλλοντας την κατά την μείωση επαγόμενη DNA σύνθεση και την κυτταρική αύξηση ενώ επάγει και την απόπτωση σε πολλά επιθηλιακά κύτταρα συμπεριλαμβανομένων και των ηπατοκυττάρων με αποτέλεσμα να θεωρείται και καταστολέας του όγκου [60] αφού παθοφυσιολογικά η απορρύθμιση του αυξητικού ελέγχου θεωρείται το σημείο κλειδί για την ανάπτυξη του όγκου [61].

Αυξημένα επίπεδα ακτιβίνης-A και φολιστατίνης έχουν βρεθεί στην κυκλοφορία ασθενών που πάσχουν από κίρρωση ήπατος και HCC [53,54,62].

Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ηπατώματος εκφράζουν φολιστατίνη αλλά έχουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων β της ακτιβίνης σε σχέση με τα φυσιολογικά ηπατοκύτταρα [63-65]. Η έκτοπη επανέκφραση των υπομονάδων της ακτιβίνης στα κύτταρα του ηπατώματος μειώνει τον αριθμό των κυττάρων και επάγει την απόπτωση [63,64].

Μελέτες υπαινίσσονται ότι η απορύθμιση της ισορροπίας μεταξύ της έκφρασης της ακτιβίνης και των ανταγωνιστών της συνεισφέρει στην αύξηση πλεονεκτικά των προνεοπλαστικών κυττάρων [66] ενώ σύμφωνα με κάποιες άλλες μελέτες τα κύτταρα των ηπατικών όγκων διαφεύγουν του αυξητικού ελέγχου από την ενδογενή ακτιβίνη, πιθανώς λόγω της υπέρ παραγωγής των ανταγωνιστών της ακτιβίνης [67]. Υπάρχουν λοιπόν εντυπωσιακά δεδομένα από ζωικά μοντέλα και συνεχώς αυξανόμενες πληροφορίες από δεδομένα ασθενών ότι η απορρύθμιση της σηματοδότησης από την ακτιβίνη μπορεί να είναι το κύριο γεγονός στην καρκινογένεση μέσω της διαφυγής των ηπατοκυττάρων από τον αυξητικό έλεγχο που πραγματοποιείται με την μεσολάβση της.

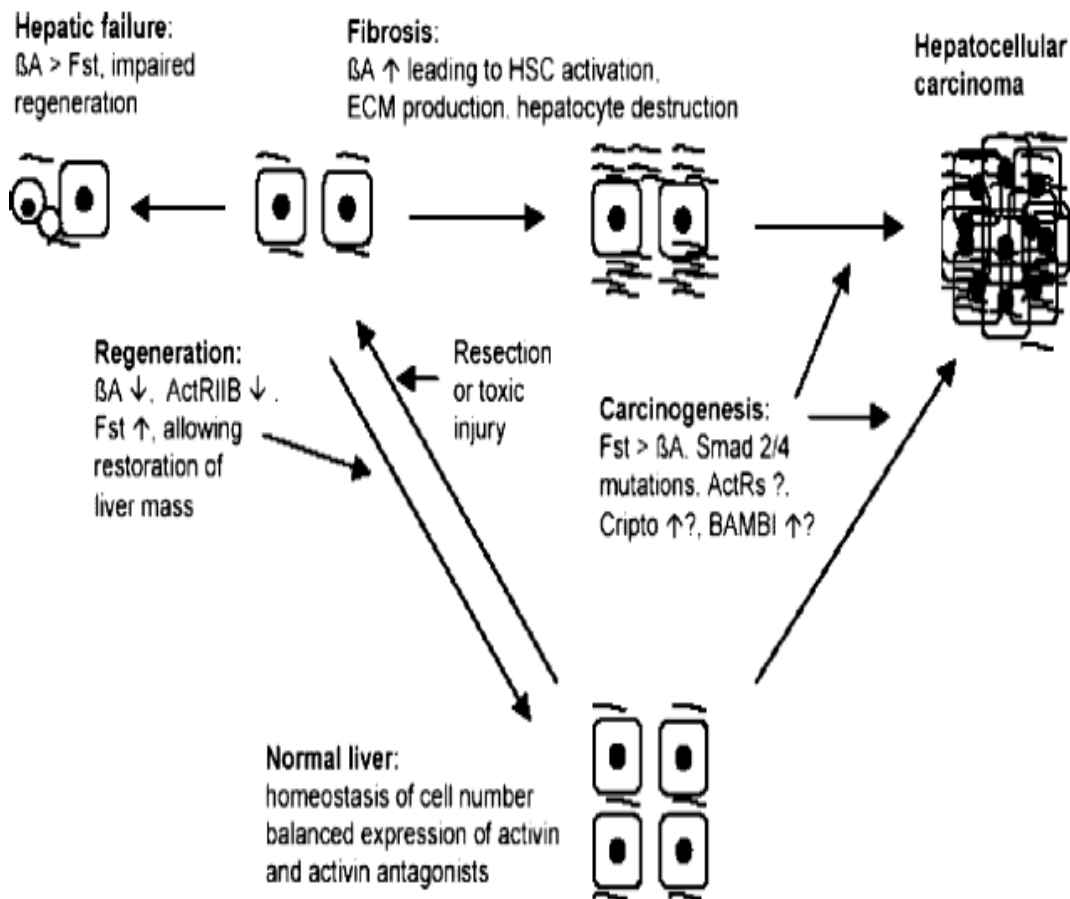
Επίσης, δεδομένου ότι η ανάπτυξη του HCC επισυμβαίνει κυρίως σε έδαφος χρόνιας ηπατικής βλάβης και φλεγμονής, η επίδραση της ακτιβίνης στις διαδικασίες αυτές συνεισφέρει επιπρόσθετα στην ανάπτυξη του HCC.

Πρόσφατα έχει όμως δημοσιευτεί ότι η ακτιβίνη επάγει την έκφραση του VEGF (vascular endothelial growth factor) σε σειρές κυττάρων ανθρώπινου ηπατώματος [68], γεγονός που υποδηλώνει ότι η ακτιβίνη έχει δυνητικά προ-αγγειογενετικό ρόλο στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο και άρα η παρουσία της ευνοεί την ανάπτυξη του ΗΚΚ

Δεδομένων λοιπόν των αντιφατικών πληροφοριών, επιτακτική είναι η ανάγκη για εκτεταμένες αναλύσεις σε ανθρώπινους ηπατικούς όγκους με σκοπό να εξετασθούν οι αλλαγές έκφρασης και οι μεταλλαγές των υπομονάδων, των ανταγωνιστών και των υποδοχέων της ακτιβίνης καθώς και των ενδοκυττάρων ρυθμιστών.

Μεταλλαγές των τύπου I ή τύπου II υποδοχέων της ακτιβίνης, για παράδειγμα, έχουν ανακαλυφθεί στον καρκίνο του παγκρέατος και του παχέος εντέρου [69,70] αλλά δεν έχουν αναλυθεί στην περίπτωση του ηπατοκυτταρικού καρκίνου, ενώ ανενεργείς μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν τις Smad2 ή 4, οι οποίες

μεταβιβάζουν την σηματοδότηση από την ακτιβίνη-A καθώς και από τον TGF- $\beta$  έχουν ανακαλυφθεί στο 10% των δειγμάτων των ανθρώπινων ηπατωμάτων [71]. Τελικά ο άξονας της ακτιβίνης έχει σημαντικό και σύνθετο ρόλο στην βιολογία του ήπατος και στην παθογένεια κάποιων ηπατικών βλαβών συμπεριλαμβανομένων της ηπατικής ανεπάρκειας, φλεγμονής, ίνωσης και καρκινογένεσης [Εικόνα 1].



**Εικόνα 1.** Υποθετικό μοντέλο του ρόλου του άξονα της ακτιβίνης στο φυσιολογικό ήπαρ, στην ηπατική ανεπάρκεια, στην αναγέννηση, στην ίνωση και στην καρκινογένεση. Στο φυσιολογικό ήπαρ η ισορροπημένη έκφραση της ακτιβίνης A και των ανταγωνιστών της εξυπηρετεί στην διατήρηση του αριθμού κυττάρων & της ιστικής αρχιτεκτονικής. Η απορύθμιση της ισορροπίας πιθανόν να οδηγεί σε μειωμένη αναγέννηση, αυξημένη παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας, μη ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό κυττάρων, χαρακτηριστικά της ηπατικής ανεπάρκειας, ίνωσης και καρκινογένεσης αντίστοιχα.  $\uparrow$  = επαγωγή,  $\downarrow$  = καταστολή, Fst = φολιστατίνη,  $\beta A$  = υπομονάδα ακτιβίνης  $\beta A$ . *Mutation Research 132 613 (2006) 123–137.*



### **3.6. Βιβλιογραφία**

1. N. Ling, S.Y. Ying, N. Ueno, S. Shimasaki, F. Esch, M. Hotta, R. Guillemin, Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin, *Nature* 321 (1986) 779–782.
2. N. Ling, S.Y. Ying, N. Ueno, F. Esch, L. Denoroy, R. Guillemin, Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (1985) 7217–7221.
3. D.M. Robertson, L.M. Foulds, L. Leversha, F.J. Morgan, M.T. Hearn, H.G. Burger, R.E. Wettenhall, D.M. de Kretser, Isolation of inhibin from bovine follicular fluid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126 (1985) 220–226.
4. K. Miyamoto, Y. Hasegawa, M. Fukuda, M. Nomura, M. Igarashi, K. Kangawa, H. Matsuo, Isolation of porcine follicular fluid inhibin of 32k daltons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129 (1985) 396–403.
5. J. Rivier, J. Spiess, R. McClintock, J. Vaughan, W. Vale, Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133 (1985) 120–127. C. Rodgarkia-Dara et al. / *Mutation Research* 132 613 (2006) 123–137
6. C. Mottram, W. Cramer, On the general aspects of exposure to radium on metabolism and tumour growth in the rat and the special effects on the testis and pituitary, *Quart. J. Exp. Physiol.* 13 (1923) 209–229.
7. D. McCullagh, Dual endocrine activity of testes, *Science* 76 (1932) 19–22.
8. O. Hashimoto, K. Tsuchida, Y. Ushiro, Y. Hosoi, N. Hoshi, H. Sugino, Y. Hasegawa, cDNA cloning and expression of human activin betaE subunit, *Mol. Cell Endocrinol.* 194 (2002) 117–122.

9. G. Hoetten, H. Neidhardt, C. Schneider, J. Pohl, Cloning of a new member of the TGF-beta family: a putative new activin beta C chain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206 (1995) 608–613.
10. S. Vejda, M. Cranfield, B. Peter, S.L. Mellor, N. Groome, R. Schulte-Hermann, W. Rossmanith, Expression and dimerization of the rat activin subunits betaC and betaE: evidence for the formation of novel activin dimers, *J. Mol. Endocrinol.* 28 (2002) 137–148.
11. M.K. O'Bryan, K.L. Sebire, O. Gerdprasert, M.P. Hedger, M.T. Hearn, D.M. de Kretser, Cloning and regulation of the rat activin betaE subunit, *J. Mol. Endocrinol.* 24 (2000) 409–418.
12. J. Fang, W. Yin, E. Smiley, S.Q. Wang, J. Bonadio, Molecular cloning of the mouse activin beta E subunit gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228 (1996) 669–674.
13. S. Oda, S. Nishimatsu, K. Murakami, N. Ueno, Molecular cloning and functional analysis of a new activin beta subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in *Xenopus*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210 (1995) 581–588.
14. A.M. Gray, A.J. Mason, Requirement for activin A and transforming growth factor—beta 1 pro-regions in homodimer assembly, *Science* 247 (1990) 1328–1330.
15. V. Todorovic, V. Jurukovski, Y. Chen, L. Fontana, B. Dabovic, D.B. Rifkin, Latent TGF-beta binding proteins, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 38–41.
16. T. Tuuri, M. Eramaa, K. Hilden, O. Ritvos, The tissue distribution of activin beta A- and beta B-subunit and follistatin messenger ribonucleic acids suggests multiple sites of action for the activin–follistatin system during human development, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78 (1994) 1521–1524.
17. E.J. Gold, M.K. O'Bryan, S.L. Mellor, M. Cranfield, G.P. Risbridger, N.P. Groome, J.S. Fleming, Cell-specific expression of betaC-activin in the rat reproductive tract, adrenal and liver, *Mol. Cell Endocrinol.* 222 (2004) 61–69.

18. J. Fang, S.Q. Wang, E. Smiley, J. Bonadio, Genes coding for mouse activin beta C and beta E are closely linked and exhibit a liver-specific expression pattern in adult tissues, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231 (1997) 655–661.
19. J. Schmitt, G. Hotten, N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, N.G. Copeland, J. Pohl, H. Schrewe, Structure, chromosomal localization, and expression analysis of the mouse inhibin/activin beta C (*Inhbc*) gene, *Genomics* 32 (1996) 358–366.
20. C. Welt, Y. Sidis, H. Keutmann, A. Schneyer, Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 227 (2002) 724–752.
21. K.L. Jones, D.M. de Kretser, S. Patella, D.J. Phillips, Activin A and follistatin in systemic inflammation, *Mol. Cell Endocrinol.* 225 (2004) 119–125.
22. S. Werner, C. Alzheimer, Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease, *Cytokine Growth Factor Rev.* 17 (2006) 157–171.
23. G.M. Beattie, A.D. Lopez, N. Bucay, A. Hinton, M.T. Firpo, C.C. King, A. Hayek, Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers, *Stem Cells* 23 (2005) 489–495.
24. N. McDowell, J.B. Gurdon, Activin as a morphogen in *Xenopus* mesoderm induction, *Semin. Cell Dev. Biol.* 10 (1999) 311–317.
25. D.J. Phillips, K.L. Jones, I.J. Clarke, J.P. Scheerlinck, D.M. de Kretser, Activin A: from sometime reproductive factor to genuine cytokine, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108 (2005) 23–27.
26. D.M. de Kretser, M.P. Hedger, K.L. Loveland, D.J. Phillips, Inhibins, activins and follistatin in reproduction, *Hum. Reprod. Update* 8 (2002) 529–541.
27. V. Maguer-Satta, L. Bartholin, S. Jeanpierre, M. Ffrench, S. Martel, J.P. Magaud, R. Rimokh, Regulation of human erythropoiesis by activin A, BMP2, and BMP4, members of the TGFbeta family, *Exp. Cell Res.* 282 (2003) 110–120.

28. Y.G. Chen, Q. Wang, S.L. Lin, C.D. Chang, J. Chung, S.Y. Ying, Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 231 (2006) 534–544.
29. M.M. Matzuk, T.R. Kumar, A. Vassalli, J.R. Bickenbach, D.R. Roop, R. Jaenisch, A. Bradley, Functional analysis of activins during mammalian development, *Nature* 374 (1995) 354–356.
30. A. Vassalli, M.M. Matzuk, H.A. Gardner, K.F. Lee, R. Jaenisch, Activin/inhibin beta B subunit gene disruption leads to defects in eyelid development and female reproduction, *Genes Dev.* 8 (1994) 414–427.
31. A.L. Lau, T.R. Kumar, K. Nishimori, J. Bonadio, M.M. Matzuk, Activin betaC and betaE genes are not essential for mouse liver growth, differentiation, and regeneration, *Mol. Cell Biol.* 20 (2000) 6127–6137.
32. Y. Abe, T. Minegishi, P.C. Leung, Activin receptor signaling, *Growth Factors* 22 (2004) 105–110.
33. A. Herpin, C. Lelong, P. Favrel, Transforming growth factorbeta- related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans, *Dev. Comp. Immunol.* 28 (2004) 461–485.
34. L. Attisano, J.L. Wrana, E. Montalvo, J. Massague, Activation of signalling by the activin receptor complex, *Mol. Cell Biol.* 16 (1996) 1066–1073.
35. C.H. Heldin, K. Miyazono, P. ten Dijke, TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus throughSMADproteins, *Nature* 390 (1997) 465–471.
36. C. Kanamaru, H. Yasuda, T. Fujita, Involvement of Smad proteins in TGF-beta and activin A-induced apoptosis and growth inhibition of liver cells, *Hepatol. Res.* 23 (2002) 211–219.
37. W. Chen, T.K. Woodruff, K.E. Mayo, Activin A-induced HepG2 liver cell apoptosis: involvement of activin receptors and smad proteins, *Endocrinology* 141 (2000) 1263–1272.

38. H. Valderrama-Carvajal, E. Cocolakis, A. Lacerte, E.H. Lee, G. Krystal, S. Ali, J.J. Lebrun, Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 963–969.
39. K. Tsuchida, M. Nakatani, N. Yamakawa, O. Hashimoto, Y. Hasegawa, H. Sugino, Activin isoforms signal through type I receptor serine/threonine kinase ALK7, *Mol. Cell Endocrinol.* 220 (2004) 59–65.
40. R.W. Cook, T.B. Thompson, T.S. Jardetzky, T.K. Woodruff, Molecular biology of inhibin action, *Semin. Reprod. Med.* 22 (2004) 269–276.
41. N. Erlach, C. Drucker, O. Teufelhofer, S. Vejda, B. Grasl-Kraupp, J. Pohl, R. Schulte-Hermann, M. Grusch, C. Gerner, Activin C has anti-inflammatory properties in rat hepatocytes, in preparation.
42. P.J. De Bleser, T. Niki, G. Xu, V. Rogiers, A. Geerts, Localization and cellular sources of activins in normal and fibrotic rat liver, *Hepatology* 26 (1997) 905–912.
43. E.J. Gold, R.J. Francis, A. Zimmermann, S.L. Mellor, M. Cranfield, G.P. Risbridger, N.P. Groome, A.M. Wheatley, J.S. Fleming, Changes in activin and activin receptor subunit expression in rat liver during the development of CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis, *Mol. Cell Endocrinol.* 201 (2003) 143–153.
44. X. Huang, D.G. Li, Z.R. Wang, H.S. Wei, J.L. Cheng, Y.T. Zhan, X. Zhou, Q.F. Xu, X. Li, H.M. Lu, Expression changes of activin A in the development of hepatic fibrosis, *World J. Gastroenterol.* 7 (2001) 37–41.
45. X. Huang, D. Li, H. Lu, Z.Wang, H.Wei, Y.Wang, J. Zhang, Q. Xu, Expression of activins, follistatin mRNA in the development of hepatic fibrosis, *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 10 (2002) 85–88.
46. M. Sugiyama, T. Ichida, T. Sato, T. Ishikawa, Y. Matsuda, H. Asakura, Expression of activin A is increased in cirrhotic and fibrotic rat livers, *Gastroenterology* 114 (1998) 550–558.

47. R.M. Nusing, J. Barsig, Induction of prostanoid, nitric oxide, and cytokine formation in rat bone marrow derived macrophages by activin A, *Br. J. Pharmacol.* 127 (1999) 919–926.
48. X.J. Zhang, Y. Li, G.X. Tai, G.Y. Xu, P.Y. Zhang, Y. Yang, F.X. Lao, Z.H. Liu, Effects of activin A on the activities of the mouse peritoneal macrophages, *Cell Mol. Immunol.* 2 (2005) 63–67.
49. M. Date, K. Matsuzaki, M. Matsushita, Y. Tahashi, K. Sakitani, K. Inoue, Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury, *J. Hepatol.* 32 (2000) 251–260.
50. W. Wada, H. Kuwano, Y. Hasegawa, I. Kojima, The dependence of transforming growth factor-beta-induced collagen production on autocrine factor activin A in hepatic stellate cells, *Endocrinology* 145 (2004) 2753–2759.
51. S. Patella, D.J. Phillips, J. Tchongue, D.M. de Kretser, W. Sievert, Follistatin attenuates early liver fibrosis: effects on hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290 (2006) G137–G144.
52. S. Patella, D.J. Phillips, D.M. de Kretser, L.W. Evans, N.P. Groome, W. Sievert, Characterization of serum activin-A and follistatin and their relation to virological and histological determinants in chronic viral hepatitis, *J. Hepatol.* 34 (2001) 576–583.
53. M.F. Yuen, S. Norris, L.W. Evans, P.G. Langley, R.D. Hughes, Transforming growth factor-beta 1, activin and follistatin in patients with hepatocellular carcinoma and patients with alcoholic cirrhosis, *Scand. J. Gastroenterol.* 37 (2002) 233–238.
54. Elsammak, M.Y., Amin, G.M., Khalil, G.M., Ragab, W.S., Abaza, M.M., 2006. Possible contribution of serum activin A and IGF-1 in the development of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients suffering from combined hepatitis C virus infection and hepatic schistosomiasis. *Clin. Biochem.*

55. D.K. Lee, S.H. Park, Y. Yi, S.G. Choi, C. Lee, W.T. Parks, H. Cho, M.P. de Caestecker, Y. Shaul, A.B. Roberts, S.J. Kim, The hepatitis B virus encoded oncoprotein pX amplifies TGF-beta family signaling through direct interaction with Smad4: potential mechanism of hepatitis B virus-induced liver fibrosis, *Genes Dev.* 15 (2001) 455–466.
56. D. Palmes, S. Skawran, H.U. Spiegel, Acute liver failure: from bench to bedside, *Transplant Proc.* 37 (2005) 1628–1631.
57. J.G. O’Grady, Acute liver failure, *Postgrad. Med. J.* 81 (2005) 148–154.
58. R.D. Hughes, L.W. Evans, Activin A and follistatin in acute liver failure, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15 (2003) 127–131.
59. S.D. Lin, T. Kawakami, A. Ushio, A. Sato, S. Sato, M. Iwai, R. Endo, Y. Takikawa, K. Suzuki, Ratio of circulating follistatin and activin A reflects the severity of acute liver injury and prognosis in patients with acute liver failure, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21 (2006) 374–380.
60. G.P. Risbridger, J.F. Schmitt, D.M. Robertson, Activins and inhibins in endocrine and other tumors, *Endocr. Rev.* 22 (2001) 836–858.
61. D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell* 100 (2000) 57–70.
62. M. Pirisi, C. Fabris, S. Luisi, M. Santuz, P. Toniutto, D. Vitulli, E. Federico, M. Del Forno, M. Mattiuzzo, B. Branca, F. Petraglia, Evaluation of circulating activin-A as a serum marker of hepatocellular carcinoma, *Cancer Detect. Prev.* 24 (2000) 150–155. C. Rodgarkia-Dara et al. / *Mutation Research* 136 613 (2006) 123–137
63. S. Vejda, N. Erlach, B. Peter, C. Drucker, W. Rossmannith, J. Pohl, R. Schulte-Hermann, M. Grusch, Expression of activins C and E induces apoptosis in human and rat hepatoma cells, *Carcinogenesis* 24 (2003) 1801–1809.

64. H. Mashima, M. Kanzaki, R. Nobusawa, Y.Q. Zhang, M. Suzuki, T. Mine, I. Kojima, Derangements in the activin– follistatin system in hepatoma cells, *Gastroenterology* 108 (1995) 834–840.
65. W. Rossmann, M. Chabicovsky, B. Grasl-Kraupp, B. Peter, E. Schausberger, R. Schulte-Hermann, Follistatin overexpression in rodent liver tumors: a possible mechanism to overcome activin growth control, *Mol. Carcinogen.* 35 (2002) 1–5.
66. M. Grusch, C. Drucker, B. Peter-Vörosmary, N. Erlach, A. Losert, W. Schneider, M. Hermann, N. Groome, W. Parzefall, B. Grasl-Kraupp, R. Schulte-Hermann, Deregulation of the activin–follistatin system in hepatocarcinogenesis, *J. Hepatol.*, 2006, doi:10.1016/j.jhep.2006.06.014.
67. M. Fuwii, M. Ishikawa, M. Iuchi, S. Tashiro, Effect of follistatin on rat liver regeneration and tumor growth after portal occlusion, *Hepatogastroenterology* 52 (2005) 833–838.
68. K. Wagner, M. Peters, A. Scholz, C. Benckert, H.S. Ruderisch, B. Wiedenmann, S. Rosewicz, Activin A stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human hepatocellular carcinoma cells, *Gastroenterology* 126 (2004) 1828–1843.
69. P.M. Hempen, L. Zhang, R.K. Bansal, C.A. Iacobuzio-Donahue, K.M. Murphy, A. Maitra, B. Vogelstein, R.H. Whitehead, S.D. Markowitz, J.K. Willson, C.J. Yeo, R.H. Hruban, S.E. Kern, Evidence of selection for clones having genetic inactivation of the activin A type II receptor (ACVR2) gene in gastrointestinal cancers, *Cancer Res.* 63 (2003) 994–999.
70. G.H. Su, R. Bansal, K.M. Murphy, E. Montgomery, C.J. Yeo, R.H. Hruban, S.E. Kern, ACVR1B (ALK4, activin receptor type 1B) gene mutations in pancreatic carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 3254–3257.
71. M.C. Yakicier, M.B. Irmak, A. Romano, M. Kew, M. Ozturk, Smad2 and 4 gene mutations in hepatocellular carcinoma, *Oncogene* 18 (1999) 4879–4883.



## 4. ΛΕΠΤΙΝΗ

Ο λιπώδης ιστός που άλλοτε εθεωρείτο μόνον όργανο αποθήκευσης ενέργειας, έχει αναδειχθεί τις τελευταίες δεκαετίες σε ενδοκρινικό όργανο αφού τα μεταβολικά παράγωγα του που ονομάζονται λιποκυτταροκίνες (adipokines), ασκούν τοπική, περιφερική και κεντρική δράση [1,2].

Η λεπτίνη που έχει μελετηθεί εκτενέστερα τα τελευταία χρόνια, πιθανώς να αντιπροσωπεύει μία από τις σημαντικότερες λιποκυτταροκίνες.

Πρόκειται για μία 16 KDa πρωτεΐνη, η οποία ανακαλύφθηκε το 1994, κυκλοφορεί στον ορό σε ελεύθερη μορφή ή συνδεδεμένη και κωδικοποιείται από το γονίδιο *ob/ob* [3,4].

Η ονομασία της προέρχεται από την ελληνική λέξη λεπτός δεδομένου ότι αρχικώς θεωρήθηκε ως μία ανορεξιογενής ορμόνη η οποία, μέσω των υποδοχών της στον υποθάλαμο, περιορίζει την λήψη τροφής και αυξάνει την κατανάλωση ενέργειας, με αποτέλεσμα την απώλεια σωματικού βάρους[5].

Σήμερα όμως γνωρίζουμε ότι υποδοχείς λεπτίνης υπάρχουν και σε περιφερικούς ιστούς όπως ήπαρ, πνεύμονες, νεφροί, πάγκρεας, επινεφρίδια, ωθήκες, αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και σκελετικοί μύες και με πρόσφατες μελέτες, σε ζωικά μοντέλα, έχει αποδειχθεί ότι η δράση της επεκτείνεται στο αιμοποιητικό σύστημα, στην αναπαραγωγή, στην ανάπτυξη, στην αγγειογένεση ενώ επίσης αναστέλλει την λιποτοξικότητα (συσσώρευση λίπους σε περιοχές εκτός λιπώδους ιστού) [6] και την λιπογένεση του ήπατος, μειώνοντας την έκφραση της SREBP-1, [7].

Επίσης η λεπτίνη εμπλέκεται στην επούλωση της ιστικής βλάβης και στην ινογένεση [8-10] και φαίνεται να έχει ανοσορυθμιστικό ρόλο, αφού είναι απαραίτητη για την ωρίμανση των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων [11,12].

Τα τελευταία χρόνια έμφαση δίνεται στον σημαντικό ρόλο της λεπτίνης στην πρόοδο της ηπατικής ίνωσης.

Διαφορετικοί τύποι κυττάρων εμπλέκονται στην αντίδραση του ήπατος στην βλάβη, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του Kupffer, των ενδοθηλιακών κυττάρων των

κολποειδών του ήπατος και των μυοϊνοβλαστών οι οποίοι παράγονται από την ενεργοποίηση των HSCs.

Τα κύτταρα του Kupffer και τα μακροφάγα όταν εκτίθενται στην λεπτίνη παρουσιάζουν αύξηση της δραστηριότητας της φαγοκυττάρωσης και της παραγωγής κυτταροκινών [13].

Κατά συνέπεια, η έλλειψη λεπτίνης σε πειραματόζωα οδηγεί σε καθυστέρηση της ηπατικής αναγέννησης εξ' αιτίας της μειωμένης έκφρασης των κυτταροκινών που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων [14].

Η επώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων με λεπτίνη διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση και επάγει την συσσώρευση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) και την έκκριση κυτταροκινών [15].

Οι Ikejima et al. δημοσίευσαν ότι η έκθεση των κυττάρων του Kupffer και των ενδοθηλιακών κυττάρων των κολποειδών, στην ανασυνδυασμένη λεπτίνη, μέσω των ObRb υποδοχέων, επάγει την έκφραση του TGF- $\beta$  [16].

Εξαιρετικά ενδιαφέρουσα είναι η επίδραση της λεπτίνης στα αστεροειδή κύτταρα. Τα HSC κατά την ενεργοποίησή τους, παράγουν λεπτίνη [17].

Μία μεγάλη σειρά επιτυχημένων μελετών απέδειξε ότι τα HSCs εκφράζουν ObRb υποδοχείς, μέσω των οποίων ανταποκρίνονται άμεσα στην δράση της λεπτίνης [Εικόνα 1]. Η έκφραση των υποδοχέων είναι μικρότερη στα εν ηρεμία HSCs ενώ αυξάνεται κατά την διάρκεια της διαδικασίας της ενεργοποίησης [18]. Το γεγονός αυτό μαρτυρεί ότι η δράση της λεπτίνης διευρύνεται στα ενεργοποιημένα HSCs.

Φαίνεται όμως ότι τα εν ηρεμία αστεροειδή κύτταρα δεν εκφράζουν λειτουργικό υποδοχέα Ob-Rb, σε αντίθεση με τα κύτταρα Kupffer και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών.

Πιστεύεται λοιπόν ότι η λεπτίνη του λιπώδους ιστού και εκείνη των αστεροειδών κυττάρων, δρα επί των κυττάρων του Kupffer με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή του TGF $\beta$  και την συνακόλουθη αύξηση του ινώδους ιστού [19].

Τα χαμηλά επίπεδα της λεπτίνης στα εν ηρεμία HSCs σχετίζονται και με την αυξημένη έκφραση της αδιπονεκτίνης, η οποία περιορίζει την ινογένεση [20] και μειώνεται σημαντικά κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης των HSCs [21].

Η επώαση των HSCs με ανασυνδυασμένη λεπτίνη διεγείρει το mRNA και την έκφραση της πρωτεΐνης του τύπου I προκολλαγόνου, αυξάνει την επίδραση του

TGF- $\beta$  και επάγει την έκφραση του TIMP-1, εμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό την διάσπαση του κολλαγόνου [18,22-24].

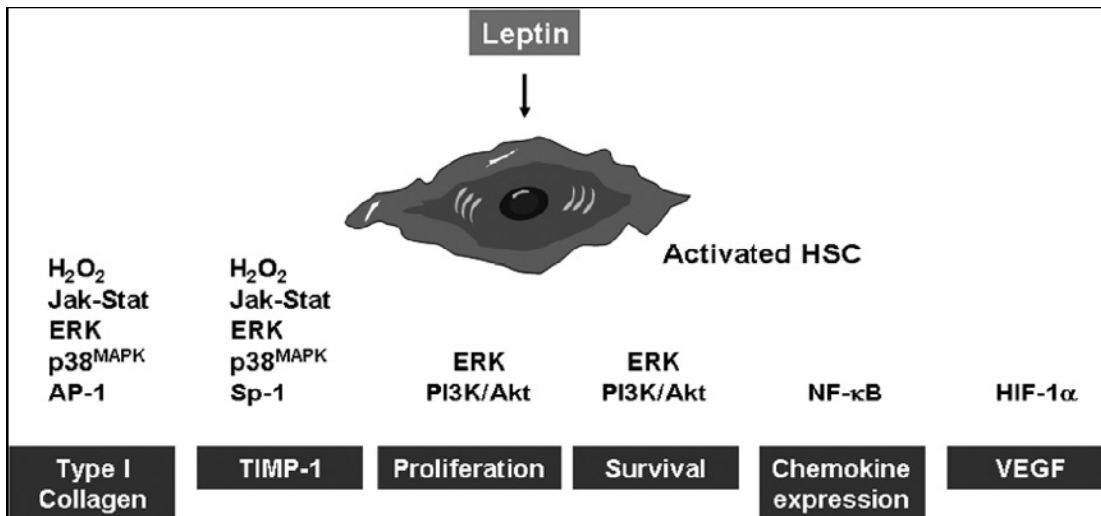
Σε κάποιους άλλους κυτταρικούς τύπους έχει αποδειχθεί ότι η λεπτίνη αυξάνει την έκφραση των MMPs [25], στοιχείο όμως που κρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Η λεπτίνη επάγει την μίτωση και την επιβίωση των ενεργοποιημένων HSCs και περιορίζει την απόπτωση τους, οδηγώντας έτσι στην αύξηση του αριθμού των ινογενετικών κυττάρων [26].

Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό των ενεργοποιημένων HSCs είναι η ικανότητα τους να επηρεάζουν την φλεγμονή μέσω της έκκρισης προ-φλεγμονωδών χημειοκινών (π.χ MCP-1), χαρακτηριστικό που ενισχύεται από την δράση της λεπτίνης μέσω της ενεργοποίησης του NF- $\kappa$ B [27].

Πρόσφατα αναγνωρισμένη δράση της λεπτίνης στα ινογενετικά κύτταρα είναι η επαγωγή του VEGF, ενός από τους ισχυρότερους υποκινητές της νέο-αγγείωσης [27]. Αυτή η παρατήρηση μπορεί δυνητικά να έχει αντίκτυπο στην ηπατική ίνωση, αφού ο σχηματισμός νέων αγγείων είναι το βασικό στοιχείο στην επουλωτική αντίδραση και θεωρείται ότι παίζει ρόλο στην μη αναστρεψιμότητα της εγκατεστημένης κίρρωσης. Θα μπορούσε επίσης να σημειωθεί ότι η λεπτίνη έχει και απ' ευθείας αγγειογενετική δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα [28].

Συμπερασματικά η λεπτίνη επάγει τις προ-ινοτικές, προ-φλεγμονώδεις και προ-αγγειογενετικές κυτταροκίνες που εμπλέκονται στον μηχανισμό της ηπατικής ινογένεσης.



**Εικόνα 1.** Τροποποίηση του φαινοτύπου των ενεργοποιημένων HSC από την λεπτίνη και ενδοκυττάρια οδοί που ενέχονται στην διεργασία αυτή. Η λεπτίνη δρα στα ενεργοποιημένα HSC διεγείροντας έναν αριθμό βιολογικών δράσεων (κουτιά). Οι μεταβολικοί οδοί και/ή οι μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται επίσης αναδεικνύονται. Τα δεδομένα προέρχονται από μελέτες σε καλλιιεργημένα ανθρώπινα και/ή από αρουραίους προερχόμενα HSC. *J. Hepatol.* 2007; 46 S 12–18.

## **Βιβλιογραφία**

1. Spiegelman EM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001; 104: 531-543.
2. Friedman JM. Obesity in the new millennium. *Nature* 2000; 404: 632-634.
3. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med* 1999; 130: 671-680.
4. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432.
5. Elmquist JK. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioural effects of leptin. *Physiol Behav* 2001; 74: 703-708.
6. Chitturi S, Farrell G, Frost L, et al. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002; 36: 403-409.
7. Kakuma T, Lee Y, Higa M, et al. Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element 1-binding proteins in liver and pancreatic islets. *J Clin Invest* 2000; 106: 8536-8541.
8. Frank S, Stallmeyer B, Kampfer H, et al. Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *J Invest Dermatol* 2000; 116: 501-509.
9. Ring BD, Scully S, Davis CR, et al. Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic and obese mice. *Endocrinology* 2000; 141: 446-449.
10. Ikejima K, Honda H, Yoshikawa M, et al. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology* 2001; 34: 288-297.

11. Lord GM, Matarese G, Howard JK, et al. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998; 394: 897-901.
12. Lee FY, U Y, et al. Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-deficient, obese mice. *Am J Physiol* 1999; 276: C386-C394
13. Diehl AM. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G1-G5.
14. Leclercq IA, Field J, Farrell GC. Leptin-specific mechanisms for impaired liver regeneration in ob/ob mice after toxic injury. *Gastroenterology* 2003;124:1451-1464.
15. Rahmouni K, Haynes WG. Endothelial effects of leptin: implications in health and diseases. *Curr Diab Rep* 2005;5:260-266.
16. 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;122:1399-1410.
17. Potter JJ, Womack L, Mezey E, Anania FA. Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:178-182
18. Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Friedman SL, Anania FA. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology* 2002; 35 : 762-771.
19. Ikejima k, Lang T, Zhang YJ, Yamashina S, Honda H et al. Expression of leptin receptors in hepatic sinusoidal cells. *Comp Hepatol* 2004, 3(suppl 1):S12

20. Kamada Y, Tamura S, Kiso S, Matsumoto H, Saji Y, Yoshida Y, et al. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 2003;125:1796–1807.
21. Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol* 2005; 166:1655–1669.
22. Tang M, Potter JJ, Mezey E. Leptin enhances the effect of transforming growth factor beta in increasing type I collagen formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:906–911.
23. Cao Q, Mak KM, Ren C, Lieber CS. Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK-mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- dependant MAPK pathways. *J Biol Chem* 2003;279:4292–4304.
24. Cao Q, Mak KM, Lieber CS. Leptin enhances alpha1(I) collagen gene expression in LX-2 human hepatic stellate cells through JAK-mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent MAPK pathways. *J Cell Biochem* 2006;97:188–197.
25. Schulz LC, Widmaier EP. The effect of leptin on mouse trophoblast cell invasion. *Biol Reprod* 2004;71:1963–1967.
26. Saxena NK, Titus MA, Ding X, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman SV, et al. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *FASEB J* 2004;18:1612–1614.
27. Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, Parola M, Colombatto S, Novo E, et al. Up-regulation of pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005;42:1339–1348.
28. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998;281:1683–1686.

## 5. ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ

Στην σύνθετη βιοχημική και δομική οργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας του ήπατος εμπλέκονται οι πρωτεΐνες κολλαγόνο και ελαστίνη, δομικές γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες και γλυκοζαμινο-γλυκάνες [1-3].

Οι πρωτεογλυκάνες αποτελούν μία ετερογενή ομάδα αρνητικά φορτισμένων, διάσπαρτα κατανεμημένων μορίων, αποτελούμενων από κεντρικό πρωτεϊνικό πυρήνα στον οποίο ένας αριθμός θειούχων και ακετυλιωμένων υδατανθρακικών αλύσων (γλυκοζαμινο-γλυκάνες) συνδέεται με ομοιοπολικούς δεσμούς [4-8]. Οι αλυσοί των γλυκοζαμινο-γλυκανών συντίθενται από μονάδες δισακχαριτών που η καθεμία περιέχει ομάδες εξοζαμίνης και εξασουρονικού οξέως.

Το υαλουρονικό οξύ διαφέρει δομικά από τις πρωτεογλυκάνες σε δύο τουλάχιστον βασικά σημεία: (α) οι επαναλαμβανόμενες μονάδες των δισακχαριτών των υδατανθρακικών αλύσων στερούνται των θειούχων ομάδων και κατά συνέπεια δεν έχουν υψηλό αρνητικό φορτίο, (β) η γλυκοζαμινο-γλυκάνη δεν είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με τον κεντρικό πρωτεϊνικό πυρήνα [9] και έτσι η σύνθεσή του δεν βρίσκεται σε στενή εξάρτηση με την λειτουργία του μηχανισμού πρωτεϊνικής σύνθεσης.

Το υαλουρονικό οξύ αποτελεί βασικό συστατικό του συνδετικού ιστού σχεδόν όλων των οργάνων. Στο φυσιολογικό ήπαρ εμφανίζεται σε αναλογία 2% των συνολικών γλυκοζαμινο-γλυκανών ενώ παρατηρείται 10πλάσια αύξηση σε περίπτωση ηπατικής ίνωσης [10-13].

Η αύξηση της συγκέντρωσης του υαλουρινικού οξέος στην εξωκυττάρια ουσία του ηπατικού ήπατος είναι κατά πολύ μεγαλύτερη της αύξησης των συνολικών πρωτεογλυκανών οδηγώντας στην 3πλάσια κλασματική αύξηση του [10-12].

Μελέτες *in vitro* σε ποντίκια έχουν αποδείξει ότι τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα συνθέτουν μεγάλες ποσότητες υαλουρονικών παραγώγων [14,15], 80% των οποίων εκκρίνεται στον διάμεσο χώρο [16]. Κανένα από τα υπόλοιπα μη-παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος δεν έχει αποδειχθεί ότι παράγει υαλουρονικά παράγωγα.



Μόνον σε πρώιμες καλλιέργειες μονής στοιβάδας ηπατοκυττάρων σε πλαστικό έχει διαπιστωθεί η σύνθεση πολύ μικρής ποσότητας υαλουρονικού οξέος [17], αλλά είναι λίαν αμφίβολο εάν αυτό συμβαίνει *in vivo*.

Η χρονο-εξαρτώμενη αύξηση στην σύνθεση των υαλουρινικών παραγώγων στις καλλιέργειες των ηπατοκυττάρων [17], πιθανώς να οφείλεται στην ταχεία αύξηση του κλάσματος των αστεροειδών κυττάρων από τα οποία έχει επιμολυνθεί η καλλιέργεια.

Η υπόθεση αυτή έχει επαληθευθεί από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε εναιώρημα ηπατοκυττάρων, φυσιολογικού και ινωτικού ήπατος, όπου δεν διαπιστώθηκε η παρουσία υαλουρονικού οξέος σε άλλα κύτταρα ή στον διάμεσο χώρο, αλλά και κατά την διάρκεια της μελέτης της σύνθεσης του κολλαγόνου σε καλλιέργειες παρεγχυματικών κυττάρων [18].

Τα κύτταρα του Kupffer, μέσω της παραγωγής διαλυτών μεσολαβητών ενεργοποιούν την σύνθεση/έκκριση και αυξάνουν την συγκέντρωση των υαλουρινικών παραγώγων και των άλλων γλυκοζαμινο-γλυκανών στον διάμεσο χώρο με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς: ενεργοποιώντας τον πολλαπλασιασμό των αστεροειδών κυττάρων [19,20] και αυξάνοντας την αναλογία σύνθεσης ανά κύτταρο (DNA) [21].

Είναι αβέβαιο εάν ο πολλαπλασιασμός και η σύνθεση των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας ενεργοποιούνται από τον ίδιο ή από διαφορετικό παράγοντα, είναι όμως γνωστό ότι η ενεργοποίηση της παραγωγής εξωκυττάριας ουσίας μπορεί να επιτευχθεί και χωρίς την ενεργοποίηση του μηχανισμού μίτωσης [22]. Η αρμονική λειτουργία των δύο αυτών μηχανισμών οδηγεί σε αξιοσημείωτη διεύρυνση της σύνθεσης υαλουρινικών παραγώγων τοπικά, η οποία είναι απαραίτητη για την συσσώρευση τους, στον συνδετικό ιστό της εξωκυττάριας ουσίας του ινωτικού ήπατος [10-13].

Δεδομένου όμως ότι η νέα ποσότητα υαλουρινικών παραγώγων που συντίθεται εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο, ένα κλάσμα αυτής διαφεύγει στον ορρό συνεισφέροντας (μαζί με την επιδείνωση της κάθαρσης από τα ηπατικά ενδοθηλιακά κύτταρα) [23-25] στην αύξηση των κυκλοφορούντων επιπέδων των υαλουρινικών παραγώγων, σε διάφορες μορφές χρόνιας ηπατικής βλάβης [26-28].

Μέχρι τώρα δεν γνωρίζουμε την βιοχημική φύση ούτε και τον μηχανισμό δράσης του παράγοντα μέσω του οποίου τα κύτταρα του Kupffer επιδρούν στα αστεροειδή κύτταρα για την επαγωγή παραγωγής υαλουρονικού οξέος.

Σχετικά με τα χημικά του χαρακτηριστικά, πρόκειται για έναν θερμοευαίσθητο, διασπώμενο από την τρυψίνη και την προνάση, παράγοντα με μοριακή μάζα περίπου 30 KDa , ο οποίος δεν συνδέεται με άλλον παράγοντα σε στήλες σεφαρόζης με ενεργοποιημένο άνθρακα η ηπαρίνη [29].

## **Βιβλιογραφία**

1. Rauterberg J, Voss B. Pott G. Gerlach U. Connective tissue components of the normal and fibrotic liver. *Klin Wochenschr* 1981; 59: 767-779.
2. Rojkind M. Kershenovich D. Extracellular matrix, fibrosis and cirrhosis. In: Arias IM, Frenkel M. Wilson JHP. eds. *The Liver Annual*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 1986: 2111-224.
3. Gressner AM. Zum gegenwärtigen Stand der Pathobiochemie und klinisch-chemischen Laboratoriumsdiagnostik der Leberfibrose. *Wied Klin* 1987; 82: 7111-7111.
4. Trelstad RL. Glycosaminoglycans: mortar, matrix, minor. *Lab Invest* 1985: 53
5. Iozzo RV. Biology of disease. Proteoglycans: structure, function, and role in neoplasia. *Lab Invest* 1985; 53: 373-396.
6. Poole AR. Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *Biochem J* 1986; 236: 1-14.
7. Gallagher JT, Lyon M. Steward WP. Structure and function of heparan sulfate proteoglycans. *Biochem J* 1986; 236: 313-325,
8. Gressner AM Hepatic proteoglycans- a brief survey of their pathobiochemical implications. *Hepato-Gastroenterology* v 1983; 30: 225-229.
9. Mason RM. d'Arville C. Kimura JH. Hascall VC. Absence of covalently linked core protein from newly synthesized hyaluronate. *Biochem J* 1982; 211: 445-452.
10. Stuhlsatz HW. Vierhaus S. Gressner AM. Greiling H. The distribution pattern and structural differences of the glycosaminoglycans in normal and cirrhotic human liver, In: Popper H. Reutter W. Gudat F. Köttgen E. eds.

Structural Carbohydrates in the Liver. Lancaster: MTP Press Ltd.. 1983; 6511-651.

11. Murata K. Ochiai Y. Akashio K. Polydispersity of acidic glycosaminoglycan components in human liver and the changes at different stages in liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1985; 89: 1248-1257.

12. Murata K. Akashio K. Ochiai Y, Changes in acidic glycosaminoglycan components at different stages of human liver cirrhosis. *Hepato-Gastroenterology* 1984;3 1: 261-265.

13. Kojima J. Nakamura N, Kanatani M. Ohmori K. The glycosaminoglycans in human hepatic cancer. *Cancer Res* 1975; 35: 542-547.

14. W,like K. Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs, *Int. Rev Cytol* 1980; 66: 303-353.

15. Aterman K. The parasinusoidal cells of the liver: a historical account. *Histochem J* 1986; 18: 279-305.

16. Gressner AM, Haarmann R. Hyaluronic acid synthesis and secretion by rat liver fat storing cells (perisinusoidal lipocytes) in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 151: 222-229.

17. Ninomiva Y, Ryu-Ichiro H, Nagai Y. Active synthesis of glycosaminoglycans by liver parenchymal cells in primary culture. *Biochim Biophys Acta* 1981; 675: 248-255.

18. Maher J J, Bissell DM, Roll FJ. Contaminating lipocytes contribute to collagen synthesis in hepatocyte cultures. *Clin Res* 1987; 35: 591A.

19. Shiratori Y. Gecrts A, Icfiida T, Kawasc T, Wisse E. Kupffer cells from CCl<sub>4</sub>-induced fibrotic livers stimulate proliferation of fat-storing cells. *J Hepatol* 1986; 3: 294-303.

20. Zerhe O, Gressner AM. Proliferation of fat storing cells is stimulated by secretion of Kupffer cells from normal and injured liver. *Exp Mol Pathol* 1988; 49: 87-101.
21. A. M. Gressner and R. Haarmann Regulation of hyaluronate synthesis in rat liver fat storing cell cultures by Kupffer cells *Journal of Hepatology*, 1988; 7:310-318
22. Gressner AM, Zerhe O. Kupffer cell-mediated induction of synthesis and secretion of proteoglycans by rat liver fatstoring cells in culture. *J Hepatol* 1987; 5: 299-310.
23. Laurent TC, Fraser JRE, Pertoft H, Smedsrod B. Binding of hyaluronate and chondroitin sulphate to liver endothelial cells. *Biochem J* 1986; 234: 653-658.
24. Fraser JRE, Alcorn D, Laurent TC, Robinson AD, Rydmark GB. Uptake of circulating hyaluronic acid by the rat liver. *Cell Tissue Res* 1985; 242: 505-510.
25. Fraser JRE, Engstrom-Laurent A, Nyberg A, Laurent TC. Removal of hyaluronic acid from the circulation in rheumatoid disease and primary biliary cirrhosis. *J Lab Clin Med* 1986; 1(17): 79-85.
26. Engstrom-Laurent A, Lefter L, Nyberg A, Schröder T. Increased serum levels of hyaluronate in liver disease. *Hepatology* 1985; 5: 638-642.
27. Frimbourg T, Delpech B, Bercoff E, et al. Serum hyaluronate in liver diseases: study by enzymological assay. *Hepatology* 1986; 6: 392-395.
28. Nyberg A, Engstrom-Laurent A, Lefter L. Serum hyaluronate in primary biliary cirrhosis- a biochemical marker for progressive liver damage. *Hepatology* 1988; 8: 142-146.
29. Meyer D, Gressner AM. Charakterisierung eines Kupffer-Zell-Faktors mit Proteoglykansynthese-stimulierende Wirkung auf Vitamin-A-Speicherzellen und Vergleich mit bekannten Progressions- und Kompetenzfaktoren. *Z Gastroenterol* 1988; XXVI: 52

## 6. TGF-β ΚΑΙ ΗΠΑΤΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

### 6.1. Η οικογένεια των TGF-β : Συγγένειες και ρόλοι στην ανάπτυξη

Η μεγάλη οικογένεια των TGF-β αριθμεί περισσότερες από 30 πρωτεΐνες. Εκτός από τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού άλλα μέλη της είναι οι ακτιβίνες, οι μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (BMPs), η αντί-Mullerian ορμόνη (AMH) και οι αυξητικοί παράγοντες διαφοροποίησης (GDFs) [1].

Τα θηλαστικά εμφανίζουν 3 ισομορφές του TGF-β (-β1, -β2, -β3) οι οποίες ανήκουν σε διαφορετικά χρωμοσώματα αλλά παρουσιάζουν 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων. Αυτό υποδηλώνει ουσιαστικά παρόμοιες λειτουργίες, γεγονός που παρατηρείται στους περισσότερους ιστούς του ενήλικα.

Από την άλλη μεριά όμως, μελέτες της έλλειψης γονιδίου σε ποντίκια έχουν δείξει ότι οι ρόλοι στην ανάπτυξη είναι ευκρινείς και μη επικαλυπτόμενοι [2].

Η έλλειψη του TGF-β1 είναι συμβατή με μεταγεννητική επιβίωση, αν και το ήπαρ (καθώς και κάποιοι άλλοι ιστοί) διηθείται από μονοπύρρηνα κύτταρα [3], ενώ η έλλειψη του TGF-β2 ή TGF-β3 σχετίζεται με περιγεννητική θνητότητα [2,4].

Στο φυσιολογικό ήπαρ των ενηλίκων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών και τα κύτταρα του Kupffer έχουν σχετικά υψηλά βασικά (constitutive) επίπεδα του TGF-β1 mRNA και χαμηλά αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα του TGF-β2 και TGF-β3, ενώ τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες εμφανίζουν χαμηλή έκφραση του TGF-β και τα ηπατοκύτταρα ουσιαστικά καθόλου [5].

Μετά από μερική ηπατεκτομή, η αλλαγή στην έκφραση είναι πιο εμφανής όσον αφορά το mRNA του TGF-β2 και εμπλέκει όλους τους κυτταρικούς τύπους.

Αντιθέτως, μετά από μία ινογενετική βλάβη όπως είναι η περίδεση του χοληδόχου πόρου, η έκφραση αλλάζει μόνο στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα και όλοι οι 3 τύποι του TGF-β αυξάνονται [5].

Αυτό αναδεικνύει τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα ως την κύρια πηγή του TGF-β στην αποφρακτική βλάβη, και την αυτοκρινή ρύθμιση από την κυτταροκίνη αυτή.

Αν και από τα δεδομένα αυτά προκύπτει η πιθανότητα των διακεκριμένων ρόλων των διαφορετικών ισομορφών του TGF-β, η φύση των ρόλων αυτών παραμένει ακόμη να διευκρινισθεί. Επίσης προκύπτει η πιθανότητα, ηπατικές βλάβες διαφόρου αιτιολογίας να οδηγούν σε υπερέκφραση του TGF-β από διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων.

Η ρύθμιση της έκφρασης του TGF-β, για καθεμία από τις ισομορφές, είναι ατελώς κατανοητή. Κάποιες σειρές δεδομένων ενοχοποιούν το ρετινοϊκό οξύ ως ρυθμιστή σε διάφορους ιστούς [6] συμπεριλαμβανομένου και του ηπατικού [7].

Το σημείο αυτό έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα που περιέχουν την πλειονότητα των αποθηκευμένων στον οργανισμό εστέρων ρετινοειδών, τα οποία στην ηπατική βλάβη υδρολύονται σε ελεύθερη ρετινόλη και ρετινοϊκό οξύ. Άμεσες μελέτες της επίδρασης του ρετινοϊκού οξέος έχουν οδηγήσει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Σύμφωνα με μία ανακοίνωση, το ρετινοϊκό οξύ καταστέλλει κάποια χαρακτηριστικά της ενεργοποίησης των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων σε καλλιέργεια, με αποτέλεσμα την μείωση της παραγωγής κολλαγόνου *in vivo* [8].

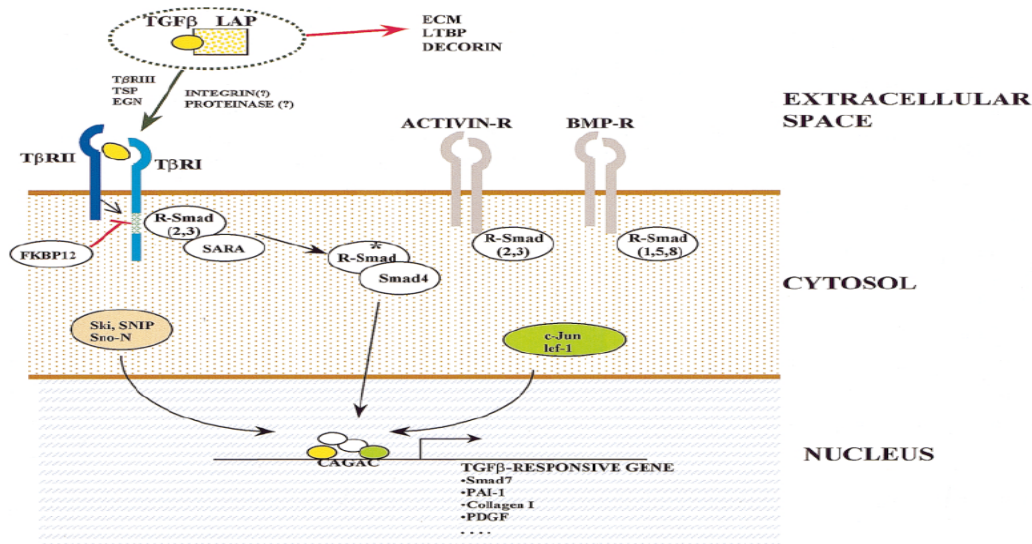
Σε άλλη εργασία, εν τούτοις, αυτό διεγείρει την ενεργοποίηση του TGF-β και επιταχύνει την ινογένεση *in vivo* [9].

Η ανάλυση του εκκινητού (promoter) του TGF-β γονιδίου ανέδειξε την θέση σύνδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 και KLF6 ενώ παράλληλα μελέτες κυτταρικών καλλιεργειών υποστήριξαν τον ρυθμιστικό ρόλο αυτών των παραγόντων [10].

Η μηχανική έκταση επάγει την μεταγραφή του TGF-β1 στα λεία μυϊκά κύτταρα του ανθρώπινου εμβρύου [11], και αυτό ίσως να είναι σχετικό με τις απαντήσεις των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων καθώς η χρόνια ηπατική βλάβη εκτυλίσσεται σε πυλαία υπέρταση.

## **6.2. Περικυτταρική ρύθμιση της ενεργοποίησης του TGF-β**

Ο TGF-β συντίθεται ως μία πρόδρομη ουσία η οποία περιλαμβάνει το πεπτιδίο LAP (Latency-associated peptide) **[Εικόνα 1]**.



**Εικόνα 1.** TGF-β κυτταρικός μεταβολισμός και μετάδοση του σήματος. *Hepatology* 2001; 34: 859–867.

Η πρωτεολυτική διάσπαση του προδρόμου επισυμβαίνει ενδοκυττάρια, αλλά το 25 Kd ενεργό πεπτιδίο και το μη ομοιοπολικώς συνδεδεμένο LAP εκκρίνονται ως ένα σύμπλεγμα το οποίο στερείται βιολογικής δραστηριότητας. Το LAP συνδέεται με το προπεπτιδίο του TGF-β μέσω δύο κυστεϊνικών υπολοίπων (τοποθεσίες 223 και 225) [12].

Missense μεταλλάξεις του LAP οδηγούν σε στερεοχημικές αλλαγές στην πρωτεΐνη και στην απελευθέρωση του ενεργού TGF-β1.

Το σύμπλεγμα LAP- TGF-β συσσωρεύεται περαιτέρω, συνδεδεμένο με μία μεγάλη πρωτεΐνη που ονομάζεται latent TGF-β- binding protein (LTBP).

Η τελευταία έχει ομολογία με τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας συμπεριλαμβανομένων της φιβριλίνης, του τύπου IV κολλαγόνου και της φιβρονεκτίνης και σε αυτή την βάση στηρίζεται η σκέψη ότι το σύμπλεγμα αγκυροβολεί στην περικυττάρια εξωκυττάρια ουσία [13].

Η σύνδεση της LTBP με την εξωκυττάρια ουσία πιθανώς εξυπηρετεί την συσσώρευση της κυτταροκίνης δημιουργώντας ένα έτοιμο ρεζερβουάρ από το οποίο ο ενεργός TGF-β μπορεί να ελευθερώνεται χωρίς εκ νέου σύνθεση.

Η LTBP είναι παρούσα στα ηπατοκύτταρα [14] αλλά πιθανόν αντιπροσωπεύει προσληφθέν υλικό και όχι συντιθέμενο de novo [15]. Υπάρχουν διάφορες ισομορφές, αντιπροσωπεύοντας παραλλαγές (splice variants) του πρωτότυπου



αντίγραφου , κάποιες από τις οποίες παράγονται από τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα και ενεργοποιούνται διαφορετικά κατά την διάρκεια της βλάβης [15].

Στο σενάριο αυτό, η εξωκυττάρια ουσία είναι δυνητικά ένας σημαντικός ρυθμιστής των λανθανόντων περικυττάρων TGF-β συμπλεγμάτων.

Οι αλλαγές που συνδέονται με την βλάβη στην ηπατική εξωκυττάρια ουσία ίσως εξυπηρετούν την αύξηση της τοπικής χωρητικότητας για την διατήρηση του λανθάνοντα TGF-β.

Η απελευθέρωση του ενεργού TGF-β από τα λανθάνοντα συμπλέγματα έχει εξετασθεί αναλυτικά και έχουν προταθεί πολλαπλοί μηχανισμοί (Πίνακας 1), που υποδηλώνουν αυστηρή περικυττάρια ρύθμιση.

Οι καταγεγραμμένοι παράγοντες μπορεί να μην παρουσιάζονται σε όλους τους ιστούς ή ακόμη να μην εκφράζονται ομοιόμορφα σε κάθε ιστό.

Αν και απουσιάζουν οι άμεσες αποδείξεις δεν θα αποτελούσε έκπληξη αν οι περιπυλαίες, οι μεσολόβιες και οι περικεντρικές περιοχές, αντίστοιχα, στο ήπαρ χρησιμοποιούν διαφορετικές στρατηγικές για την εξασφάλιση αυστηρού περικυτταρικού ελέγχου του ενεργού TGF-β.

Factor	Reported Action	Knockout Phenotype	Hepatic Expression	References
Metalloproteinases	Opens latent complex		HSCs: MMP2 KCs: MMP9	16, 17
Plasmin	Opens latent complex	Fibrin deposition, bleeding	? None	18-20
uPA	Activates plasminogen	Defective skin repair when plasminogen is also absent; liver phenotype unknown	Increases after partial hepatectomy	21-23
tPA	Activates plasminogen	Decreased cerebellar neuron outgrowth	Unchanged in early fibrosis	24, 25
PAI-1	Blocks tPA	Altered hemostasis; no liver phenotype	Induced by TGF- $\beta$ in HSCs; mutation in man not associated with hepatic fibrosis	24, 26, 27
Decorin	Sequesters TGF- $\beta$	Fragile skin; abnormal collagen fibril formation	Increased in liver injury	28-30
Thrombospondin-1	Alters LAP, releasing active TGF- $\beta$	Pulmonary inflammation; no liver phenotype	Perisinusoidal in developing liver and in fibrosis	31-33
Thrombospondin-2	? As for TSP-1	Accelerated skin repair; liver phenotype unknown		34, 35
Mannose-6-P receptor	Releases active TGF- $\beta$ from the latent complex	I-cell disease; no liver phenotype	Present on activated (but not quiescent) HSCs	36, 37
$\alpha\beta 6$ integrin	Complexes with the TGF- $\beta$ receptor, releasing active TGF- $\beta$	Pulmonary inflammation, without fibrosis	Not identified in liver	38, 39
SPARC	Induces TGF- $\beta$	Reduced TGF- $\beta$ expression by renal mesangial cells	Minimal in normal liver; present in fibrotic scar	40, 41

**Πίνακας 1.** Παράγοντες που ρυθμίζουν την απελευθέρωση του TGF- $\beta$  από το λανθάνον TGF- $\beta$  σύμπλεγμα. *Hepatology 2001; 34: 859–867.*

### 6.3. TGF- $\beta$ υποδοχείς

Οι υποδοχείς για την οικογένεια TGF- $\beta$  συνίστανται από τα τύπου I και τύπου II δομικά στοιχεία τα οποία σχηματίζουν ετεροδιμερή.

Το εξωκυττάριο τμήμα του τύπου II υποδοχέα συνδέει τον δεσμευτή, ενεργοποιώντας το ενδοκυττάριο τμήμα, την σερίνη-θρεονίνη κινάση, η οποία μετά φωσφορυλιώνει το ειδικό τμήμα του υποδοχέα τύπου I που είναι γνωστό ως GS επίτοπος [Εικόνα 1].

Ο GS επίτοπος με την σειρά του καθίσταται μία ενεργός σερίνη-θρεονίνη κινάση η οποία ξεκινά την μετάδοση του σήματος. Τα διαφορετικά συμπλέγματα του υποδοχέα εξυπηρετούν τους TGF- $\beta$ , τις ακτιβίνες και τους BMP, αντίστοιχα.

Το τρίτο συστατικό του υποδοχέα, ονομαζόμενο τύπου III υποδοχέας ή  $\beta$ -γλυκάνη, είναι ένας από τους αρκετούς δυνητικούς βοηθητικούς υποδοχείς, ο οποίος εξυπηρετεί την παρουσίαση του δεσμευτή στο τύπου I/τύπου II ετεροδιμερές. Η  $\beta$ -

γλυκάνη /τύπου III υποδοχέας ίσως είναι απαραίτητη για την σύνδεση του TGF-β2 στον υποδοχέα: σε περίπτωση απουσίας του, τα κύτταρα αποτυγχάνουν να ανταποκριθούν στον TGF-β2 ενώ η απάντηση στον TGF-β1 ή στον TGF-β3 παραμένει ανεπηρέαστη [42].

Η ενδογλίνη είναι ένας άλλος βοηθητικός υποδοχέας, με δομική ομοιότητα με τον υποδοχέα τύπου III, που συνδέει τον TGF-β1 και TGF-β3 με μεγάλη συγγένεια αλλά σε αντίθεση με την β-γλυκάνη δεν συνδέει τον TGF-β2 [43]. Τα ποντίκια χωρίς ενδογλίνη πεθαίνουν κατά την μέση της κυοφορίας στην μήτρα με ελαττωματική αγγειογένεση [44].

Στους ανθρώπους το γονίδιο είναι μεταλλαγμένο στην κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία τύπου I (Osler-Weber-Rendu syndrome) [45].

Η ηπατική παθολογία περιλαμβάνει όχι μόνο ηπατική αρτηριο-φλεβική δυσπλασία αλλά σε κάποιους ασθενείς ίνωση ή κίρρωση, πράγμα που υποδηλώνει δυσλειτουργία της φυσιολογικής ανταπόκρισης στην βλάβη [46].

Στην χρόνια ηπατίτιδα C, η ενδογλίνη είναι σημαντικότερα αυξημένη στις πυλαίες περιοχές που φλεγμαίνουν σε συσχέτιση με τον μικροαγγειακό πολλαπλασιασμό [47,48].

Η έκφραση του τύπου II υποδοχέα στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα μειώνεται ραγδαία μετά από βλάβη που προκαλείται είτε από τετραχλωριούχο άνθρακα (carbon tetrachloride) [49] είτε από περίδεση του χοληδόχου πόρου [50]; Το mRNA είναι επίσης μειωμένο στην χρόνια βλάβη που προκαλεί ο ιός της ηπατίτιδας C στον άνθρωπο [50]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, το mRNA για τον τύπου I υποδοχέα αυξάνεται κατά την διάρκεια της βλάβης, οδηγώντας σε αλλαγή του λόγου τύπου II/τύπου I υποδοχέα [50,51].

Υπάρχει επίσης και έτερος τύπου I υποδοχέας, ο οποίος έχει ονομασθεί Tsk7L [52]; το mRNA του εκφράζεται από τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα και μένει αμετάβλητο στην βλάβη [50].

Οι περιοχές των εκκινητών των τύπου I και τύπου II υποδοχέων έχουν αναλυθεί σε επίπεδο βάσεων (sequenced); Οι Sp1 και KLF6 ανήκουν στις πρωτεΐνες που φαίνεται να ρυθμίζουν την μεταγραφή αυτών των γονιδίων [10].

#### **6.4. Συστηματικές δράσεις του TGF-β1**

Τα αποτελέσματα του TGF-β έχουν εξετασθεί με άμεση έγχυση του ανασυνδυασμένου παράγοντα [53] και από την υπερέκφραση του σε διαγονιδιακά

ποντίκια από τα ηπατοκύτταρα, υπό τον έλεγχο ενός ειδικού εκκινητού για τα ηπατοκύτταρα [54,55].

Το διαγονιδιακό πειραματόζωο ήταν μεταλλαγμένη μορφή του λανθάνοντα TGF-β1 στην οποία οι σερίνες αντικατέστησαν την κυστεΐνη 223 και την κυστεΐνη 225; αυτό οδήγησε στην αυτόματη παραγωγή του ενεργού 25-kd πολυπεπτιδίου [12].

Στα μοντέλα αυτά, ο κυκλοφορών TGF-β έφθασε σε συγκεντρώσεις πολύ υψηλότερες από τα φυσιολογικά επίπεδα. Εμφανίστηκε ηπατική ίνωση, αν και στα χρόνια μοντέλα η αιτία του θανάτου ήταν η νεφρική ανεπάρκεια [54], επιδεικνύοντας την ιδιαίτερη ευαισθησία των νεφρών στον TGF-β, τον οποίο φιλτράρουν και συγκεντρώνουν. Πιθανώς για τον λόγο αυτό, οι στρατηγικές εξουδετέρωσης του TGF-β στην κυκλοφορία με αντισώματα [56] ή decorin [28], είναι περισσότερο επιτυχείς για την νεφρική ίνωση.

Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι ο TGF-β της κυκλοφορίας σε αρκούντως υψηλά επίπεδα στα διαγονιδιακά ποντίκια έχει αποτελέσματα στο ήπαρ, αν και τα ερωτήματα παραμένουν σχετικά με την φυσιολογική σημασία των ευρημάτων.

Ο TGF-β παράγεται από έναν αριθμό διαφόρων κυττάρων, περιλαμβανομένων των λεμφοκυττάρων και έτσι πιθανώς αυξάνεται στην περιοχή της βλάβης και εισέρχεται στην κυκλοφορία. Τα αυξημένα επίπεδα του TGF-β στους ασθενείς που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση μυελού συχνά προβλέπουν την εμφάνιση της ηπατικής φλεβοαποφρακτικής νόσου [57]. Επίσης, τα επίπεδα στα ούρα αυξάνουν στους ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο [58].

Γενικά, η ανάλυση των επιπέδων του πλάσματος είναι γεμάτη δυσκολίες λόγω της επιμόλυνσης του δείγματος από τον TGF-β που προέρχεται από τα αιμοπετάλια.

Επίσης, η κάθαρση της κυτταροκίνης αυτής είναι σύνθετη. Ο TGF-β συνδέεται τοπικά στις περιοχές των βλαβών με την εξωκυττάρια ουσία και γενικότερα με το αγγειακό ενδοθήλιο [59]. Μπορεί να συγκεντρωθεί και να δεσμευθεί από διαλυτές πρωτεΐνες, όπως είναι η α2-μακροσφαιρίνη [60] και η decorin [61]. Μπορεί επίσης να υποστεί νεφρική έκκριση ή να προσληφθεί από τα ηπατοκύτταρα [62]. Αυτοί οι διαφορετικοί τρόποι συγκέντρωσης ή κάθαρσης πιθανόν να διαφέρουν ανάλογα με το νόσημα.

Έτσι η αύξηση του TGF-β στο πλάσμα σε περίπτωση βλάβης [63] ίσως δεν αντικατοπτρίζει περικυτταρικές συγκεντρώσεις στην περιοχή της βλάβης [64,65] και για τον λόγο αυτό είναι απίθανη η διαγνωστική του χρησιμότητα.

## 6.5. Ηπατική ίνωση

Όταν εμφανισθεί η βλάβη, ο προσβεβλημένος ιστός αντιδρά για να περιορίσει το αίτιο της βλάβης, να απομονώσει την βλάβη, να κλείσει το τραύμα και να ανακτήσει την κανονική του δομή.

Τα φλεγμονώδη κύτταρα έλκονται στην μεριά της βλάβης και τα τοπικά κύτταρα αναλαμβάνουν ειδικούς ρόλους στην διαδικασία της επιδιόρθωσης.

Τα ιστικά περικύτταρα και οι ινοβλάστες υφίστανται ενεργοποίηση και μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι μεταναστεύουν, πολλαπλασιάζονται και γίνονται ινογενετικοί και συσπαστικοί.

Εάν η βλάβη δεν είναι επαναλαμβανόμενη, ο περιορισμός της οδηγεί στην αναπαραγωγή του παρεγχύματος και των μεσεγχυματικών στοιχείων.

Τελικώς, η συσκευή επιδιόρθωσης αποσυντίθεται, η διαδικασία περιλαμβάνει απόπτωση των μυοϊνοβλαστών και ινόλυση της υπερβολικής εξωκυττάριας ουσίας. Αν και τα στάδια της επιδιόρθωσης συχνά επικαλύπτονται, όταν όλα εξελίσσονται ομαλά το τελικό αποτέλεσμα είναι η αποκατάσταση του φυσιολογικού ιστού.

Αντίθετα στην χρόνια ή επαναλαμβανόμενη βλάβη, αντίδραση και διάλυση συμβαδίζουν. Όταν η ινογενετική (αρχική) αντίδραση υπεριχύει, υπάρχει ξεκάθαρη συσσώρευση μυοϊνοβλαστών και εξωκυττάριας ουσίας, και αν αυτό είναι αρκετά έντονο και παρατεταμένο, η συσσώρευση της εξωκυττάριας ουσίας γίνεται ιστολογικά φανερή ως ίνωση. Το βλαπτικό περιβάλλον στο ήπαρ περιλαμβάνει ανοσοκύτταρα, τα οποία μπορεί να είναι είτε ενδογενή του ήπατος, είτε να προέρχονται από τον θύμο [66].

Ο TGF- $\beta$  είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού και της έκφρασης των κυτταροκινών από τα T κύτταρα [67] και πιθανώς επηρεάζει την απάντηση της επιδιόρθωσης μέσω των ανοσοκυττάρων; αυτή αποτελεί περιοχή που χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Ένα άλλο βασικό σημείο αφορά την διαφορά μεταξύ των ατόμων στην απάντηση στην βλάβη: στην χρόνια βλάβη όπως είναι η ηπατίτιδα C, οι ασθενείς μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τον βαθμό προόδου της ίνωσης.

Μεταξύ των παραγόντων που επηρεάζουν την πρόοδο μπορεί να είναι η γενετική προδιάθεση των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων για υψηλή ή χαμηλή ινογένεση. Η αλλαγή στην ακολουθία των ειδικών νουκλεοτιδίων (πολυμορφισμός) του εκκινητού μεμονωμένων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του TGF- $\beta$ , έχουν

σχετισθεί με διαφορετικά επίπεδα μεταγραφής. Σε αυτές τις διαφορές ίσως να οφείλεται εν μέρει η ταχεία ή βραδεία ανάπτυξη ίνωσης [68].

Το κολλαγόνο I είναι η προεξάρχουσα πρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας στην χρόνια ηπατική ίνωση. Υπάρχει μαρτυρία για την ρύθμιση του και από τον TGF-β και από το οξειδωτικό stress και η σχετική σπουδαιότητα των δύο αυτών φαινομενικά μη σχετιζόμενων παραγόντων έχει συζητηθεί πολύ. Το οξειδωτικό stress ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα kB/jun kinase , δημιουργώντας πυρηνικό c-jun. Ο c-jun έχει αναγνωρισθεί ως συνενεργοποιητής των TGF-β απαντήσεων μέσω του σχηματισμού μεταγραφικών συμπλεγμάτων με τις Smad πρωτεΐνες. Έτσι αντί να είναι ανεξάρτητοι, ο TGF-β και το οξειδωτικό stress ίσως συγκλίνουν εντός του πυρήνα διεγείροντας και οι δύο την μεταγραφή των γονιδίων που σχετίζονται με την ίνωση. Έχοντας πει αυτό, δεν συνεπάγεται ότι η σημασία τους είναι η ίδια, όπως έχει δειχθεί από την επίδραση των αναστολέων.

Ενώ τα αντιοξειδωτικά μειώνουν την ινογένεση σε πειραματικά μοντέλα [69], στην ηπατίτιδα C στον άνθρωπο, η d-alpha-tocopherol μολονότι ανέστειλε το οξειδωτικό stress, δεν είχε επίδραση στην ίνωση ή στην φλεγμονή [70].

Σε αντίθεση, ο ανταγωνιστικός αναστολέας του τύπου II υποδοχέα του TGF-β σε πειραματόζωα ήταν υψηλής αποτελεσματικότητας στην πρόληψη ή στην αναστροφή της ίνωσης.

Μία πρακτική ανησυχία με κάθε μέθοδο αναστολής του TGF-β είναι η δυσλειτουργία του αυξητικού μηχανισμού και ο αυξημένος κίνδυνος νεοπλασίας, έτσι ώστε απαιτείται ιδιαίτερα προσεκτική διερεύνηση σε κάθε κλινική δοκιμασία.

## **6.6. TGF-β και μετανάστευση των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων**

Μορφολογικές παρατηρήσεις έχουν καταδείξει ότι τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα μεταναστεύουν στον τόπο της βλάβης ενώ υφίστανται ενεργοποίηση [71]. Μετανάστευση μπορεί να παρατηρηθεί επίσης in vitro [72].

Αν και ο PDGF φαίνεται να είναι ο σημαντικότερος χημειοτακτικός παράγοντας για τα HSCs [73,74], ο ρόλος του TGF-β δεν έχει αποκλεισθεί. Η κυτταροκίνη αυτή είναι η ίδια ένας χημειοτακτικός παράγοντας, ιδιαίτερα όταν υπάρχουν και οι αυξητικοί παράγοντες EGF και HGF [75,76]. Όμως επειδή εκφράζεται συνεχώς και ταχέως από τα ηπατικά αστεροειδή, πρακτικά κάτω από όλες τις συνθήκες των

πρωτογενών καλλιιεργειών , αναπόφευκτα υπάρχει σε όλες τις δοκιμασίες μετανάστευσης και θα μπορεί έτσι να επηρεάσει την απάντηση όταν δοκιμάζεται in vitro ένας άλλος χημειοτακτικός παράγοντας.

### **6.7. TGF-β και καταστολή της αύξησης στο ήπαρ**

Η αντιπολλαπλασιαστική δράση του TGF-β έχει ευρέως αποδειχθεί σε μοντέλα αρουραίων με μερική ηπατεκτομή. Μετά από ηπατική εκτομή τα ηπατοκύτταρα επιδεικνύουν παροδική αύξηση του TGF-β2 και TGF-β3 ως μέρος της πρώιμης απάντησης. Η έκφραση του TGF-β1 αυξάνεται μετά από καθυστέρηση 12 ωρών με μέγιστη τιμή μετά από 20 ώρες , η οποία συμπίπτει με τον μειωμένο πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων [5], χωρίς φυσικά αυτό να αποτελεί απόλυτη απόδειξη αντιπολλαπλασιαστικής δράσης.

Μελέτες έγχυσης όμως υποστηρίζουν την θεωρία ότι ο TGF-β αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων : όταν χορηγείται κατά την διάρκεια της ηπατικής εκτομής, ο TGF-β εμφανώς καθυστερεί (αλλά δεν εξαλείφει) τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων [53].

Η κατασταλτική του επίδραση θεωρείται ότι εμπλέκει την επαγωγή των γονιδίων του κυτταρικού κύκλου, ειδικότερα τους αρνητικούς ρυθμιστές p15INK4B και P21CIP1 [77,78].

Οι μελέτες του πολλαπλασιασμού των μη-παρεγχυματικών κυττάρων είναι λιγότερες και ουσιαστικά όλες έχουν χρησιμοποιήσει καλλιέργειες (κυρίως ηπατικών αστεροειδών κυττάρων) για να εξετάσουν τις απαντήσεις στον TGF-β.

Αν και ο ισχυρός μιτογόνος παράγοντας των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων PDGF, επάγεται από τον TGF-β [79] τα στοιχεία είναι συγκρουόμενα ως προς την δράση του στον πολλαπλασιασμό. Αυτό είναι πιθανό λόγω της ευχερούς και αυτόματης επαγωγής του ενδογενούς TGF-β και πολλών από τον TGF-β εξαρτώμενων απαντήσεων που επέρχεται όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται ex vivo. Αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα τα οποία υπό κανονικές συνθήκες εκφράζουν χαμηλά επίπεδα TGF-β [5] αλλά εμφανίζουν σημαντικά αυξημένο TGF-β RNA σε λιγότερο από 24 ώρες μετά την απομόνωση τους από το φυσιολογικό ήπαρ παρά την χρήση συνθηκών καλλιέργειας, σχεδιασμένων να διατηρούν μία αδιέγερτη κατάσταση [80]. Ασχέτως αυτών, υπάρχει ομοφωνία ότι ο TGF-β δρα κατασταλτικά στον πολλαπλασιασμό των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων [81], ένα συμπέρασμα που υποστηρίζεται από το

εύρημα ότι η προσθήκη ενός ανταγωνιστή του υποδοχέα του TGF-β στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα, σε καλλιέργεια, οδηγεί σε αυξημένη DNA σύνθεση [82].

Δεδομένης της δράσης του TGF-β έναντι του πολλαπλασιασμού, είναι ενδιαφέρον ότι αρκετά κύτταρα του ήπατος, ειδικότερα τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα [50], υφίστανται διαίρεση κατά την διάρκεια της επιδιόρθωσης της βλάβης.

Όπως έχει ήδη σημειωθεί, η έκφραση του τύπου II υποδοχέα (και του mRNA και της πρωτεΐνης) μειώνεται κατά την διάρκεια της απάντησης στην βλάβη.

Οι ηπατικοί μυοϊνοβλάστες σε καλλιέργεια δεν είναι ευαίσθητοι στον προστιθέμενο TGF-β [81], εύρημα συμβατό με την απώλεια του σήματος από τον TGF-β.

Υπάρχει μία συνακόλουθη αύξηση στους παράγοντες που τείνουν να συσσωματώσουν τον TGF-β (LTBP), καθώς και στους αναστολείς των πρωτεασών οι οποίοι ίσως απαιτούνται για την απελευθέρωση του TGF-β από το λανθάνον σύμπλεγμα (π.χ PAI-1) [15]. Την ίδια ώρα η ινογένεση διατηρείται ή αυξάνεται, υποδηλώνοντας ότι το μειωμένο TGF-β σήμα αρκεί για την προϊνογενετική επίδραση.

Εναλλακτικά, η αλλαγή στην εισαγωγή του σήματος από τον TGF-β μπορεί να αντικαθίσταται με την σηματοδότηση από άλλα μονοπάτια όπως εκείνα που εξυπηρετούν το οξειδωτικό stress. Αυτό υποδηλώνεται από το εύρημα ότι ο αποκλεισμός του TGF-β μειώνει την ινογένεση από 50% σε 70% μόνο [82]. Μελέτες σε ηπατική βλάβη ποντικών με έλλειψη του TGF-β1 έχουν καταλήξει σε παρόμοια αποτελέσματα [83].

Συνολικά τα στοιχεία δείχνουν ανεξάρτητη ρύθμιση της αύξησης και της ινογένεσης από τον TGF-β, αν και οι ακριβείς μηχανισμοί είναι ακόμη αβέβαιοι.

## **6.8. Απόπτωση**

Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από αυτές που χρειάζονται για τη διακοπή της αύξησης, ο TGF-β και η ακτιβίνη [84] επίσης, προκαλούν απόπτωση των κυττάρων του ήπατος σε καλλιέργεια; τα ηπατοκύτταρα είναι πολύ περισσότερο ευαίσθητα στον TGF-β από ότι τα μη παρεγχυματικά κύτταρα όπως είναι τα ηπατικά αστεροειδή [85].

Εργασία με σειρά ανθρώπινου ηπατώματος, Huh-7, έδειξε ότι μέρος της πρώιμης απάντησης στον TGF-β ήταν η αυξημένη δραστηριότητα της κασπάσης-8, ακολουθούμενη από την ενεργοποίηση των κασπασών-9 και -3 ενώ αναστολείς της



κασπάσης-8 ανέστειλαν την απόπτωση [86]. Η ιντερλευκίνη 6 επίσης αποτρέπει την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, αναστέλλοντας έτσι την από τον TGF-β προκαλούμενη απόπτωση [87].

Η διαδικασία στα κύτταρα του ηπατώματος έχει συνδεθεί με δύο μεταγραφικούς παράγοντες που ονομάζονται TIEG1 και TIEG2 [88,89]. Παρόμοια με τον πανταχού παρόντα μεταγραφικό παράγοντα Sp1, αυτοί ρυθμίζονται από τον TGF-β.

Σε κυτταρική σειρά ηπατώματος η υπερέκφραση του TIEG1 προκάλεσε αλλαγές παρόμοιες με αυτές που προκλήθηκαν από τον εξωγενή TGF-β περιλαμβανομένου του σχηματισμού ελευθέρων ριζών οξυγόνου [89]. Έχει επίσης προταθεί αντι-αποπτωτική θεραπεία του ηπατώματος: Σε κύτταρα ηπατώματος καθώς και σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα των αρουραίων, η capillin μπλοκάρει την απόπτωση που επάγεται από τον TGF-β; αυτό είναι ένα συστατικό από φυτικά εκχυλίσματα, *inchin-ko-to*, το οποίο έχει περιγραφεί σαν τονωτικό του ήπατος [90].

## **6.9. TGF-β και ηπατοκυτταρικός καρκίνος**

Ο TGF-β ρυθμίζει έναν αριθμό γονιδίων σχετικών με την εμφάνιση και την πρόοδο του όγκου. Έχει αποδοθεί κύριος ρόλος στην επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση που είναι το υπόβαθρο της προόδου του όγκου του δέρματος, του αδένου του μαστού και ενδεχομένως επίσης άλλων επιθηλίων [91].

Στον ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνο, η ίδια η έκφραση του TGF-β συχνά είναι αυξημένη [64,92], υποδηλώνοντας αντίσταση στην ανασταλτική επίδραση αυτής της κυτταροκίνης. Κατά αναλογία με το αδenoκαρκίνωμα του παχέος εντέρου, η αντίσταση μπορεί να περιλαμβάνει μεταλλαγή του τύπου II υποδοχέα του TGF-β [93,94], και η ανάλυση της πρωτεΐνης και του mRNA του υποδοχέα στον ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνο υποστηρίζει αυτήν την εκδοχή [95-97]. Επιπλέον, όταν το γονίδιο του υποδοχέα από 73 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C και HCC υπέστη ανάλυση σε επίπεδο βάσεων (sequencing), η μεταλλαγή βρέθηκε σε περισσότερους από 50% των όγκων [98].

Εν τούτοις δεν υποστηρίζουν όλες οι δημοσιεύσεις αυτό το συμπέρασμα [99,100]. Μεταλλαγές του Smad2 ή του Smad4 σε ιστό ηπατοκυτταρικού καρκινώματος φαίνεται να μην είναι συχνές [99,101].

Ο mannose-6-phosphate υποδοχέας επίσης έχει αναλυθεί. Δύο μελέτες, μία από τις ΗΠΑ [102] και μία από την Ιαπωνία [103], απέφεραν αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Σε κάποιες κυτταρικές σειρές ηπατωμάτων υπάρχει αυξημένο επίπεδο του Smad7 που σε γενικές γραμμές θα μπορούσε να μπλοκάρει την μεταγωγή του σήματος από έναν άθικτο υποδοχέα [104]. Συμπερασματικά, αν και οι μηχανισμοί παραμένουν να διευκρινιστούν, τροποποιημένη ρύθμιση του TGF-β φαίνεται πιθανόν να είναι σημαντική σε τουλάχιστον κάποια περιστατικά ηπατοκυτταρικού καρκίνου.

## **6.10. TGF-β3**

Στον άνθρωπο ο TGF-β3 κωδικοποιείται από ένα ενιαίο είδος mRNA περίπου 3,5 KB [105-107]. Όπως και τα άλλα μέλη της οικογένειας συντίθεται ως μία μεγάλη πρόδρομη πρωτεΐνη.

Ο βιολογικά ενεργός TGF-β3 είναι ένα ομοδιμερές που συνίσταται από δύο πανομοιότυπες ώριμες υπομονάδες και έχει μοριακό βάρος περίπου 25.000.

### **6.10.1. Έκφραση και φυσιολογικοί ρόλοι**

Σειρά μελετών που περιλαμβάνουν τον *in situ* υβριδισμό και τις ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι ο TGF-β3 συχνά συνεκφράζεται με τον TGF-β1 και τον TGF-β2 αν και χρονικές και περιοχικές διαφορές της έκφρασης των ισομορφών είναι συχνά ευκρινείς.

### **6.10.2. Φαρμακολογικές δράσεις**

Ο TGF-β3 έχει φανεί ότι καταστέλλει την αύξηση των ακόλουθων ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών σε διαφορετικό βαθμό: A549 αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα (46%), A375 μελανώματος (47%), A2058 μελανώματος (88%), WiDr αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου (24%), MCF7 καρκινώματος μαστού (57%), G292 οστεοσαρκώματος (<5%), MG63 οστεοσαρκώματος (<5%), MNNG οστεοσαρκώματος (<5%), K562 χρόνιας μυελοειδούς λευχαιμίας (55%), KG-1 οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας (50%), Hut 78 Τα-λεμφώματος (50%) και U937 ιστιοκυτταρικού λεμφώματος (50%) [108].

Ο ανασυνδυασμένος ανθρώπινος TGF-β3 έχει φανεί ότι είναι ένας ισχυρός ρυθμιστής των λειτουργιών που συνδέονται με τον σχηματισμό των οστών, όπως είναι η μιτογένεση, η σύνθεση κολλαγόνου και η δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης, όταν δοκιμάστηκα σε κυτταρικές σειρές οστών εμπλουτισμένες με

οστεοβλάστες *in vitro*. Στην μελέτη αυτή άμεση σύγκριση με τον TGF-β1 ανέδειξε ότι ο TGF-β3 είχε πέντε φορές ισχυρότερη δράση από τον TGF-β1 [109].

### **6.10.3. Χημειοπροφύλαξη**

Ο TGF-β3 μπορεί να διακόψει ή να επιβραδύνει την κυτταρική ανακύκλωση του επιθηλίου της στοματικής κοιλότητας *in vitro*, παρέχοντας με τον τρόπο αυτό βελτιωμένη αντίσταση στην τοξικό αποτέλεσμα της χημειοθεραπείας [110].

Εκτός από τα προστατευτικά του αποτελέσματα στα επιθηλιακά κύτταρα ο TGF-β3 έχει ανακοινωθεί ότι εκλεκτικά και ισχυρά μπλοκάρει αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών *in vitro* [111].

Μελέτη έχει αναδείξει ότι ο ανασυνδυασμένος TGF-β3 έχει την ικανότητα να προστατεύει τα ανθρώπινα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών από το τοξικό αποτέλεσμα ορισμένων αλκυλιούντων παραγόντων οι οποίοι συχνά χρησιμοποιούνται στην χημειοθεραπεία του καρκίνου [112].

## **6.11. Βιβλιογραφία**

1. Kawabata M, Miyazono K. 2000. Bone morphogenetic proteins. In: Canalis E, editor. Skeletal Growth Factors. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p 269-290.
2. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, et al. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 1997;124:2659-2670.
3. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359: 693-699.
4. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J. Abnormal lung development and cleft palate in micelacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 1995;11:415-421.
5. Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1995;96:447-455.
6. Han GR, Dohi DF, Lee HY, Rajah R, Walsh GL, Hong WK, Cohen P, et al. All-trans-retinoic acid increases transforming growth factor-beta2 and insulin-like growth factor binding protein-3 expression through a retinoic acid receptor-alpha-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 1997;272:13711-13716.
7. Ohata M, Lin M, Satre M, Tsukamoto H. Diminished retinoic acid signalling in hepatic stellate cells in cholestatic liver fibrosis. *Am J Physiol* 1997;272:G589-G596.

8. Davis BH, Kramer RT, Davidson NO. Retinoic acid modulates rat Ito cell proliferation, collagen, and transforming growth factor beta production. *J Clin Invest* 1990;86:2062-2070.
9. Okuno M, Moriwaki H, Imai S, Muto Y, Kwada N, Suzuki Y, Kojima S. Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF-beta in liver stellate cells. *HEPATOLOGY* 1997;26:913-921.
10. Kim Y, Ratzliff V, Choi SG, Lalazar A, Theiss G, Dang Q, Kim SJ, et al. Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J Biol Chem* 1998;273:33750-33758.
11. Gutierrez JA, Perr HA. Mechanical stretch modulates TGF-beta1 and alpha1. *Am J Physiol* 1999;277:G1074-G1080.
12. Brunner AM, Marquardt H, Malacko AR, Lioubin MN, Purchio AF. Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor beta 1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins. *J Biol Chem* 1989;264:13660-13664.
13. Hyytiäinen M, Taipale J, Heldin K-H, Keski-Oja J. Recombinant latent transforming growth factor-binding protein 2 assembles to fibroblast extracellular matrix and is susceptible to proteolytic processing and release. *J Biol Chem* 1998;273:20669-20676. 864 BISSELL, ROULOT, AND GEORGE  
*HEPATOLOGY* November 2001
14. Roth S, Schurek J, Gressner AM. Expression and release of the latent transforming growth factor beta binding protein by hepatocytes from rat liver. *HEPATOLOGY* 1997;25:1398-1405.
15. Breitkopf K, Lahme B, Tag CG, Gressner AM. Expression and matrix deposition of latent transforming growth factor-beta binding proteins in normal

and fibrotic rat liver and transdifferentiating hepatic stellate cells in culture. HEPATOLOGY 2001;33:387-396.

16. Arthur MJP. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. Am J Physiol 2000;279:G245-G249.

17. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. Genes Dev 2000;14:163-176.

18. Leyland H, Gentry J, Arthur MJ, Benyon RC. The plasminogen activating system in hepatic stellate cells. HEPATOLOGY 1996;24:1172-1178.

19. Chapman HA. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. Curr Opin Cell Biol 1997;9: 714-724.

20. Bugge TH, Kombrinck KW, Flick MJ, Daugherty CC, Danton MJ, Degen JL. Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. Cell 1996;87:709-719.

21. Bisgaard HC, Santoni-Rugiu E, Nagy P, Thorgeirsson SS. Modulation of the plasminogen activator/plasmin system in rat liver regenerating by recruitment of oval cells. Lab Invest 1998;78:237-246.

22. Mars WM, Liu ML, Kitson RP, Goldfarb RH, Gabauer MK, Michalopoulos GK. Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration. HEPATOLOGY 1995;21:1695-1701.

23. Thornton AJ, Bruzdinski CJ, Raper SE, Gelehrter TD. Plasminogen activator inhibitor-1 is an immediate early response gene in regenerating rat liver. Cancer Res 1994;54:1337-1343.

24. Zhang LP, Takahara T, Yata Y, Furui K, Jin B, Kawada N, Watanabe A. Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator

inhibitor during liver fibrogenesis of rats: role of stellate cells. *J Hepatol* 1999;31:703-711.

25. Seeds NW, Basham ME, Haffke SP. Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1999;96:14118-14123.

26. Knittel T, Fellmer P, Ramadori G. Gene expression and regulation of plasminogen activator inhibitor type I in hepatic stellate cells of rat liver. *Gastroenterology* 1996;111:745-754.

27. Fay WP, Parker AC, Condrey LR, Shapiro AD. Human plasminogen activator inhibitor-1. *Blood* 1997;90:204-208.

28. Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Natural inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 1992;360:361-364.

29. Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, Kaneda Y, Imai E, Noble NA, Border WA. Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nat Med* 1996;2:418-423.

30. Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 1997;136:729-743.

31. Couvelard A, Scoazec JY, Dauge MC, Bringuier AF, Potet F, Feldmann G. Structural and functional differentiation of sinusoidal endothelial cells during liver organogenesis in humans. *Blood* 1996;87:4568-4580.

32. Lawler J, Sunday M, Thibert V, Duquette M, George EL, Rayburn H, Hynes RO. Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J Clin Invest* 1998; 101:982-992.

33. Scoazec JY, Flejou JF, D'Errico A, Couvelard A, Kozyraki R, Fiorentino M, Grigioni WF, et al. Focal nodular hyperplasia of the liver: composition of the

extracellular matrix and expression of cell-cell and cellmatrix adhesion molecules. *Hum Pathol* 1995;26:1114-1125.

34. Kyriakides TR, Tam JW, Bornstein P. Accelerated wound healing in mice with a disruption of the thrombospondin 2 gene. *J Invest Dermatol* 1999;113:782-787.

35. Yang Z, Kyriakides TR, Bornstein P. Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase- 2. *Mol Biol Cell* 2000;11:3353-3364.

36. de Bleser PJ, Jannes P, van Buul-Offers SC, Hoogerbrugge CM, van Schravendijk CF, Niki T, Rogiers V, et al. Insulinlike growth factor-II/ mannose 6-phosphate receptor is expressed on CCl4-exposed rat fatstoring cells and facilitates activation of latent transforming growth factor-beta in cocultures with sinusoidal endothelial cells. *HEPATOLOGY* 1995;21:1429-1437.

37. Dittmer F, Ulbrich EJ, Hafner A, Schmahl W, Meister T, Pohlmann R, von Figura K. Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell typespecific. *J Cell Sci* 1999;112:1591-1597.

38. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999;96:319-328.

39. Breuss JM, Gillett N, Lu L, Sheppard D, Pytela R. Restricted distribution of integrin beta 6 mRNA in primate epithelial tissues. *J Histochem Cytochem* 1993;41:1521-1527.

40. Francki A, Bradshaw AD, Bassuk JA, Howe CC, Couser WG, Sage EH. SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells. *J Biol Chem* 1999;274:32145- 32152.



41. Blazejewski S, Le Bail B, Boussarie L, Blanc JF, Malaval L, Okubo K, Saric J, et al. Osteonectin (SPARC) expression in human liver and in cultured human liver myofibroblasts. *Am J Pathol* 1997;151:651-657.
42. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Ann Rev Biochem* 1998;67: 753-791.
43. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992;267:19027-19030.
44. Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, et al. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 1999; 284:1534-1537.
45. Rius C, Smith JD, Almendro N, Langa C, Botella LM, Marchuk DA, Vary CP, et al. Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood* 1998;92: 4677-4690.
46. Bernard G, Mion F, Henry L, Plauchu H, Paliard P. Hepatic involvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia: clinical, radiological, and hemodynamic studies of 11 cases. *Gastroenterology* 1993;105:482-487.
47. Asanza CG, Garcia-Monzon C, Clemente G, Salcedo M, Garcia-Buey L, Garcia-Iglesias C, Banares R, et al. Immunohistochemical evidence of immunopathogenetic mechanisms in chronic hepatitis C recurrence after liver transplantation. *HEPATOLOGY* 1997;26:755-763.
48. Garcia-Monzon C, Sanchez-Madrid F, Garcia-Buey L, Garcia-Arroyo A, Garcia-Sanchez A, Moreno-Otero R. Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology* 1995;108:231-241.
49. Date M, Matsuzaki K, Matsushita M, Sakitani K, Shibano K, Okajima A, Yamamoto C, et al. Differential expression of transforming growth factor- beta

and its receptors in hepatocytes and nonparenchymal cells of rat liver after CCl<sub>4</sub> administration. *J Hepatol* 1998;28:572-581.

50. Roulot D,Sevcsik AM,Coste T,Strosberg AD,Marullo S. Role of transforming growth factor beta type II receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats. *HEPATOLOGY* 1999;29:1730-1738.

51. Dore' JEJ,Yao D,Edens M,Garamszegi N,Sholl EL,Leof EB. Mechanisms of transforming growth factor-receptor endocytosis and intracellular sorting differ between fibroblasts and epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2001;12:675-684.

52. Ebner R,Chen RH,Shum L,Lawler S,Zioncheck TF,Lee A,Lopez AR, et al. Cloning of a type I TGF-beta receptor and its effect on TGF-beta binding to the type II receptor. *Science* 1993;260:1344-1348.

53. Russell WE,Coffey RJ,Jr.,Ouellette AJ,Moses HL. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5126-5130.

54. Sanderson N,Factor V,Nagy P,Kopp J,Kondaiah P,Wakefield L, Roberts AB,et al. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1995;92:2572-2576.

55. Kanzler S,Lohse AW,Keil A,Henninger J,Dienes HP,Schirmacher P, Rose-John S,et al. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis.*AmJ Physiol* 1999;276:G1059-G1068.

56. Border WA,Okuda S,Languino LR,Sporn MB,Ruoslahti E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature* 1990;346:371-374.

57. Anscher MS,Peters WP,Reisenbichler H,Petros WP,Jirtle RL. Transforming growth factor beta as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone

marrow transplantation for advanced breast cancer. *N Engl J Med* 1993;328:1592-1598.

58. Tsai JF,Chuang LY,Jeng JE,Yang ML,Chang WY,Hsieh MY,Lin ZY,et al. Clinical relevance of transforming growth factor-beta 1 in the urine of patients with hepatocellular carcinoma. *Medicine* 1997;76:213-226.

59. Dickson K,Philip A,Warshawsky H,O'Connor-McCourt M,Bergeron JJ. Specific binding of endocrine transforming growth factor-beta 1 to vascular endothelium. *J Clin Invest* 1995;95:2539-2554.

60. Schuftan GG,Bachem MG. Alpha2-macroglobulin reduces paracrine and autocrine-stimulated matrix synthesis of cultured rat hepatic stellate cells. *Eur J Clin Invest* 1999;29:519-528.

61. Marra F,Bonewald LF,Park-Snyder S,Park IS,Woodruff KA,Abboud HE. Characterization and regulation of the latent transforming growth factor-beta complex secreted by vascular pericytes. *J Cell Physiol* 1996; 166:537-546.

62. Coffey RJ,Jr.,Kost LJ,Lyons RM,Moses HL,LaRusso NF. Hepatic processing of transforming growth factor beta in the rat. Uptake,metabolism, and biliary excretion. *J Clin Invest* 1987;80:750-757.

63. Kropf J,Schurek JO,Wollner A,Gressner AM. Immunological measurement of transforming growth factor-beta 1. *Clin Chem* 1997;43:1965-1974.

64. Matsuzaki K,Date M,Furukawa F,Tahashi Y,Matsushita M,Sakitani K, Yamashiki N,et al. Autocrine stimulatory mechanism by transforming growth factor beta in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:1394-1402.

65. Shah M,Revis D,Herrick S,Baillie R,Thorgeirson S,Ferguson M, Roberts A,et al. Role of elevated plasma transforming growth factor beta 1 levels in wound healing. *Am J Pathol* 1999; 154:1115-1124.

66. Doherty DG, O'Farrelly C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* 2000; 174:5-20.
67. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF beta. *Ann Rev Immunol* 1998; 16:137-161.
68. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *HEPATOLOGY* 2000;31:828-833.
69. Chojkier M, Houglum K, Lee KS, Buck M. Long- and short-term Dalpha-tocopherol supplementation inhibits liver collagen alpha1(I) gene expression. *Am J Physiol* 1998;275:G1480-G1485.
70. Houglum K, Venkataramani A, Lyche K, Chojkier M. A pilot study of the effects of d-alpha-tocopherol on hepatic stellate cell activation in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1997;113:1069-1073.
71. Horn T, Junge J, Christoffersen P. Early alcoholic liver injury. Activation of lipocytes in acinar zone 3 and correlation to degree of collagen formation in the Disse space. *J Hepatol* 1986;3:333-340.
72. Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, Kaneda K. In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *HEPATOLOGY* 1999;29:1760-1767.
73. Kinnman N, Hultcrantz R, Barbu V, Rey C, Wendum D, Poupon R, Housset C. PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Lab Invest* 2000;80:697- 707.
74. Failli P, DeFranco RM, Caligiuri A, Gentilini A, Romanelli RG, Marra F, Batignani G, et al. Nitrovasodilators inhibit platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;119:479-492.

75. Nilsson M, Dahlman T, Westermark B, Westermark K. Transforming growth factor-beta promotes epidermal growth factor-induced thyroid cell migration and follicle neoformation in collagen gel separable from cell proliferation. *Exp Cell Res* 1995;220:257-665.
76. Stolz DB, Michalopoulos GK. Differential modulation of hepatocyte growth factor-stimulated motility by transforming growth factor beta1 on rat liver epithelial cells in vitro. *J Cell Physiol* 1998;175:30-40.
77. Depoortere F, Pirson I, Bartek J, Dumont JE, Roger PP. Transforming growth factor beta. *Mol Biol Cell* 2000;11:1061-1076.
78. Tsubari M, Taipale J, Tiihonen E, Keski-Oja J, Laiho M. Hepatocyte growth factor releases mink epithelial cells from transforming growth factor beta1-induced growth arrest by restoring Cdk6 expression and cyclin E-associated Cdk2 activity. *Mol Cell Biol* 1999;19:3654-3663.
79. Taylor LM, Khachigian LM. Induction of platelet-derived growth factor B-chain expression by transforming growth factor-beta involves transactivation by Smads. *J Biol Chem* 2000;275:16709-16716.
80. Bissel M, Roulot D, George J. Transforming Growth Factor  $\beta$  and the liver. *HEPATOLOGY* 2001;34:859-867.
81. Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signalling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *HEPATOLOGY* 2000;31:1094-1106.
82. George J, Roulot D, Koteliansky VE, Bissell DM. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12719-12724.

83. Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA. The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol* 1999;30:77-87.
84. Schwall RH, Robbins K, Jardieu P, Chang L, Lai C, Terrell TG. Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro. *HEPATOLOGY* 1993;18:347-356.
85. Grasl-Kraupp B, Rossmanith W, Ruttkay-Nedecky B, Mullauer L, Kammerer B, Bursch W, Schulte-Hermann R. Levels of transforming growth factor beta and transforming growth factor beta receptors in rat liver during growth, regression by apoptosis and neoplasia. *HEPATOLOGY* 1998;28:717-726.
86. Shima Y, Nakao K, Nakashima T, Kawakami A, Nakata K, Hamasaki K, Kato Y, et al. Activation of caspase-8 in transforming growth factor beta-induced apoptosis of human hepatoma cells. *HEPATOLOGY* 1999;30:1215-1222.
87. Chen RH, Chang MC, Su YH, Tsai YT, Kuo ML. Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways. *J Biol Chem* 1999;274:23013-23019.
88. Cook T, Gebelein B, Mesa K, Mladek A, Urrutia R. Molecular cloning and characterization of TIEG2 reveals a new subfamily of transforming growth factor-beta-inducible Sp1-like zinc finger-encoding genes involved in the regulation of cell growth. *J Biol Chem* 1998;273:25929-25936.
89. Ribeiro A, Bronk SF, Roberts PJ, Urrutia R, Gores GJ. The transforming growth factor beta1-inducible transcription factor, TIEG1, mediates apoptosis through oxidative stress. *HEPATOLOGY* 1999;30:1490-1497.
90. Yamamoto M, Ogawa K, Morita M, Fukuda K, Komatsu Y. The herbal medicine Inchin-ko-to inhibits liver cell apoptosis induced by transforming growth factor beta 1. *HEPATOLOGY* 1996;23:552-559.

91. Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S, Piek E, et al. Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6686-6691.
92. Abou-Shady M, Baer HU, Friess H, Berberat P, Zimmermann A, Graber H, Gold LI, et al. Transforming growth factor betas and their signalling receptors in human hepatocellular carcinoma. *AmJ Surg* 1999;177:209-215.
93. de Caestecker MP, Piek E, Roberts AB. Role of transforming growth factor-signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1388-1402.
94. Zhu Y, Richardson JA, Parada LF, Graff JM. Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell* 1998;94:703-714.
95. Kiss A, Wang NJ, Xie JP, Thorgeirsson SS. Analysis of transforming growth factor. *Clin Cancer Res* 1997;3:1059-1066.
96. Sue SR, Chari RS, Kong FM, Mills JJ, Fine RL, Jirtle RL, Meyers WC. Transforming growth factor-beta receptors and mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor expression in human hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 1995;222:171-178.
97. Bedossa P, Peltier E, Terris B, Franco D, Poynard T. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and TGF-beta 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. *HEPATOLOGY* 1995;21:760-766.
98. Furuta K, Misao S, Takahashi K, Tagaya T, Fukuzawa Y, Ishikawa T, Yoshioka K, et al. Gene mutation of transforming growth factor beta1 type II receptor in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1999;81:851-853.
99. Kawate S, Takenoshita S, Ohwada S, Mogi A, Fukusato T, Makita F, Kuwano H, et al. Mutation analysis of transforming growth factor beta type II receptor, Smad2, and Smad4 in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 1999;14:127-131.

100. Vincent F, Hagiwara K, Ke Y, Stoner GD, Demetrick DJ, Bennett WP. Mutation analysis of the transforming growth factor beta type II receptor in sporadic human cancers of the pancreas, liver, and breast. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;223:561-564.
101. Yakicier MC, Irmak MB, Romano A, Kew M, Ozturk M. Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999; 18:4879-4883.
102. Yamada T, De Souza AT, Finkelstein S, Jirtle RL. Loss of the gene encoding mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is an early event in liver carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10351-10355.
103. Wada I, Kanada H, Nomura K, Kato Y, Machinami R, Kitagawa T. Failure to detect genetic alteration of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor. *HEPATOLOGY* 1999;29:1718-1721.
104. Matsuzaki K, Date M, Furukawa F, Tahashi Y, Matsushita M, Sugano Y, Yamashiki N, et al. Regulatory mechanisms for transforming growth factor beta as an autocrine inhibitor in human hepatocellular carcinoma: implications for roles of Smads in its growth. *HEPATOLOGY* 2000; 32:218-227.
105. Derynck, R., Lindquist, P.B., Lee, A., Wen, D., Tamm, J., Graycar, J.L., Rhee, L., Mason, A.J., Miller, D.A., Coffey, R.J., Moses, H.L. and Chen, E.Y. (1988). A new type of transforming growth factor- $\beta$ . *EMBO J.* 7: 3737-3743.
106. Schmid, P., Cox, D., Bilbe, G., Maier, R. and McMaster, G.K. (1991). Differential expression of TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3 genes during mouse embryogenesis. *Development* 111: 117-130
107. ten Dijke, P., Hansen, P., Iwata, K.K., Pieler, C. and Foulkes, J.G (1988). Identification of another member of the transforming growth factor type b gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4715-4719.
108. ten Dijke, P. (1991). Recombinant expression and purification of transforming growth factor- $\beta$ 3, a potent growth regulator. Ph.D. Thesis. University of Wageningen, Netherlands pp89-105.



109. ten Dijke, P., Iwata, K.K., Goddard, C., Pieler, C., Canalis, E., McCarthy, T.L. and Centrella, M. (1990). Recombinant transforming growth factor type  $\beta$ 3: Biological activities and receptor-binding properties in isolated bone cells. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4473-4479.
110. Sonis, S.T., Lindquist, L., Van Vugt, A., Stewart, A.A., Stam, K., Qu, G.Y., Iwata, K.K. and Haley, J.D. (1994). Prevention of chemotherapy-induced ulcerative mucositis by transforming growth factor  $\beta$ 3. *Cancer Res.* 54: 1135-1138.
111. Strife A., Lambek C., Perez A., Darzynkiewicz Z., Skierski J., Gulati S., Haley J.D., ten Dijke P., Iwata K.K. and Clarkson B.D. (1991). The effects of transforming growth factor  $\beta$ 3 on the growth of highly enriched hematopoietic progenitor cells derived from normal human bone marrow and peripheral blood. *Cancer Res.* 51: 4828-4836.
112. Lemoli, R.M., Strife, A., Clarkson, B.D., Haley, J.D. and Gulati, S.C (1992). TGF-Beta 3 protects normal human hematopoietic progenitor cells treated with 4-hydroperoxycyclophosphamide in vitro. *Exp. Hematol.* 20: 1252-1256.

## 7. ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΡΟΥ ΚΑΙ ΗΠΑΤΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

### 7.1. Εισαγωγή

Η διάγνωση και παρακολούθηση της ινογένεσης, δηλ. της διαδικασίας παραγωγής νέου συνδετικού ιστού στο κατεστραμμένο ήπαρ, αποτελεί γεγονός μεγάλης κλινικής σημασίας που μέχρι σήμερα πραγματοποιείται ως επί το πλείστον με την επεμβατική διαδικασία της βιοψίας και στην συνέχεια με την ιστολογική εξέταση η οποία βασίζεται σε διάφορα αριθμητικά συστήματα βαθμολόγησης (Knodell, Ishak, METAVIR, Scheuer, Desmet κ.α) οδηγώντας στην βαθμολόγηση της νεκροφλεγμονώδους ενεργότητας και στην σταδιοποίηση (έκταση) της ίνωσης [1].

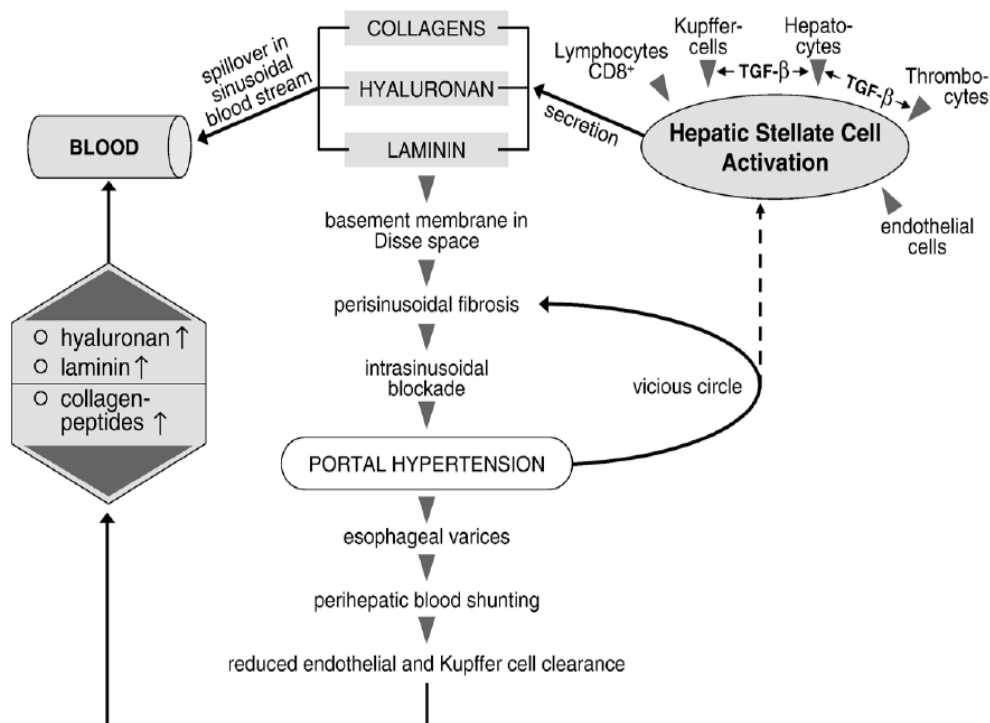
Η βιοψία ήπατος είναι μία μέθοδος η οποία εκτός από την επεμβατικότητα (θνητότητα 1:10<sup>3</sup>-1:10<sup>4</sup>, σοβαρές επιπλοκές 0,57%) έχει και αρκετά άλλα μειονεκτήματα όπως είναι το δειγματοληπτικό λάθος (μόνο 1/50.000 της μάζας του ήπατος συνήθως αποκτάται) και η συχνά μη επαναληψιμότητα του δείγματος η οποία εξαρτάται από το μήκος και το μέγεθος του ιστικού δείγματος (συντελεστής μεταβλητότητας 45-35%). Επιπλέον, η ιστολογική εκτίμηση εξαρτάται αυστηρά από την εμπειρία του παθολογοανατόμου [2].

Ως εκ τούτου η εξεύρεση και η χρήση μη-επεμβατικών βιοδεικτών ορού ή πλάσματος που θα αντικατοπτρίζουν την διαδικασία της ινογένεσης αποτελεί έναν σημαντικό σκοπό.

Μέχρι σήμερα μελετώνται δύο κατηγορίες δεικτών, οι άμεσοι και οι έμμεσοι.

### 7.2. I κατηγορία δεικτών ίνωσης (άμεσοι)

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι δείκτες οι οποίοι βασίζονται στην μετάφραση της μοριακής παθογένεσης της ίνωσης. Συνεπώς, οι βιοδείκτες αυτοί είναι συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας με αυξημένη έκφραση από τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα και καθυστερημένη κάθαρση από τα κύτταρα του Kupffer ή τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών του ήπατος λόγω της μεταβολικής δυσλειτουργίας και/ή της αιμοδυναμικής παράκαμψης, ή είναι μεσολαβητές της ινογένεσης με αυξημένη έκφραση όπως είναι ο TGF-β (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1.** Μηχανιστική θεμελίωση της κατηγορίας I των βιοδεικτών του ορού της ηπατικής ίνωσης/ινογένεσης. Η διεγερμένη σύνθεση και έκκριση από τα αστεροειδή κύτταρα, τα οποία ενεργοποιούνται από την επίδραση του TGF-β που παράγεται από τα καταστρεμμένα ηπατοκύτταρα, αιμοπετάλια, λεμφοκύτταρα, ενεργοποιημένα κύτταρα του Kupffer, επιθηλιακά κύτταρα των κολποειδών αλλά και η μειωμένη κάθαρση από την κυκλοφορία ως συνέπεια της περικολποειδικής ίνωσης που οδηγεί στην παράπλευρη κυκλοφορία του αίματος είναι οι κύριες οδοί αύξησης της συγκέντρωσης των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας (π.χ κολλαγονικά τμήματα, υαλουρονικά παράγωγα και λαμινίνη) στην χρόνια (ινογενετική) ηπατική βλάβη. *Clin Chim Acta 2007;381:107-113.*

Από τα διάφορα προτεινόμενα τμήματα των προκολλαγόνων και κολλαγόνων, μόνο το N-τελικό πεπτίδιο του τύπου III προκολλαγόνου (PIIINP) έχει αποκτήσει κάποια περιορισμένη κλινική εφαρμογή χωρίς όμως να υπάρχει διαδεδομένη αποδοχή [3]. Ευαίσθησιες περίπου 76-78% και ειδικότητες περίπου 71-81% έχουν δημοσιευτεί, οι οποίες μπορούν να αυξηθούν πάνω από 88% εάν συνδυαστούν με επιπρόσθετους δείκτες κολλαγονικών τμημάτων. Πρέπει να υπογραμμισθεί ότι ο PIIINP δεν είναι ειδικός βιοδείκτης για νοσήματα του ήπατος αφού η αύξηση του

παρατηρείται και σε άλλες καταστάσεις όπως πνευμονική ίνωση, ακρομεγαλία, ρευματοειδή νοσήματα, χρόνια παγκρεατίτιδα κ.α.

Επίσης, δομικές γλυκοπρωτεΐνες (π.χ undulin, τεναςκίνη) και βιοσυνθετικά (π.χ prolylhydroxylase) ή καταβολικά ένζυμα (π.χ μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας ουσίας) του κολλαγόνου και των διαφόρων άλλων συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας δεν έχουν αποκτήσει μεγάλη αξιοπιστία στην διάγνωση, βαθμολόγηση και σταδιοποίηση της ίνωσης (Πίνακας 1). Τα δημοσιευμένα διαγνωστικά κριτήρια είναι ανεπαρκή, συχνά αναξιόπιστα και αμφισβητήσιμα. Επί πλέον, κάποιοι από αυτούς τους βιοδείκτες του ορού δεν αντικατοπτρίζουν τις αλλαγές της εξωκυττάριας ουσίας αλλά την κυτταρική καταστροφή (νέκρωση). Έτσι η χρήση τους περιορίζεται σε επιστημονικές μελέτες [2].

Σε κάποιες μελέτες το υαλουρονικό οξύ αποδείχθηκε ότι είναι ο σχετικά καλύτερος βιοδείκτης της ίνωσης στην κατηγορία I έχοντας περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) 0,97, ευαισθησία 86-100% και ειδικότητα περίπου 88% σε πρόσφατη έρευνα ασθενών με NAFLD [4] και άλλης αιτιολογίας κίρρωση[5]. Αφού η αρνητική ενδεικτική τιμή του υαλουρονικού οξέος ( cut-off value of 60 μg/L) είναι πολύ υψηλότερη (98-100%) από την θετική ενδεικτική τιμή (61%) η κύρια χρησιμότητα του υαλουρονικού οξέος έγκειται στην ικανότητα να αποκλείει την προχωρημένη ίνωση και την κίρρωση. Η διεγερμένη σύνθεση του στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα, η έκκριση του στην κοιλιοπεπτική ροή αίματος και ο σύντομος χρόνος ημίσειας ζωής στην κυκλοφορία 2-9 min αποτελούν ικανοποιητικές προϋποθέσεις για να θεωρηθεί έγκυρος βιοδείκτης της ηπατικής ίνωσης [6].

Η λαμινίνη έχει δημοσιευτεί ότι είναι ενδεικτική για την πυλαία υπέρταση αφού έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωση της αυξάνεται σημαντικά στην περίπτωση αυτή [7].

Η συγκέντρωση του TGF-β στον ορό αυξάνεται σε σχέση με την σοβαρότητα της ηπατικής βλάβης και έχει θεωρηθεί ως ένας μη-επεμβατικός βιοδείκτης της ίνωσης [8]. Εν τούτοις η σημαντική συσχέτιση του με την δραστηριότητα της AST και της ALT και το παθοβιοχημικό εύρημα ότι σημαντικά ποσά του βρίσκονται στα ηπατοκύτταρα [9] έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι ο TGF-β μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτη νέκρωσης και όχι ινογένεσης.

Ο αυξητικός παράγοντας του συνδετικού ιστού (CTGF, CCN2), μία σημαντική μεσολαβητική πρωτεΐνη στο ενδοκυττάριο μονοπάτι που κινητοποιεί ο TGF-β, έχει φανεί ότι εκφράζεται αυστηρά στον ινωτικό ιστό του ήπατος [10,11]. Αφού αυτή

είναι μία πρωτεΐνη της οποίας η έκκριση αυξάνεται από τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα και από τα ηπατοκύτταρα σε κατάσταση βλάβης, η αύξηση της συγκέντρωσης της στον ορό ή το πλάσμα μπορεί να είναι λογικά παράμετρος της εξελισσόμενης ινογένεσης. Πράγματι, μία πρόσφατη προκαταρκτική μελέτη ανακοίνωσε όχι μόνο σημαντική αύξηση του CTGF στην κυκλοφορία των ασθενών με ίνωση, αλλά επίσης και συσχέτιση με την ινογένεση αφού τα επίπεδα του CTGF μειώνονται κατά την πλήρη ανάπτυξη του τελικού σταδίου της κίρρωσης [12], στο οποίο η διαδικασία της ινογένεσης έχει σχεδόν τερματιστεί. Το εύρημα αυτό αναδεικνύει τον CTGF ως έναν πολύτιμο βιοδείκτη της ενεργού ινογένεσης, αν και τα δεδομένα αυτά χρειάζονται επιβεβαίωση από μία άλλη πολυπληθέστερη μελέτη.

Οι άμεσες μη επεμβατικές δοκιμασίες έχουν χρησιμοποιηθεί μεμονωμένα ή σε συνδυασμό (π.χ Fibrospect: υαλουρονικό οξύ, TIMP-1, α2-μακροσφαιρίνη) αυξημένης ακρίβειας [13], αλλά επιπλέον μελέτες είναι απαραίτητες για να εκτιμηθεί η απόδοση στην διάγνωση της κίρρωσης και των αλλαγών της ίνωσης [14,15].

Extracellular matrix-related enzymes					
Enzyme	Specimen			Method	Clinical application
	Serum	Urine	Liver biopsy		
Prolylhydroxylase	+	-	+	Radioenzymatic, RIA	(+)
Monoamine-oxidase	+	-	(+)	Enzymatic	-
Lysyloxidase	+	-	+	RIA	-
Lysylhydroxylase	+	-	-	RIA	-
Galactosylhydroxyllysyl-glucosyltransferase	+	-	+	RIA	-
Collagenpeptidase	+	-	+	Enzymatic	-
N-Acetyl-β-D-glucosaminidase	+	+	+	Enzymatic	(+)
Collagen fragments and split products					
Type of collagen	Specimen			Method	Clinical application
	Serum	Urine	Liver biopsy		
Type I-procollagen					
• N-terminal propeptide (PINP)	+	-	+	ELISA	-
• C-terminal propeptide (PICP)	+	-	+	RIA	-
Type III-procollagen	+	-	-		
• Intact procollagen					
• N-terminal propeptide (PIIINP)					
• Complete propeptide (Col 1-3)	+	-	-	RIA	++ sensitivity 78% specificity 81%
• Globular domain of propeptide (Col-1)	+	-	-	RIA	+
Type IV-collagen					
• NC1-fragment [C-terminal] crosslinking domain (PIVP)]	+	+	-	ELISA, RIA	(+)
• 7S domain ("7S collagen")	+	+	-	RIA	(+)
Type VI-collagen	+	+	+	RIA	-
Glycoproteins and matrix-metalloproteinase (inhibitors)					
Marker	Specimen			Method	Clinical application
	Serum	Urine	Liver tissue		
Laminin, P1-fragment	+	-	-	RIA, EIA	(+)
Undulin	+	-	-	EIA	-
Vitronectin	+	-	-	EIA	-
Tenascin	+	-	-	ELISA	-
YKL-40	+	-	+	RIA/ELISA	(+)
(pro) MMP-2 (matrix metalloproteinase)	+	-	-	ELISA	(+)
TIMP-1, TIMP-2	+	-	-	ELISA	(+)
sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule, sCD54)	+	-	-	ELISA	(+)
sVCAM-1 (soluble vascular cell adhesion molecule, sCD106)					
Glycosaminoglycans					
Marker	Specimen			Method	Clinical application
	Serum	Urine	Liver tissue		
Hyaluronic acid (Hyaluronan)	+	-	-	Radioligand assay ELISA	++ sensitivity 86% specificity 88%

**Πίνακας 1.** I Κατηγορία βιοδεικτών ηπατικής ίνωσης. *Clin Chim Acta* 2007;381:107-113

### **7.3. Η κατηγορία δεικτών ίνωσης (έμμεσοι)**

Οι δείκτες της κατηγορίας αυτής έχουν χαρακτηριστεί ως περισσότερο ή λιγότερο απλές εργαστηριακές δοκιμασίες, οι οποίες δεν σχετίζονται στενά με την παθογένεια της ίνωσης, αλλά μεταβάλλονται στον ορό ή το πλάσμα των ασθενών με ίνωση και κίρρωση, αντίστοιχα.

Με την χρήση διαφόρων στατιστικών μοντέλων και μαθηματικών αλγορίθμων π.χ multiple logistic regression analysis, οι παράμετροι αυτοί συλλέγονται έχοντας την καλύτερη διαγνωστική έκβαση για την διάγνωση, την βαθμολόγηση και ιδιαίτερα την σταδιοποίηση της ίνωσης. Μέχρι σήμερα, έχουν προταθεί διάφορες βιοχημικές μετρήσεις και συνδυασμοί παραμέτρων, όπως παράμετροι νέκρωσης (π.χ ALT και AST), δοκιμασίες που σχετίζονται με την πηκτικότητα, πρωτεΐνες μεταφοράς, χολερυθρίνη κ.α (Πίνακας 2). Επίσης συχνή είναι η χρήση του αριθμού των αιμοπεταλίων τα οποία στους κίρρωτικούς ασθενείς μειώνονται λόγω της καταστροφής τους από τον μεγεθυμένο σπλήνα και της μειωμένης σύνθεσης της θρομβοποιητίνης στο μεταβολικά ανεπαρκές ήπαρ.

Οι περισσότερο επικρατέστεροι αλγόριθμοι των πολλαπλών παραμετρικών εκτιμήσεων της ίνωσης είναι το Fibrotest και το Actitest βασισμένα στην απολιποπρωτεΐνη A1, στην απιοσφαιρίνη, στην α2-μακροσφαιρίνη, στην γ-GT, στην ολική χολερυθρίνη και στην ALT (actitest) [16,17], το Wai-score βασισμένο στην AST, στην ALP και στα αιμοπετάλια [18], το ELF-test βασισμένο στον TIMP-1, στο PIIINP και στο υαλουρονικό οξύ [19] και το Hepascore βασισμένο στην χολερυθρίνη, στη γ-GT, στο υαλουρονικό οξύ, στην α2-μακροσφαιρίνη, στην ηλικία και στο φύλο [20].

Ιδιαίτερα το Fibrotest εκτιμήθηκε εκτενέστερα και προτάθηκε ως μία εναλλακτική της βιοψίας ήπατος για τον καθορισμό της σοβαρότητας της χρόνιας λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας C. Πρόσφατα, το Fibrotest αποδείχθηκε καλύτερος προγνωστικός παράγοντας από ότι η βιοψία για της επιπλοκές της HCV και τους θανάτους που οφείλονται σε αυτή. Εν τούτοις, δεν θα μπορούσε να δοθεί έμφαση στην κλινική ανωτερότητα του σε σχέση με την βιοψία ήπατος [21]. Κατά μέσο όρο, μόνο περίπου 40% των αποτελεσμάτων αποδείχθηκε σωστό, ένα μέρος περίπου 50-70% ήταν ανακριβές και ένα μικρό μέρος των αποτελεσμάτων ήταν ακόμα και λάθος [21].

Σύμφωνα με μελέτες οι δείκτες APRI και Forns' έχουν σαν αποτέλεσμα σχεδόν οι μισοί ασθενείς να είναι μη ταξινομημένοι [22-24] και δεν εφαρμόζονται καλά σε ειδικές περιπτώσεις (π.χ ο δείκτης Forns' σε ασθενείς με γονότυπο 3 χρόνιας HCV) [15,25].

Σ' άλλη μελέτη, ο APRI συγκρινόμενος μόνο με τα αιμοπετάλια έχει συγκρίσιμη ακρίβεια για την πρόβλεψη της σημαντικού βαθμού ίνωσης (ROC καμπύλες: 0,80 και 0,71, αντίστοιχα) και κίρρωσης (ROC καμπύλες: 0,90 και 0,89, αντίστοιχα) [26].

Οι Rockey et al. δημοσίευσαν ότι οι έμμεσες μη-επεμβατικές δοκιμασίες, οι οποίες είναι λιγότερο δαπανηρές, έχουν παρόμοια διαγνωστική ακρίβεια με τις άμεσες [15,27].

Έτσι, οι προς το παρόν προτεινόμενες πολυπαραμετρικές μέθοδοι της κατηγορίας II των βιοδεικτών της ίνωσης πρέπει να υιοθετηθούν με προσοχή στην κλινική πράξη. Επί πλέον, τα ανακοινωμένα κατώτερα όρια και οι αλγόριθμοι εξαρτώνται από την τυποποιημένη μέτρηση των συγκεκριμένων αναλυτών που σε παγκόσμια βάση δεν πραγματοποιείται ακόμη [28].

Κάποιοι δείκτες συνδυάζουν άμεσες και έμμεσες μη-επεμβατικές δοκιμασίες (π.χ η μέθοδος Fibrometer συμπεριλαμβάνει αιμοπετάλια, χρόνο προθρομβίνης, AST, α2-μακροσφαιρίνη, ηλικία, ουρία και υαλουρονικό οξύ) [29], ή χρησιμοποιούν σταδιακούς αλγόριθμους για την διάγνωση της σημαντικού βαθμού ίνωσης ή κίρρωσης. Εκτιμήσεις [24,30] έχουν δείξει βελτιωμένη ακρίβεια έναντι των απλών δεικτών, με κάποιες μελέτες να υπαινίσσονται ότι η ανάγκη για βιοψία ήπατος μπορεί να μειωθεί σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των περιπτώσεων [15,24].



Index	Parameters	Chronic liver disease	Sensitivity (%)	Specificity (%)
PGAA-index	Prothrombin time, GGT, apolipoprotein A1, $\alpha_2$ -macroglobulin	Alcohol	79	89
Bonacini-index	ALT/AST-ratio, INR, platelet count	HCV	46	98
Sheth-index	AST/ALT (De Ritis)	HCV	53	100
Park-index		HCV	47	96
PGA-index	Prothrombin time, GGT, apolipoprotein A1	Mixed	91	81
Fortunato-score	Fibronectin, prothrombin time, PCHE, ALT, Mn-SOD, $\beta$ -NAG	HCV		94
Fibrotest (Fibro-score)	Haptoglobin, $\alpha_2$ -macro-globulin, apolipoprotein A1, GGT, bilirubin	HCV HBV	75	85
Pohl-score	AST/ALT-ratio, platelet count	HCV	41	99
Actitest	Fibrotest+ALT	HCV		
Forns-index	Age, platelet count, GGT, cholesterol	HCV	94	51
WAI-index (APRI)	AST, platelet count	HCV	89	75
Rosenberg-score (ELF-score)	PIIINP, hyaluronic acid, TIMP-1	Mixed	90	41
Patel-index	Hyaluronic acid, TIMP-1, $\alpha_2$ -macroglobulin	HCV	77	73
Sud-index (fibrosis probability-index, FPI)	Age, AST, cholesterol, insulin resistance (HOMA), past alcohol intake	HCV	96	44
Leroy-score	PIIINP, MMP-1	HCV	60	92
Fibrometer test	Platelet count, prothrombin index, AST, $\alpha_2$ -macro-globulin, hyaluronic acid, urea, age	Mixed	81	84
Hepascore	Bilirubin, GGT, Hyaluronic acid, $\alpha_2$ -macroglobulin, age, gender	HCV	63	89
Testa-index	Platelet count/spleen diameter-ratio	HCV	78	79
FIB-4	Platelet count, AST, ALT, age	HCV/HIV	70	74

**Πίνακας 2.** Η Κατηγορία βιοδεικτών ηπατικής ίνωσης [16-20], [31-45].

*Clin Chim Acta 2007;381:107-113.*

Οι μη-επεμβατικές δοκιμασίες εκτός από το θέμα της διαγνωστικής ακρίβειας, δεν είναι αντιπροσωπευτικές για άλλα ιστολογικά χαρακτηριστικά όπως η φλεγμονή και η στεάτωση οι οποίες έχουν σημαντική προγνωστική αξία για την εξέλιξη της ίνωσης [46-48]. Επίσης, πολλές μη-επεμβατικές δοκιμασίες δεν είναι ικανές να ανιχνεύσουν το κάθε στάδιο της ίνωσης χωριστά και έως σήμερα ο μεγαλύτερος περιορισμός είναι η ανίχνευση του διάμεσου σταδίου της ίνωσης [49,50].

Όταν εκτιμούμε τις μη-επεμβατικές μεθόδους ή μελετάμε την χρήση τους στην κλινική πράξη, είναι σημαντικό να ελέγχουμε ποιο είναι το βασικό ερώτημα το

οποίο ρωτάμε: αυτό είναι να επιβεβαιώσουμε ή να αποκλείσουμε την κίρρωση, ή με ακρίβεια να σταδιοποιήσουμε την ίνωση χωρίς βιοψία ή να επιβεβαιώσουμε το φυσιολογικό. Αυτά τα διαφορετικά τελικά σημεία θα έχουν διαφορετικές μετρήσεις για τις θετικές και αρνητικές ενδεικτικές τιμές των δοκιμασιών. Δυστυχώς αυτά τα διαφορετικά ερωτήματα δεν έχουν απαντηθεί στην κάθε μελέτη και τα αποτελέσματα έχουν μεταφερθεί εσφαλμένως από την μία κλινική κατάσταση στην άλλη.

Μία άλλη όψη της εκτίμησης των μη-επεμβατικών μεθόδων είναι η έλλειψη της ικανότητας συγκρίσεως του ενδεικτικού σταδίου με το πραγματικό δια μέσου του φάσματος της ίνωσης. Αυτό είναι διαφορετικό από την εκτίμηση της διακριτικής ικανότητας (ROC καμπύλες), η οποία εξαρτάται από την ευαισθησία και την ειδικότητα, όπου στις καμπύλες αυτές στον ένα άξονα καταγράφεται η αληθώς θετική τιμή (ευαισθησία) έναντι της ψευδώς θετικής τιμής (1-ειδικότητα), που καταγράφεται στον άλλο άξονα και συσχετίζεται με την σχετική επίπτωση του σταδίου της ίνωσης [51]. Οι παράμετροι αυτοί καθιστούν ικανή την κατάταξη των ασθενών με διαφορετικά στάδια ίνωσης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην σύγκριση των δοκιμασιών όπως οι Leroy et al. έχουν κάνει [52]. Έτσι η διάκριση μπορεί να είναι πολύ υψηλή εάν η διάκριση είναι <<κίρρωση έναντι φυσιολογικού>>, αλλά οι ίδιες δοκιμασίες έχουν πτωχή ικανότητα εάν η ερώτηση είναι F0/F1 έναντι F2 METAVIR ή υψηλότερο.

## 7.4. Βιβλιογραφία

1. Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1160–74.
2. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clin Chim Acta* 2007; 381:107-113
3. Collazos J, Diaz F. Role of the measurement of serum procollagen type III N-terminal peptide in the evaluation of liver diseases. *Clin Chim Acta* 1994;227:37–43.
4. Lydatakis H, Hager IP, Kostadelou E, Mpousmpoulas S, Pappas S, Diamantis I. Non-invasive markers to predict the liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2006;26:864–71.
5. Guechot J, Laudat A, Loria A, Serfaty L, Poupon R, Giboudeau J. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clin Chem* 1996;42:558–63.
6. Guéchet J, Poupon RE, Poupon R. Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis. *J Hepatol* 1995;22:103–6.
7. Kropf J, Gressner AM, Tittor W. Logistic-regression model for assessing portal hypertension by measuring hyaluronic acid (hyaluronan) and laminin in serum. *Clin Chem* 1991;37:30–5.
8. Flisiak R, Maxwell P, Prokopowicz D, Timms PM, Panasiuk A. Plasma tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and transforming growth factor beta1 — possible non-invasive biomarkers of hepatic fibrosis in patients with chronic B and C hepatitis. *Hepatogastroenterology* 2002;49: 1369–72.

9. Roth S, Michel K, Gressner AM. (Latent) transforming growth factor-beta in liver parenchymal cells, its injury-dependent release and paracrine effects on hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998;27:1003–12.
10. Hayashi N, Kakimura T, Soma Y, et al. Connective tissue growth factor is directly related to liver fibrosis. *Hepatology* 2002;49: 133–5.
11. Abou-Shady M, Friess H, Zimmermann A, et al. Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis. *Liver* 2000;20:296–304.
12. Gressner AM, Yagmur E, Lahme B, Gressner O, Stanzel S. Connective tissue growth factor in serum as a new candidate test for assessment of hepatic fibrosis. *Clin Chem* 2006;52:1815–7.
13. Patel K, Gordon SC, Jacobson I, Hezode C, Oh E, Smith KM, et al. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004;41:935–942.
14. Pinzani M. Non-invasive evaluation of hepatic fibrosis: don't count your chickens before they're hatched. *Gut* 2006;55:310–312.
15. Sebastiani G, Alberti A. Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy. *World J Gastroenterol* 2006;12:3682–3694.
16. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069–75.
17. Poynard T, McHutchison J, Manns M, Myers RP, Albrecht J. Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon alfa-2b and ribavirin. *Hepatology* 2003;38:481–92.
18. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:518–26.

19. Rosenberg WMC, Voelker M, Thiel R, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004;127: 1704–13.
20. Adams LA, Bulsara M, Rossi E, et al. Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem* 2005;51:1867–73.
21. Parkes J, Guha IN, Roderick P, Rosenberg W. Performance of serum marker panels for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006;44: 462–74.
22. Fornis X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002;36:986–992.
23. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:518–526.
24. Sebastiani G, Vario A, Guido M, Noventa F, Plebani M, Pistis R, et al. Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006;44:686–693.
25. Thabut D, Simon M, Myers RP, Messous D, Thibault V, Imbert- Bismut F, et al. Noninvasive prediction of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;37:1220–1221.
26. Lackner C, Struber G, Liegl B, Leibl S, Ofner P, Bankuti C, et al. Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;41:1376–1382.
27. Rockey DC, Bissell DM. Noninvasive measures of liver fibrosis. *Hepatology* 2006;43:S113–S120.
28. Rosenthal-Allieri MA, Peritore ML, Tran A, Halfon P, Benzaken S, Bernard A. Analytical variability of the fibrotest proteins. *Clin Biochem* 2005;38:473–8.

29. Cales P, Oberti F, Michalak S, Hubert-Fouchard I, Rousselet MC, Konate A, et al. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology* 2005;42:1373–1381.
30. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004;127:1704–1713.
31. Naveau S, Poynard T, Benattar C, Bedossa P, Chaput JC. Alpha 2-macroglobulin and hepatic fibrosis. *Dig Dis Sci* 1994;V39:2426–32.
32. Bonacini M, Hadi G, Govindarajan S, Lindsay KL. Utility of a discriminant score for diagnosing advanced fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *AmJ Gastroenterol* 1997;92:1302–4.
33. Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, Chopra S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 1998;93:44–8.
34. Park GJH, Lin BPC, Ngu MC, Jones DB, Katelaris PH. Aspartate aminotransferase: alanine aminotransferase ratio in chronic hepatitis C infection: is it a useful predictor of cirrhosis? *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:386–90.
35. Poynard T, Aubert A, Bedossa P. A simple biological index for detection of alcoholic liver disease in drinkers. *Gastroenterology* 1991;100:1397–402.
36. Teare JP, Greenfield SM, Thompson RPH, et al. Comparison of serum procollagen III peptide concentrations and PGA index for assessment of hepatic fibrosis. *Lancet* 1993;342:895–8.
37. Fortunato G, Castaldo G, Oriani G, et al. Multivariate discriminant function based on six biochemical markers in blood can predict the cirrhotic evolution of chronic hepatitis. *Clin Chem* 2001;47:1696–700.

38. Pohl A, Behling C, Oliver D, Kilani M, Monson P, Hassanein T. Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2001;96: 3142–6.
39. Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002;36:986–92.
40. Patel K, Gordon SC, Jacobson I, et al. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004;41:935–42.
41. Sud A, Hui JM, Farrell GC, et al. Improved prediction of fibrosis in chronic hepatitis C using measures of insulin resistance in a probability index. *Hepatology* 2004;39:1239–47.
42. Leroy V, Monier F, Bottari S, et al. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004;99:271–9.
43. Cales P, Oberti F, Michalak S, et al. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology* 2005;42:1373–81.
44. Testa R, Testa E, Giannini E, et al. Noninvasive ratio indexes to evaluate fibrosis staging in chronic hepatitis C: role of platelet count/spleen diameter ratio index. *J Intern Med* 2006;260:142–50.
45. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006;43:1317–25.
46. Castera L, Hezode C, Roudot-Thoraval F, Bastie A, Zafrani ES, Pawlotsky JM, et al. Worsening of steatosis is an independent factor of fibrosis progression in untreated patients with chronic hepatitis C and paired liver biopsies. *Gut* 2003;52:288–292.

47. Gordon A, McLean CA, Pedersen JS, Bailey MJ, Roberts SK. Hepatic steatosis in chronic hepatitis B and C: predictors, distribution and effect on fibrosis. *J Hepatol* 2005;43:38–44.
48. Perumalswami P, Kleiner DE, Lutchman G, Heller T, Borg B, Park Y, et al. Steatosis and progression of fibrosis in untreated patients with chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2006;43:780–787.
49. Parkes J, Guha IN, Roderick P, Rosenberg W. Performance of serum marker panels for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006;44:462–474.
50. de Franchis R, Dell’era A. Non-invasive diagnosis of cirrhosis and the natural history of its complications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007;21:3–18.
51. Halfon P, Bacq Y, De Muret A, Penaranda G, Bourliere M, Ouzan D, et al. Comparison of test performance profile for blood tests of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007;46:395–402.
52. Leroy V, Hilleret M-N, Sturm N, Trocme C, Renversez J-C, Faure P, et al. Prospective comparison of six non-invasive scores for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007;46:775–782.



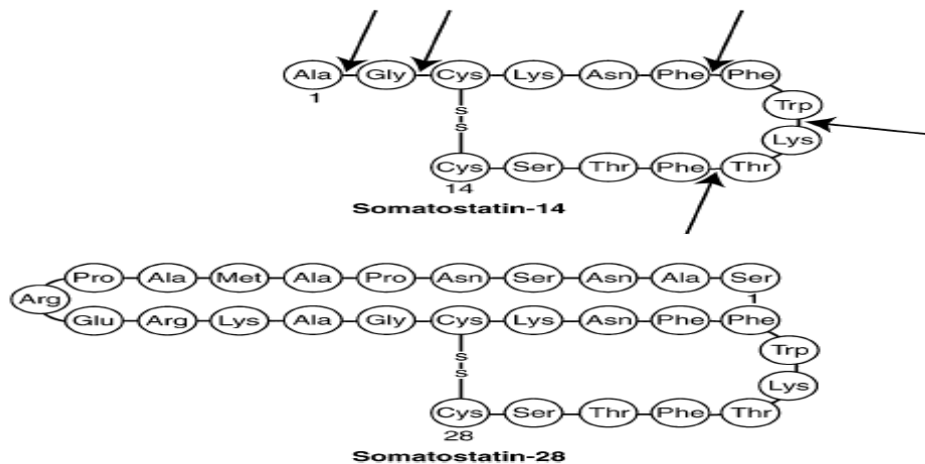
## 8. ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΟΚΤΡΕΟΤΙΔΗ

### 8.1. Σωματοστατίνη

Το 1968 ο Krulich ανέφερε ότι η έκκριση της αυξητικής ορμόνης ρυθμίζεται από υποθαλαμικούς παράγοντες [1].

Το 1973 οι Brazeau et al ανακάλυψαν σε υποθαλαμικά εκχυλίσματα την ύπαρξη ενός κυκλικού δεκατετραπεπτιδίου που είχε την ιδιότητα να αναστέλλει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης από την υπόφυση και στο οποίο δόθηκε αργότερα η ονομασία σωματοστατίνη-14 (SST-14) [2].

Το 1980 αναφέρθηκε ένας δεύτερος φυσικός μοριακός τύπος σωματοστατίνης, η σωματοστατίνη-28 (SST-28), η οποία περιείχε την ακολουθία των αμινοξέων της SST-14 με επιμήκυνση του 14<sup>ου</sup> αμινοξέϊκού υπολοίπου στο N-τελικό άκρο [3][[Εικόνα 1](#)].



**Εικόνα 1.** Πρωτογενής δομή της σωματοστατίνης-14 και της σωματοστατίνης-28. Τα σημεία κλειδιά για την ενζυματική διάσπαση σημειώνονται στην σωματοστατίνη-14 με βέλη. *Ann. Oncol. 2006 Dec17(12); 1733-42.*

Αργότερα και άλλοι μοριακοί τύποι σωματοστατίνης καθορίστηκαν σε πληθώρα ιστικών εκχυλισμάτων, χωρίς όμως να τεκμηριωθεί ο φυσιολογικός τους ρόλος [4]. Έτσι, μέχρι και σήμερα η SST-14 και η SST-18 θεωρούνται τα βασικά βιοδραστικά μέλη μιας φυλογενετικά αρχαίας πολυγονιδιακής οικογένειας

πεπτιδίων, με διαφορετικό φάσμα δραστηριότητας και διαφορετική κατανομή στους διάφορους ιστούς [3].

### **8.1.1. Παραγωγή σωματοστατίνης**

Το γονίδιο της σωματοστατίνης, που είναι τοποθετημένο στο άκρο του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 3 [5], κωδικοποιεί μία πρόδρομη ουσία που ονομάζεται προ-προσωματοστατίνη, η οποία στη συνέχεια διαιρείται, εντός του ενδοπλασματικού δικτύου, στον δεσμό 24-25. Ως αποτέλεσμα της διαιρέσης λαμβάνεται ένα πεπτιδιο-σήμα με έναν υδρόφοβο πυρήνα που εμπλέκεται στην έκκριση και μία προορμόνη αποτελούμενη από 92 αμινοξέα, η προσωματοστατίνη. Η προσωματοστατίνη εξελίσσεται σε σωματοστατίνη-14, είτε απευθείας είτε έμμεσα μέσω της σωματοστατίνης-28 [4,6,7].

Αν και η σωματοστατίνη κατανέμεται ευρέως σε όλους τους ιστούς, ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν ότι το πεπτιδιο απομονώνεται από ορισμένους τύπους κυττάρων.

Συγκεκριμένα, κύτταρα που παράγουν SST αναγνωρίζονται σε όλο το κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα (με εξαίρεση την παρεγκεφαλίδα) [8,9]. Περιοχές πλούσιες σε σωματοστατίνη θεωρούνται ο υποθάλαμος, οι βαθύτερες στοιβάδες του εγκεφαλικού φλοιού, η φαιά ουσία γύρω από τον υδραγωγό, το νεοραβδωτό σώμα και το μεταιχμιακό σύστημα καθώς και όλες οι μείζονες αισθητικές οδοί.

Επιπλέον, μεγάλες ποσότητες σωματοστατίνης αναγνωρίζονται στην ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος και στο έντερο. Στο πεπτικό σύστημα τα κύτταρα που παράγουν σωματοστατίνη είναι είτε 8 κύτταρα στα νησίδια του παγκρέατος και τον εντερικό βλεννογόνο είτε νευρώνες της υποβλεννογονίας στοιβάδας και του μυεντερικού πλέγματος.

Επίσης, σε μικρότερα ποσά η σωματοστατίνη παράγεται στα νεφρά, στα επινεφρίδια, στον προσάτη, στον πλακούντα, στον θυροειδή, στους υπογνάθιους σιελογόνους αδένες, στα καρκινικά κύτταρα και στα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος κατόπιν διέγερσης τους ( π.χ λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, επιθηλιακά κύτταρα του θύμου και κύτταρα του αρθρικού υμένα) [10].

Την έκκριση της σωματοστατίνης επηρεάζουν διάφοροι παράγοντες όπως, νευροπεπτιδία, νευρομεταβιβαστές, κλασσικές ορμόνες, θρεπτικά συστατικά, κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες καθώς και κάποια ιόντα.

Το GABA (gamma-aminobutyric acid) και τα οπιοειδή αναστέλλουν την παραγωγή σωματοστατίνης ενώ το γλυκαγόνο, η σωματοεκλυτίνη (GHRH) , η νευροτενσίνη, η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH), το σχετιζόμενο με το γονίδιο της καλσιτονίνης πεπτιδίο (CGRP) και η μπομπεσίνη διεγείρουν την παραγωγή σωματοστατίνης από διάφορους ιστούς [10,11].

Θρεπτικά συστατικά όπως γλυκόζη, λιπίδια και αμινοξέα επηρεάζουν την έκκριση σωματοστατίνης από τα δ κύτταρα.

Οι θυρεοειδικές ορμόνες και η αυξητική ορμόνη (GH) αυξάνουν την παραγωγή σωματοστατίνης από τον υποθάλαμο. Μικρές δόσεις γλυκοκορτικοειδών αυξάνουν ενώ μεγαλύτερες δόσεις μειώνουν την παραγωγή σωματοστατίνης. Επίσης μία άλλη ορμόνη, η ινσουλίνη, διεγείρει την έκκριση σωματοστατίνης από τον υποθάλαμο και αναστέλλει την σωματοστατίνη του παγκρέατος και του εντέρου [10].

Τέλος, οι κυτταροκίνες IL-1, IL-6, IL-10, TNF-α και INF-γ επάγουν την έκφραση mRNA της σωματοστατίνης ενώ ο TGF-β και η λεπτίνη την αναστέλλουν [12-15].

### **8.1.2. Δράση σωματοστατίνης**

Η σωματοστατίνη δρα στο ΚΝΣ ως νευροδιαβιβαστής και επηρεάζει αντιληπτικές, κινητικές, αισθητικές και λειτουργίες του αυτόνομου νευρικού συστήματος, αναστέλλει την απελευθέρωση ντοπαμίνης από τον μεσεγκέφαλο, νορεπινεφρίνης, θυρεοεκλυτίνης (TRH) και εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης (CRH) από τον υποθάλαμο. Επίσης αναστέλλει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης (GH), της θυρεοτροπίνης (TSH), των ορμονών των παγκρεατικών νησιδίων, της προλακτίνης (PRL) και σχεδόν όλων των ορμονών του γαστρεντερικού συστήματος.

Επιπλέον έχει ανασταλτική δράση στην κινητικότητα και την εξωκρινή λειτουργία (γαστρικό οξύ, πεψίνη, χολή) του γαστρεντερικού συστήματος και αγγειοσυσπαστική δράση στην σπλαχνική κυκλοφορία.

Στον θυρεοειδή αναστέλλει την απελευθέρωση T3, T4 και καλσιτονίνης, στα νεφρά την παραγωγή ρενίνης και την επαναρρόφηση ύδατος από την αντιδιουρητική ορμόνη (ADH), και στα επινεφρίδια την παραγωγή κατεχολαμινών και αλδοστερόνης [10,11].

Στο περιφερικό νευρικό σύστημα η σωματοστατίνη, παραγόμενη από έναν διακριτό πληθυσμό νευρώνων στα γάγγλια της ραχιαίας ρίζας του νωτιαίου μυελού, μεταφέρεται μέσω περιφερικών αισθητικών νευρώνων και απελευθερώνεται από

τελικές αισθητικές νευρικές ίνες σε απάντηση σε αλγογόνο βλαπτικό ερέθισμα [16,17].

Πιστεύεται ότι πολλές από τις δράσεις της σωματοστατίνης βρίσκονται σε αντιδιαστολή με αυτές της ουσίας P που παράγεται επίσης στις τελικές αισθητικές νευρικές ίνες, είναι σημαντικός μεταβιβαστής άλγους και νευρογενούς φλεγμονής και επαγωγέας φλεγμονωδών μεταβιβαστών όπως οι κυτταροκίνες [18-20]. Πράγματι συνθετικά ανάλογα της σωματοστατίνης έχουν αναλγητική δράση όταν χορηγούνται συστηματικά, τοπικά, υποσκληρίδια ή επισκληρίδια [21-23].

Εκτός όμως της νευρορρυθμιστικής της δράσης η σωματοστατίνη έχει και άμεση κατασταλτική επίδραση στην φλεγμονή. Αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων [24,25], μειώνει την κυτταροτοξικότητα των κυττάρων NK [26], αναστέλλει την παραγωγή ανοσοσφαιρινών από τα Β-λεμφοκύτταρα [24], μειώνει την χημειοταξία των λευκοκυττάρων [27] και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και INF $\gamma$  από τα μονοκύτταρα [28,29]. Τέλος αναστέλλει την απελευθέρωση ισταμίνης και την παραγωγή λευκοτριένης D4 από ανοσολογικά διεγερθέντα βασεόφιλα [30].

### **8.1.3. Υποδοχείς σωματοστατίνης και ενδοκυττάρια μεταβίβαση πληροφορίας**

Η δράση της σωματοστατίνης πραγματοποιείται μέσω των σωματοστατινικών υποδοχέων οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια της πλασματοκυτταρικής μεμβράνης

Μέχρι σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί πέντε υπότυποι υποδοχέων συμβολιζόμενοι από SSTR1 έως SSTR5 [31]. Στους υπότυπους αυτούς υπάρχει σημαντική ποικιλία στην αλληλουχία των αμινοξέων με ομολογία 40-50%. Η περιοχή των 7-διαμεμβρανικών επιτόπων διατηρεί σε μεγάλο βαθμό την συνέχεια μεταξύ των υποτύπων ενώ αντιθέτως μεγάλη ποικιλομορφία εκδηλώνεται στις ενδοκυττάριας (G-protein coupled) και εξωκυττάριας (lipid binding) αγκύλες.

Όλοι οι υπότυποι παρουσιάζουν εξίσου υψηλή συγγένεια σύνδεσης με τα φυσικά πεπτίδια SST-14 και SST-18 [32].

Μελέτες υβριδισμού, με ειδικά cRNA για την ανάλυση της ιστικής κατανομής του mRNA των SSTR υποδοχέων σε αρουραίους, ανέδειξαν την ύπαρξη ειδικής κατανομής των διαφόρων υποτύπων στους διαφορετικούς ιστούς [33].

Έτσι αναγνωρίζεται έντονη έκφραση όλων των υποτύπων στο ΚΝΣ με εστίες ειδικής έκφρασης του κάθε υπότυπου. Οι SSTR1 και SSTR2 εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στον ιππόκαμπο, στον φλοιό του υποθαλάμου και στην αμυγδαλή. Ο SSTR3 εκφράζεται ευρέως στην παρεγκεφαλίδα ενώ ο SSTR4 στον ιππόκαμπο, στον φλοιό και στον οσφρητικό βολβό. Τέλος ο SSTR5 ανευρίσκεται στον υποθάλαμο και στις προοπτικές περιοχές [33].

Η υπόφυση και ο σπλήνας εκφράζουν επίσης όλους τους παραπάνω υποδοχείς σε αναλογίες  $SSTR2 > SSTR1 = SSTR3 > SSTR5 > SSTR4$  για την υπόφυση και  $SSTR3 > SSTR1 = SSTR4 = SSTR5 > SSTR2$  για τον σπλήνα.

Ο στόμαχος εκφράζει όλους τους υποδοχείς εκτός του SSTR5 και το λεπτό έντερο όλους εκτός του SSTR2. Τα νεφρά εκφράζουν SSTR3 και SSTR4 ενώ το ήπαρ SSTR3 και το πάγκρεας SSTR2 [33]. Ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος όπως μακροφάγα, Β και Τ λεμφοκύτταρα και θυμοκύτταρα του ποντικού εκφράζουν κυρίως SSTR2 [34]. Τέλος πολλοί τύποι καλόηθων ή κακόηθων νεοπλασιών εκφράζουν συνήθως παραπάνω από έναν υπότυπο υποδοχέα [35].

Οι σωματοστατινικοί υποδοχείς, με την σειρά τους, ρυθμίζουν την ενδοκυττάρια λειτουργία με cAMP εξαρτώμενους [36,37] και μη εξαρτώμενους μηχανισμούς [38] που συνδέονται με G-πρωτεΐνες.

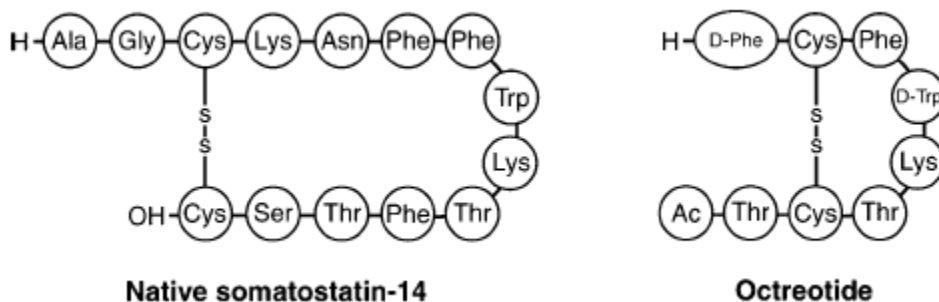
Στους cAMP-μη εξαρτώμενους μηχανισμούς περιλαμβάνονται οι δίαυλοι K και Ca, η αντλία Na/H, η φωσφολιπάση C και A2, η κινάση MAP (MAPK) καθώς και φωσφατάσες τυροσίνης.

## **8.2. Οκτρεοτίδη**

### **8.2.1. Δομή**

Παρά το ευρύ φάσμα της φαρμακολογικής της δράσης η σωματοστατίνη μειονεκτεί στην επιτυχή και πλήρη χρησιμοποίηση της θεραπευτικής της δυνατότητας λόγω, της μικρής μεταβολικής της σταθερότητας (μικρός χρόνος ημίσειας ζωής) που καθιστά αναγκαία την συνεχή ενδοφλέβια έγχυση, και του φαινομένου της παλίνδρομης επαγωγής μερικών ορμονών που ακολουθούν την χορήγηση της (π.χ αυξητική ορμόνη, ινσουλίνη, γλουκαγόνη) [39]. Για τους λόγους αυτούς επιτακτική ήταν η ανάγκη σύνθεσης αναλόγων με μεγαλύτερη μεταβολική σταθερότητα αλλά και μεγαλύτερη ειδικότητα σε διαφορετικούς υπότυπους σωματοστατινικών υποδοχέων.

Υστερα από μελέτες της δομής του μορίου της σωματοστατίνης -14 διαπιστώθηκε ότι για την βιολογική δράση της είναι αναγκαία η αλληλουχία των αμινοξέων Phe<sup>7</sup>, Trp<sup>8</sup>, Lys<sup>9</sup> και Thr<sup>10</sup> που σχηματίζουν β στροφή (ιδιαίτερος των Lys<sup>9</sup>, Thr<sup>10</sup>), γεγονός που οδήγησε τους ειδικούς στην διατήρηση των αλληλουχιών αυτών και στην προσθήκη μόνο κάποιων άλλων που σταθεροποιούν την β στροφή αλλά και αυξάνουν την ανθεκτικότητα του νέου μορίου στην ενζυμική πρωτεολυτική δράση. Μέχρι σήμερα είναι διαθέσιμα περισσότερα από 30 συνθετικά ανάλογα από τα οποία όμως η οκτρεοτίδη (SMS 201-995) έχει μελετηθεί εκτενέστερα σε ένα μεγάλο εύρος ενδοκρινικών, γαστρεντερικών και ογκολογικών ενδείξεων [40,41] [Εικόνα 2].



**Εικόνα 2.** Η χημική δομή της φυσικής σωματοστατίνης-14 και του συνθετικού αναλόγου της, οκτρεοτίδης. *Ann Oncol Dec 2006 17(12); 1733–4.*

### 8.2.2. Φαρμακοκινητική

Η αυξημένη αντοχή της οκτρεοτίδης στην μεταβολική διάσπαση έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ημίσειας ζωής της, σε σχέση με την φυσική ορμόνη.

Σύμφωνα με μελέτες, μετά από i.v χορήγηση οκτρεοτίδης (25, 50, 100, 200 µg) οι συγκεντρώσεις στον ορό σε σχέση με τον χρόνο παρουσιάζουν διφασικά χαρακτηριστικά με αποτέλεσμα ο πρώτος χρόνος ημίσειας ζωής να είναι από 9±2 min (25µg) - 14±4 min (200µg) και ο δεύτερος να κυμαίνεται από 72±22 min (25µg) - 93±37 min (200µg).

Μετά από s.c χορήγηση ίδιων δόσεων οκτρεοτίδης, ο χρόνος ημίσειας ζωής που έχει μονοφασικό χαρακτήρα είναι 88±20 min (25µg) - 102±16 min (200µg).

Συμπερασματικά ο χρόνος ημίσειας ζωής ανεξαρτήτως του τρόπου χορήγησης είναι 30 φορές μεγαλύτερος για την οκτρεοτίδη έναντι της φυσικής σωματοστατίνης [42].

Δεδομένου όμως ότι η οκτρεοτίδη μεταβολίζεται από το ήπαρ μελέτες ανέδειξαν ότι στους κίρρωτικούς ασθενείς ο χρόνος ημίσειας ζωής της αυξάνεται σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές και πάντα σε συνάρτηση με την βαρύτητα της ηπατικής νόσου (Child Pugh) [43].

### **8.2.3. Δράση**

Οι μεταβολές της δραστικότητας της οκτρεοτίδης έναντι της φυσικής σωματοστατίνης οφείλονται στην διαφορετική συνδυαστική συγγένεια για τους διάφορους υπότυπους των υποδοχέων της σωματοστατίνης στα δραστικά κύτταρα και στην αύξηση του χρόνου ημίσειας ζωής.

Από τους 5 σωματοστατινικούς υποδοχείς που έχουν κλωνοποιηθεί μέχρι σήμερα, μόνο η σωματοστατίνη-14 και η σωματοστατίνη-28 επιδρούν σε όλους (44,45). Η οκτρεοτίδη έχει υψηλή συνδυαστική συγγένεια για τους υποδοχείς SSTR2 και SSTR5, σχεδόν ισοδύναμη με αυτή της φυσικής ορμόνης, μέτρια για τον SSTR3 και μικρή ή καθόλου για τους SSTR1 SSTR4 [10].

Εν τούτοις σε μερικές περιπτώσεις η οκτρεοτίδη εμφανίζει μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι της σωματοστατίνης ως προς ορισμένες λειτουργίες, όπως η αναστολή της έκκρισης αυξητικής ορμόνης, παρά την παρόμοια συνδυαστική ικανότητα που έχει για τους υποδοχείς γεγονός που καταμαρτυρεί ότι η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα του αναλόγου είναι αποτέλεσμα της αντοχής του στον μεταβολισμό [46].

Εκτός από την αναστολή της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης αναστέλλει ισχυρότερα και την έκκριση της ινσουλίνης και γλυκαγόνης ενώ δεν παρατηρείται έντονα το φαινόμενο της παλίνδρομης επαγωγής των ορμονών αυτών από την χορήγηση της οκτρεοτίδης [47,48].

Η οκτρεοτίδη είναι το πλέον χρησιμοποιημένο συνθετικό ανάλογο στην κλινική πράξη. Μέχρι σήμερα έχει χορηγηθεί θεραπευτικά με επιτυχία σε νευροενδοκρινικούς όγκους και σε αδenoκαρκινώματα θετικά για υποδοχείς σωματοστατίνης, σε ορμονοπαραγωγά αδενώματα της υπόφυσης, σε μεταστατικό καρκινοειδές ή όγκους παγκρεατικών νησιδίων, σε αιμορραγία κίρρωσης οισοφάγου

καθώς και σε καταστάσεις που συνοδεύονται από διάρροια ανθεκτική στην αντιβιοτική αγωγή (π.χ AIDS) [49-54].

### **8.3. Οκτρεοτίδη και ηπατική ίνωση**

Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον η επίδραση της σωματοστατίνης και των συνθετικών αναλόγων της, στον μηχανισμό της ηπατικής ινογένεσης και συγκεκριμένα στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα και στα κύτταρα του Kupffer.

Σχετικά με τα ηπατικά αστεροειδή οι ερευνητές που ασχολούνται στο πεδίο της ηπατικής ίνωσης επικεντρώνονται στην αναστολή της ενεργοποίησης και του πολλαπλασιασμού τους [55].

Μελέτες έχουν αναδείξει ότι η σωματοστατίνη μπορεί να συγκρατήσει και να μειώσει την διαδικασία της ηπατικής ίνωσης σε μοντέλα ηπατικής κίρρωσης αρουραίων [27,56,57].

Οι Chatterjee et al. βρήκαν ότι σε μοντέλο ηπατικής κίρρωσης αρουραίων από οξισοσωμίαση η σωματοστατίνη μπορεί να έχει άμεση αντιϊνωτική δράση ρυθμίζοντας την σύνθεση και την έκφραση του κολλαγόνου I, III και της SMA των ηπατικών αστεροειδών [58].

Επίσης, οι Reynaert et al. απέδειξαν ότι η σωματοστατίνη μπορεί να καταστείλει την σύσπαση των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων των αρουραίων, η οποία επάγεται από την ενδοθηλίνη-1 [59].

Όλα αυτά τα ευρήματα υπαινίσσονται ότι υπάρχουν SSTRs στην επιφάνεια των αστεροειδών κυττάρων, διά των οποίων η σωματοστατίνη μπορεί να ασκήσει την δράση της στα ηπατικά αστεροειδή.

Την υπόνοια αυτή επιβεβαιώνουν οι Sheng-Han Song et al. οι οποίοι απέδειξαν την έκφραση των SSTR2, SSTR3 και SSTR5 στα ηπατικά αστεροειδή των SD αρουραίων αλλά όχι των SSTR1 και SSTR4 καθώς και την ικανότητα της οκτρεοτίδης να συνδέεται με τα ηπατικά αστεροειδή. Επίσης, βρήκαν ότι τα επίπεδα των SSTR2 mRNA ήταν ποσοτικά σημαντικά υψηλότερα από ότι των άλλων υποτύπων [60].

Άλλες μελέτες δημοσιεύουν ότι η οκτρεοτίδη έχει ειδική συγγένεια για τους SSTR2 και SSTR5 [10,61].



Σε πρόσφατη μελέτη έχει εξετασθεί η παραγωγή προ- και αντι-ινωτικών παραγόντων από απομονωμένα κύτταρα του Kupffer αρουραίων μετά από επώαση με λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και οκτρεοτίδη [62].

Τα ευρήματα της μελέτης υποδεικνύουν ότι τα κύτταρα του Kupffer δεν παράγουν λεπτίνη και MMP-2 ούτε πριν ούτε μετά την διέγερση με LPS, ενώ αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής TGF-β1 ακόμη και πριν οποιαδήποτε διέγερση [62], όπως έχει δημοσιευθεί και σε άλλες μελέτες [63]. Η διέγερση από την LPS έχει σαν αποτέλεσμα την ιδιαίτερα σημαντική μείωση της παραγωγής του TGF-β1, αλλά το πολύ σημαντικό εύρημα αυτής της μελέτης είναι η σημαντική μείωση της παραγωγής TGF-β προκαλούμενη από την επώαση με οκτρεοτίδη. Η επίδραση αυτή στην κύρια κυτταροκίνη που εμπλέκεται στη αναδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας είναι μεγάλης σημασίας. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η οκτρεοτίδη αναστέλλει την παραγωγή TGF-β1 τουλάχιστον στους αρουραίους και κατά συνέπεια εάν παρόμοια επίδραση αποδειχθεί και στα ανθρώπινα κύτταρα του Kupffer η ορμόνη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική για την μείωση της ηπατικής ίνωσης.

Στην ίδια μελέτη τα ευρήματα σχετικά με την παραγωγή της κολλαγενάσης (MMP-1), ενός βασικού ενζύμου στην αποδόμηση του εναποτιθέμενου κολλαγόνου στο ήπαρ, είναι ότι η οκτρεοτίδη πρώιμα, επάγει σημαντικά την παραγωγή MMP-1 από τα κύτταρα του Kupffer και υπάρχει συνεργική δράση με την LPS [62]. Αφού η ενδοτοξιναιμία είναι πολύ συχνό εύρημα στους κίρρωτικούς ασθενείς, το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η οκτρεοτίδη μπορεί να έχει ωφέλιμη επίδραση στην ηπατική ίνωση αφού όχι μόνο μειώνει την παραγωγή TGF-β1 αλλά επίσης ευνοϊκά επιδρά στην κολλαγονολυτική διαδικασία. Η επίδραση της οκτρεοτιδης στην παραγωγή MMP-1 από τα κύτταρα του Kupffer είναι παρόμοια με την δημοσιευμένη αύξηση στην MMP-13 και MMP-9 από τα κύτταρα του Kupffer μετά από επώαση με gadolinium chloride [64].

Επιπλέον, η παραγωγή του uPA από τα κύτταρα του Kupffer αυξήθηκε σημαντικά μετά από επώαση με LPS ή οκτρεοτίδη [62]. Ο uPA εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της προ-MMP-9 σε MMP-9 διά μέσου της πλασμίνης [65]. Είναι λογικό επομένως να υποτεθεί ότι ο uPA των κυττάρων του Kupffer εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της MMP-9, ενός άλλου βασικού ενζύμου στην αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας. Εν τούτοις, η επίδραση της οκτρεοτιδης στην παραγωγή της

MMP-9 διαφέρει έναντι της MMP-1 καθώς η οκτρεοτίδη μειώνει την παραγωγή της MMP-9 παρά την αύξηση στην παραγωγή uPA. Επομένως, η άμεση καταστολή της παραγωγής MMP-9, μπορεί να έχει δυσμενή επίδραση στην ίνωση, αλλά χρήσιμη στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, υπόθεση η οποία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Η MMP-9 μπορεί να έχει επίπτωση στην διασπορά των ηπατικών όγκων μέσω της καταστροφής του κολλαγόνου της βασικής μεμβράνης. Επομένως, αυτή η δράση της οκτρεοτίδης μπορεί μερικώς να εξηγήσει την ευνοϊκή απάντηση στην οκτρεοτίδη στους ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο, όπως έχει παλαιότερα δημοσιεύσει [66,67].

## 8.4. Βιβλιογραφία

1. Krulich L, Dhariwal AP, McCann SM. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology* 1968;83:783-790.
2. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973;179:77-79.
3. Pradayrol L, Jornvall H, Mutt V, Ribet A. N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett* 1980;109:55-58.
4. Benoit R. Peptides derived from mammalian prosomatostatin. In: Reichlen S, ed. *Somatostatin*. New York: Plenum, 1987:33-50.
5. Naylor SL, Sakaguchi AY, Shen LP, Bell GI, Rutter WJ, Shows TB. Polymorphic human somatostatin gene is located on chromosome 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:2686-2689.
6. Epelbaum J. Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol* 1986;27:63-100.
7. Noe BD, Spiess J. Evidence fore biosynthesis and differential post-translational proteolytic processing of different (pre)prosomatostatins in pancreatic islets. *J Biol Chem* 1983;258:1121-1128.
8. Finley JC, Maderdrut JL, Roger LJ, Petrusz P. The immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1981;6:2173-2192.
9. Johansson O, Hokfelt T, Elde RP. Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience* 1984;13:265-339.

10. Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999;20:157-198.
11. Epelbaum J, Dournaud P, Fodor M, Viollet C. The neurobiology of somatostatin. *Crit Rev Neurobiol* 1994;8:25-44.
12. Scarborough DE, Lee SL, Dinarello CA, Reichlin S. Interleukin-1 beta stimulates somatostatin biosynthesis in primary cultures of fetal rat brain. *Endocrinology* 1989;124:549-551.
13. Elliott DE, Blum AM, Li J, Metwali A, Weinstock JV. Preprosomatostatin messenger RNA is expressed by inflammatory cells and induced by inflammatory mediators and cytokines. *J Immunol* 1998;160:3997-4003.
14. Quintela M, Senaris R, Heiman ML, Casanueva FF, Dieguez C. Leptin inhibits in vitro hypothalamic somatostatin secretion and somatostatin mRNA levels. *Endocrinology* 1997;138:5641-5644.
15. 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;138:4401-4409.
16. Reichlin S. Somatostatin. *N Engl J Med* 1983;309:1495-1501.
17. Reichlin S. Somatostatin (second of two parts). *N Engl J Med* 1983;309:1556-1563.
18. Gazelius B, Brodin E, Olgart L, Panopoulos P. Evidence that substance P is a mediator of antidromic vasodilatation using somatostatin as a release inhibitor. *Acta Physiol Scand* 1981;113:155-159.
19. Brodin E, Gazelius B, Lundberg JM, Olgart L. Substance P in trigeminal nerve endings: occurrence and release. *Acta Physiol Scand* 1981;111:501-503.
20. Dickerson C, Udem B, Bullock B, Winchurch RA. Neuropeptide regulation of proinflammatory cytokine responses. *J Leukoc Biol* 1998;63:602-605.

21. Chan AW, Williams G, MacFarlane IA, Bowsher D. Octreotide, a long-acting somatostatin analogue, in diabetic neuropathic pain. *Horm Res* 1991;36:86-87.
22. Recht LD, Abrams GM. Neuropeptides and their role in nociception and analgesia. *Neurol Clin* 1986;4:833-852.
23. Caleri D, Marabini S, Panconesi A, Pietrini U. A pharmacological approach to the analgesizing mechanism of somatostatin in cluster headache. *Ric Clin Lab* 1987;17:155-162.
24. Stanis A, Scicchitano R, Stead R, Matsuda H, Tomioka M, Denburg J, Bienenstock J. Neuropeptides and immunity. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:S48-S51.
25. Payan DG, Goetzl EJ. Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. *J Immunol* 1985;135:783s-786s.
26. Agro A, Padol I, Stanis AM. Immunomodulatory activities of the somatostatin analogue BIM 23014c: effects on murine lymphocyte proliferation and natural killer activity. *Regul Pept* 1991;32:129-139.
27. Karalis K, Mastorakos G, Chrousos GP, Tolis G. Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo. *J Clin Invest* 1994;93:2000-2006.
28. Muscettola M, Grasso G. Somatostatin and vasoactive intestinal peptide reduce interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunobiology* 1990;180:419-430.
29. Peluso G, Petillo O, Melone MA, Mazzarella G, Ranieri M, Tajana GF. Modulation of cytokine production in activated human monocytes by somatostatin. *Neuropeptides* 1996;30:443-451.
30. Goetzl EJ, Payan DG. Inhibition by somatostatin of the release of mediators from human basophils and rat leukemic basophils. *J Immunol* 1984;133:3255-3259.

31. Reisine T. Somatostatin receptors. *Am J Physiol* 1995;269:G813-G820.
32. Csaba Z, Dournaud P. Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides* 2001;35:1-23.
33. Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinology* 1993 ;133:2561-2567.
34. 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: 1180-1186.
35. Patel YC. Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *J Endocrinol Invest* 1997; 20:348-367.
36. Bausher LP, Horio B. Neuropeptide Y and somatostatin inhibit stimulated cyclic AMP production in rabbit ciliary processes. *Curr Eye Res* 1990; 9:371-378.
37. McNellis EL, Bausher LP. Stimulatory and inhibitory cyclic AMP responses in rabbit ciliary processes after cervical ganglionectomy. *Curr Eye Res* 1991;10:399-407.
38. Luft R, Efendic S, Hokfelt T. Somatostatin--both hormone and neurotransmitter? *Diabetologia* 1978;14:1-13.
39. Guillemin R. Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron. *Science* 1978;202:390-402.
40. Veber DF, Freidlinger RM, Perlow DS, Paleveda WJ, Jr., Holly FW, Strachan RG, Nutt RF, Arison BH, Homnick C, Randall WC, Glitzer MS, Saperstein R, Hirschmann R. A potent cyclic hexapeptide analogue of somatostatin. *Nature* 1981;292:55-58.

41. Rosenthal LE, Yamashiro DJ, Rivier J, Vale W, Brown M, Dharmasathaphorn K. Structure-activity relationships of somatostatin analogs in the rabbit ileum and the rat colon. *J Clin Invest* 1983;71:840-849.
42. Kutz K, Nuesch E, Rosenthaler J. Pharmacokinetics of SMS 201-995 in healthy subjects. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1986;119:65-72.
43. Jenkins SA, Nott DM, Baxter JN. Pharmacokinetics of octreotide in patients with cirrhosis and portal hypertension; relationship between the plasma levels of the analogue and the magnitude and duration of the reduction in corrected wedged hepatic venous pressure. *HPB Surg* 1998;11:13-21.
44. Luini A, De Matteis MA. Evidence that receptor-linked G protein inhibits exocytosis by a post-second-messenger mechanism in AtT-20 cells. *J Neurochem* 1990;54:30-38.
45. Lee MT, Liebow C, Kamer AR, Schally AV. Effects of epidermal growth factor and analogues of luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin on phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine residues of specific protein substrates in various tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1656-1660.
46. Fricker G, Bruns C, Munzer J, Briner U, Albert R, Kissel T, Vonderscher J. Intestinal absorption of the octapeptide SMS 201-995 visualized by fluorescence derivatization. *Gastroenterology* 1991;100:1544-1552.
47. 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;60:1161-1165.
48. Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. Octreotide. *N Engl J Med* 1996;334:246-254.
49. Lamberts SW. The role of somatostatin in the regulation of anterior pituitary hormone secretion and the use of its analogs in the treatment of human pituitary tumors. *Endocr Rev* 1988;9:417-436.

50. Kvols LK, Buck M, Moertel CG, Schutt AJ, Rubin J, O'Connell MJ, Hahn RG. Treatment of metastatic islet cell carcinoma with a somatostatin analogue (SMS 201-995). *Ann Intern Med* 1987;107:162-168.
51. Kvols LK. Metastatic carcinoid tumors and the malignant carcinoid syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1994;733:464-470.
52. Kouroumalis EA. Octreotide for cancer of the liver and biliary tree. *Chemotherapy* 2001;47 Suppl 2:150-161.
53. Goulis J, Burroughs AK. Role of vasoactive drugs in the treatment of bleeding oesophageal varices. *Digestion* 1999;60 Suppl 3:25-34.
54. Farthing MJ. The role of somatostatin analogues in the treatment of refractory diarrhoea. *Digestion* 1996;57 Suppl 1:107-113.
55. Liu XJ, Yang L, Mao YQ, Wang Q, Huang MH, Wang YP, Wu HB. Effects of the tyrosine protein kinase inhibitor genistein on the proliferation, activation of cultured rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 739-745
56. Fort J, Oberti F, Pilette C, Veal N, Gallois Y, Douay O, Rousselet MC, Rosenbaum J, Cales P. Antifibrotic and hemodynamic effects of the early and chronic administration of octreotide in two models of liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1998; 28: 1525-1531
57. Wang J, Gong H, Wang Y. Experimental study on the preventive effect of octreotide on liver fibrosis. *Zhonghua Gandan Waiké Zazhi* 2003; 2: 100-102
58. Chatterjee S, Van Marck E. The role of somatostatin in schistosomiasis: a basis for immunomodulation in host-parasite interactions? *Trop Med Int Health* 2001; 6: 578-581
59. Reynaert H, Vaeyens F, Qin H, Hellemans K, Chatterjee N, Winand D, Quartier E, Schuit F, Urbain D, Kumar U, Patel YC, Geerts A. Somatostatin suppresses Endothelin1-induced rat hepatic stellate cell contraction via somatostatin receptor subtype 1. *Gastroenterology* 2001; 121: 915-930



60. Song SH, Leng XS, Li T, Qin ZZ, Peng JR, Zhao L, Wei YH, Yu X. Expression of subtypes of somatostatin receptors in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10(11):1663-1665.
61. Pawlikowski M, Melen-Mucha G. Perspectives of new potential therapeutic applications of somatostatin analogs. *Neuroendocrinol Lett* 2003; 24: 21-27
62. Xidakis C, Ljumovic D, Manousou P, Notas G, Valatas V, Kolios G, Kouroumalis E. Production of pro- and anti-fibrotic agents by rat Kupffer cells; the effect of octreotide. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 935-941
63. Luckey SW, Petersen DR: Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. *Exp Mol Pathol* 71:226–240, 2001
64. 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* 72:943–959, 2003
65. Leyland H, Gentry J, Arthur MJ, Benyon RC: The plasminogenactivating system in hepatic stellate cells. *Hepatology* 24:1172– 1178, 1996
66. Kouroumalis E, Skordilis P, Thermos K, Vasilaki A, Moschandrea J, Manousos ON: Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomised controlled study. *Gut* 42:442–447, 1998
67. Samonakis DN, Moschandreas J, Arnaoutis T, Skordilis P, Leontidis C, Vafiades I, Kouroumalis E: Treatment of hepatocellular carcinoma with long acting somatostatin analogues. *Oncol Rep* 9:903–907, 2002

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

# 1. ΥΛΙΚΑ

**HEPES** ( 4- (2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid ) της εταιρείας MERCK, Darmstadt Germany.

## **PBS (Phosphate Buffered Saline)**

Το διάλυμα αποτελούνταν από 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$ , και 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH: 7.4-7.6.

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

Το διάλυμα αποτελούνταν από 50mM Tris, 150mM NaCl και ρυθμιζόταν με σταγόνες πυκνού HCl ώστε pH: 7.6.

**Καλλιεργητικά τρυβλία και αναλώσιμα πλαστικά καλλιέργειας** των εταιρειών Corning-Costar, Acton, USA και Nalge Nunc International, UK.

**Pronase** (7 U/mg, nuclease-free, *Streptomyces griseus*) της εταιρείας Roche, Mannheim, Germany. Αποθηκευόταν σε κλάσματα στους  $4^\circ\text{C}$  και διαλυόταν σε στείρο GBSS ή HBSS την ημέρα της κυτταρικής απομόνωσης.

**Collagenase B** (>0.15U/mg, από καλλιέργειες *Clostridium Histolyticum*) της Roche. Αποθηκευόταν σε κλάσματα στους  $4^\circ\text{C}$  και διαλυόταν σε στείρο HBSS την ημέρα της κυτταρικής απομόνωσης.

## **Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)**

HBSS (10X) (GibcoBRL). Για την κατασκευή του διαλύματος 100ml HBSS (10X) διαλυόταν σε 800ml αποσταγμένο στείρο νερό στα οποία προσθέτονταν 9ml στείρου διαλύματος 7%  $\text{NaHCO}_3$  (GibcoBRL) και 4ml στείρου διαλύματος 1M HEPES (GibcoBRL) για την ρύθμιση του pH :7.4.

**Hank's Balanced Salt Solution w/o  $\text{Ca}^{++}$  / $\text{Mg}^{++}$  (HBSS w/o  $\text{Ca}^{++}$  / $\text{Mg}^{++}$  )** HBSS w/o  $\text{Ca}^{++}$  / $\text{Mg}^{++}$  (10X) (GibcoBRL). Η κατασκευή του τελικού διαλύματος πραγματοποιούνταν όπως παραπάνω.

**DNase I** (πάγκρεας μόσχου) της εταιρείας Roche. Αποθηκευόταν σε κλάσματα στους  $4^\circ\text{C}$  και διαλυόταν σε στείρο GBSS ή HBSS την ημέρα της κυτταρικής απομόνωσης.

**Optiprep** της εταιρείας Nycomed-Pharma. Αποθηκευόταν στους 4°C προστατευμένο από το φως. 25 ml Optiprep αναμιγνυόταν με 26 ml HBSS την ημέρα της κυτταρικής απομόνωσης για την κατασκευή διαλύματος 29.4% Iodixanol (1.159 gr/ml).

**Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)** εμπλουτισμένο με L-glutamine, 4500mg/ml D-glucose, 25mM HEPES(GibcoBRL) και διάλυμα αντιβιοτικών 100U/ml Penicillin/Streptomycin (GibcoBRL) χρησιμοποιήθηκε για τις κυτταρικές καλλιέργειες. Το καλλιεργητικό μέσο χρησιμοποιούταν με ή χωρίς την προσθήκη 10% απενεργοποιημένου ορού εμβρύου μόσχου (Foetal Calf Serum, FCS) (GibcoBRL).

**ELISA kits DuoSet® ELISA Development System, human TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3, Leptin, Activin A, TIMP-1** της εταιρείας R&D Systems (Abingdon/England).

**QuantiMatrix™ HUMAN LAMININ ELISA KIT** της εταιρείας CHEMICON® INTERNATIONAL

**ELISA kit Serum Collagen IV EIA** της εταιρείας Biotrin International (Dublin/Ireland)

**ELISA kit Hyaluronic Acid (HA) Test Kit** της εταιρείας Corgenix (Peterborough/England)

**ELISA kit Enzolyte™ 520 Generic MMP Assay Kit \*Fluorimetric\*** της εταιρείας AnaSpec (San Jose CA/USA)

**PBS** – 137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2-7.4

**Wash Buffer** – 0.05% Tween® 20 σε PBS, pH 7.2-7.4 (R&D Systems Catalog # WA 126) (Abingdon/England)

**Block Buffer** – 5% Tween® 20 σε PBS με 0.05% NaN<sub>3</sub>

**Reagent Diluent** – 1% BSA σε PBS, pH 7.2-7.4 (R&D Systems Catalog # DY 995) (Abingdon/England)

**Substrate Solution** – 1:1 ανάμιξη του Color Reagent A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και του Color Reagent B (Tetramethylbenzidine) (R&D Systems Catalog # DY 999) (Abingdon/England)

**Stop Solution** – 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (R&D Systems Catalog # DY 994) (Abingdon/England)

**ELISA plate** – Costar EIA Plate (Costar Catalog # 2592)

**ELISA plate sealers** – (R&D Systems Catalog # DY 992) (Abingdon/England)

**6 M Urea** - σε PBS, pH 5.0-5.8 (προετοιμαζόταν αμέσως πριν από την χρήση)

**2.5 N Acetic Acid/10 M Urea** – σε 100 ml αποσταγμένο νερό προσθέτονταν 150.2 gr Urea και 35.9 ml Glacial Acetic Acid. Το διάλυμα χρησιμοποιούταν για την ενεργοποίηση των δειγμάτων ορμού στις ELISA: DuoSet® ELISA Development System, human TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3.

**2.7 N NaOH/1 M HEPES** – σε 140 ml αποσταγμένο νερό προσθέτονταν 67.5 ml 10N NaOH και 59.5 gr HEPES. Το διάλυμα χρησιμοποιούταν για την ενεργοποίηση των δειγμάτων ορμού στις ELISA: DuoSet® ELISA Development System, human TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3.

**Thermo Scientific Fast Red Substrate System** (Catalog # TA-060-AF) της εταιρείας Thermo Scientific.

**Thermo Scientific UltraVision LP Large Volume Detection System AP Polymer (Ready-To-Use)** (Catalog # TL-060-AL) της εταιρείας Thermo Scientific.

**Ammonium Hydroxide ACS - Reagent** της εταιρείας SIGMA

**Mayer's hematoxylin solution** της εταιρείας SIGMA-ALDRICH

**Bufferr EDTA** – σε 1 lt αποσταγμένο νερό προσθέτονταν 0.37 gr EDTA (Disodium Salt Dihydrate) της εταιρείας Thermo και ρυθμιζόταν με σταγόνες 1N NaOH ώστε pH 8.0

## 2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Στην μελέτη των πρωτεϊνών Λαμινίνης, Υαλουρονικού οξέος, Κολλαγόνου IV, Λεπτίνης καθώς και των ισομορφών του TGFβ έλαβαν μέρος συνολικά 172 ασθενείς [Πίνακας 1].

62 ασθενείς διεγνώσθη ότι έπασχαν από ΠΧΚ (35 σταδίου I-II και 27 σταδίου III-IV σύμφωνα με την ταξινόμηση Ludwig). Όλοι μελετήθηκαν πριν και έξι μήνες μετά την θεραπεία με ουρσοδεοξυχολικό οξύ σε δοσολογία 13-15mg/Kg σωματικού βάρους.

38 ασθενείς είχαν ηπατοκυτταρικό καρκίνο σε έδαφος HCV κίρρωσης και μελετήθηκαν πριν και έξι μήνες μετά την θεραπεία με σωματοστατίνη μακράς δράσης (Octreotide LAR 30 mg/μηνιαίως).

28 ασθενείς έπασχαν από HCV κίρρωση και μελετήθηκαν πριν και έξι μήνες μετά από θεραπεία με σωματοστατίνη μακράς δράσης η οποία χορηγήθηκε στα πλαίσια πραγματοποίησης πρωτοκόλλου προφύλαξης από κίρρωση.

44 ασθενείς είχαν χρόνια HCV ηπατίτιδα, γονότυπο 1, και ταξινομήθηκαν σύμφωνα με την ταξινόμηση Ishak. Αυτοί μελετήθηκαν πριν και μετά από 18 μήνες θεραπεία με PEG-interferon (α2α ή α2β, 180μg/εβδομαδιαίως ή 1.5μg/εβδομαδιαίως αντιστοίχως) και ριμπαβιρίνη 800-1200mg σύμφωνα με το σωματικό βάρος.

Στην μελέτη περιελήφθησαν επίσης 60 υγιείς μάρτυρες (αιμοδότες, προσωπικό και επισκέπτες της κλινικής) αναλόγου ηλικίας.

Δείγματα αίματος πάρθηκαν από την ηπατική φλέβα 15 κίρρωτικών ασθενών με ΠΧΚ και 17 ασθενών με ιογενή κίρρωση οι οποίοι υποβλήθηκαν σε μέτρηση της ενδοηπατικής πίεσης ενσφήνωσης πριν και 6 μήνες μετά την θεραπεία με σωματοστατίνη μακράς δράσης, η οποία χορηγήθηκε ως θεραπεία προφύλαξης από την κίρρωση.

Ανοσοϊστοχημεία πραγματοποιήθηκε σε 15 ασθενείς με ΠΧΚ (7 με στάδιο I-II και 8 με στάδιο IV), σε 10 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C και σε 10 ασθενείς με HCV σχετιζόμενη κίρρωση.

CD3+ve λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από 12 ασθενείς με ΠΧΚ (7 με στάδιο I-II και 5 με στάδιο IV), από 10 υγιείς μάρτυρες και από 10 ασθενείς με HCV σχετιζόμενη κίρρωση.

Ηπατικός ιστός ήταν διαθέσιμος για εξέταση από τους ίδιους ασθενείς με ΠΧΚ και HCV κίρρωση.

Στην μελέτη της Ακτιβίνης Α, των μεταλλοπρωτεασών και του ιστικού αναστολέα TIMP1 πήρανε μέρος 162 ασθενείς : 39 με ΗΚΚ (στους 19 σχετιζονταν με ιογενή κίρρωση Β ή C και στους 20 με αλκοολική κίρρωση), 18 με χρόνια ηπατίτιδα C, 47 με ΠΧΚ (26 σταδίου I-II και 21 σταδίου IV), 22 με αλκοολική κίρρωση (δείγματα αίματος ελήφθησαν από την ηπατική φλέβα 16 ασθενών), 20 με HCV κίρρωση (δείγματα αίματος ελήφθησαν από την ηπατική φλέβα 18 ασθενών) και 16 ασθενείς με αλκοολική στεάτωση του ήπατος με ήπια ή μέτρια ίνωση αλλά χωρίς κίρρωση. Επίσης, στην μελέτη πήρανε μέρος 19 υγιείς μάρτυρες.

Σε όλους τους ασθενείς η διάγνωση και το στάδιο της ίνωσης επιβεβαιώθηκαν με βιοψία ήπατος. Στους ασθενείς με πρώιμη ΠΧΚ η διάγνωση τέθηκε βάση της ιστολογικής συμβατότητας και των θετικών AMA, M2 αντισωμάτων (ELISA), της αύξησης των IgM και της αλκαλικής φωσφατάσης.

Όλοι οι ασθενείς με HCV είχαν θετικό anti-HCV αντίσωμα (Abbott) καθώς και θετική ποιοτική και ποσοτική μέτρηση mRNA HCV του ορρού. Οι ασθενείς με HBV είχαν αυξημένο HBV DNA ορρού.

Όλοι οι ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο είχαν διαγνωστική βιοψία ήπατος, πραγματοποιούμενη υπό την καθοδήγηση των υπερήχων.

Όλα τα δείγματα φυλάσσονταν σε θερμοκρασία -80°C.

**Πίνακας 1.** Βασικά χαρακτηριστικά ασθενών

	<b>Πρωτοπαθής Χολική Κίρρωση</b>	<b>Χρόνια Ηπατίτιδα</b>	<b>Ηπατοκυτταρικός καρκίνος</b>	<b>Ιογενής κίρρωση</b>
<b>Αριθμός ασθενών</b>	<b>62</b>	<b>44</b>	<b>38</b>	<b>28</b>
<b>Μέση ηλικία</b>	<b>69.1±8.8</b>	<b>53±11</b>	<b>62±8.3</b>	<b>64±10.3</b>
<b>Mayo Score(mean)</b>	<b>5.19±1.44</b>			
<b>Φύλο (Γυναίκες/Άνδρες)</b>	<b>56/6</b>	<b>36/8</b>	<b>13/25</b>	<b>16/12</b>
<b>Χολερυθρίνη (mg/dl)</b>	<b>1.5±0.6</b>	<b>1.2±0.4</b>	<b>1.4±0.5</b>	<b>1.8±0.5</b>
<b>Αλβουμίνη (g/dl)</b>	<b>4.2±1.0</b>	<b>4.5±0.8</b>	<b>3.6±0.4</b>	<b>3.0±0.9</b>
<b>Αλκαλική φωσφατάση (UI/l) (φυσιολ. &lt;125)</b>	<b>185±36</b>	<b>110±15</b>	<b>152± 28</b>	<b>138±18</b>
<b>γGt(UI/l) (φυσιολ.&lt; 50)</b>	<b>98±25</b>	<b>39±18</b>	<b>65±23</b>	<b>57 ± 13</b>
<b>ALT (UI/l)</b>	<b>62±13</b>	<b>92±36</b>	<b>71±11</b>	<b>66±17</b>
<b>AST (UI/l)</b>	<b>55±17</b>	<b>86±32</b>	<b>65±21</b>	<b>59±12</b>
<b>IgM (mg/dl)</b>	<b>428±52</b>	<b>165±32</b>	<b>138±28</b>	<b>139±47</b>
<b>Ιστολογικό στάδιο</b>				
<b>Ludwig I-II</b>	<b>35</b>			
<b>Ludwig III-IV</b>	<b>27</b>			
<b>Ishak 1-3</b>		<b>30</b>		
<b>Ishak 4-5</b>		<b>14</b>		



## **3. ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3.1. ΑΙΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

#### **Περιγραφή τεχνικής**

Αρχικά γινόταν τοπική αναισθησία στην δεξιά τραχηλική χώρα και καθετηριασμός της δεξιάς έσω σφαγιτιδας φλέβας υπό την δοκιμασία Valsalva. Στην συνέχεια ακολουθούσε η προώθηση του οδηγού σύρματος προς την άνω κοίλη φλέβα και πάνω από αυτό η προώθηση ειδικού θηκάριού εύρους 6 Fr. Κατόπιν ο συρμάτινος οδηγός προωθούνταν έως την κάτω κοίλη φλέβα και πάνω από αυτόν τοποθετούνταν μέσα από το θηκάρι ειδικός καθετήρας τύπου Headhunter εύρους 5 Fr, ενώ στο τέλος αφαιρούνταν ο συρμάτινος οδηγός. Για τον καθετηριασμό της δεξιάς ηπατικής φλέβας εισαγόταν μέσα από τον καθετήρα υδρόφιλο σύρμα τύπου Tegumo και με τη βοήθεια του καθετηριαζόταν ανάστροφα η ηπατική φλέβα. Το σύρμα προωθούνταν όσο το δυνατόν περιφερικότερα μέχρι που έφτανε σε τελικό αγγειακό κλάδο. Όταν συνέβαινε αυτό, κρατούνταν σταθερό το σύρμα και ο καθετήρας προωθούνταν έως το τέρμα, όπου και σφηνώνονταν. Μετά την αφαίρεση του σύρματος ακολουθούσε η σκιαγράφιση του σημείου ενσφήνωσης, οπότε και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες απεικονιζόταν ανάστροφη σκιαγράφιση του ηπατικού παρεγχύματος και των τοπικών πυλαίων κλάδων. Μετά το τέλος της σκιαγράφισης, γινόταν μέτρηση της πίεσης ενσφήνωσης και συλλογή αίματος. Μετά το πέρας των μετρήσεων αφαιρούνταν ο καθετήρας και το θηκάρι και εφαρμόζονταν δεκάλεπτη πίεση με τα δάκτυλα στο σημείο της παρακέντησης.

### **3.2. ELISA**

#### **3.2.1. Λαμινίνη**

Μετρήθηκε στον ορό με την εμπορικά διαθέσιμη ELISA QuantiMatrix™ HUMAN LAMININ ELISA KIT / Catalog Number: ECM310 της εταιρείας

CHEMICON® INTERNATIONAL a Serologicals Company (England), κατά τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **3.2.2. Κολλαγόνο IV**

Μετρήθηκε με την εμπορικά διαθέσιμη ELISA Serum Collagen IV EIA / Catalog Number: BIO82 της εταιρείας Biotrin International (Dublin/Ireland) , σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **3.2.3. Υαλουρονικό οξύ**

Μετρήθηκε με το εμπορικά διαθέσιμο Hyaluronic Acid (HA) Test Kit / Product #: 029-001 της εταιρείας Corgenix (Peterborough/England), που είναι μία μέθοδος δέσμευσης πρωτεΐνης τύπου sandwich, κατά τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **3.2.4. Λεπτίνη**

Μετρήθηκε στον ορό με την εμπορικά διαθέσιμη ELISA DuoSet® ELISA Development System, human Leptin / Catalog Number: DY398 της εταιρείας R&D Systems (Abingdon/England). Αρχικά έγινε αραιώση του δείγματος 1:10 σε διαλύτη 10% FBS/PBS και στη συνέχεια ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή.

### **3.2.5. TIMP-1**

Μετρήθηκε με την εμπορικά διαθέσιμη ELISA DuoSet® ELISA Development System, human TIMP-1 / Catalog Number: DY970 της εταιρείας R&D Systems (Abingdon/England). Αρχικά έγινε αραιώση του δείγματος 1:500 σε διαλύτη 10% FBS/PBS και στη συνέχεια ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή.

### **3.2.6. Ακτιβίνη**

Μετρήθηκε στον ορό με την εμπορικά διαθέσιμη ELISA DuoSet® ELISA Development System, human Activin / Catalog Number: DY338 της εταιρείας R&D Systems (Abingdon/England), κατά τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **3.2.7. TGF-β1**

Μετρήθηκε με την εμπορικά διαθέσιμη ELISA DuoSet® ELISA Development System, human TGFβ-1 / Catalog Number: DY240 της εταιρείας R&D Systems (Abingdon/England), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **3.2.8. TGF-β2**

Μετρήθηκε με την εμπορικά διαθέσιμη ELISA DuoSet® ELISA Development System, human TGFβ-2 / Catalog Number: DY302 της εταιρείας R&D Systems (Abingdon/England), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **3.2.9. TGF-β3**

Μετρήθηκε με την εμπορικά διαθέσιμη ELISA DuoSet® ELISA Development System, human TGFβ-3 / Catalog Number: DY243 της εταιρείας R&D Systems (Abingdon/England), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **3.2.10. MMPs**

Μετρήθηκαν με την εμπορικά διαθέσιμη ELISA Enzolyte™ 520 Generic MMP Assay Kit \*Fluorimetric\* / Catalog # : 71158 της εταιρείας AnaSpec (San Jose CA/USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα δείγματα επωάζονταν επί 2 ώρες με 4-a minorphenylmercuric acetate (APMA), 1mM για να ενεργοποιηθούν τα λανθάνοντα ένζυμα. Με την επώαση αυτή γινόταν μέτρηση των ακόλουθων MMPs: MMP2, MMP7, MMP8, MMP9, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14.

## **3.3. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ**

Η έκφραση των ισομορφών της πρωτεΐνης TGFβ μελετήθηκε με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο αλκαλικής φωσφατάσης (AP). Τα στάδια της μεθόδου είχαν ως εξής:

### **Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση**

Τα πλακίδια τοποθετούνταν αρχικώς στον κλίβανο στους 56<sup>0</sup> C για 45 λεπτά και στην συνέχεια σε ξυλόλη για άλλα 15 λεπτά προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαδικασία της αποπαραφίνωσης. Κατόπιν ακολουθούσε ενυδάτωση σε κατιούσα συγκέντρωση οιοπνευμάτων (10 λεπτά σε κάθε μία από τις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 100%, 96%, 80%, 70%).

### **Τεχνική αποκάλυψης του αντιγόνου**

Τα παρασκευάσματα ξεπλένονταν με αποσταγμένο νερό, τοποθετούνταν σε διάλυμα EDTA και θερμαίνονταν σε φούρνο μικροκυμάτων 3 φορές από 5 λεπτά στα 500W, με μεσοδιαστήματα κρυώματος 15 λεπτών.

### **Προεπώαση**

Αφού τα πλακίδια κρύωναν για 15 λεπτά ξεπλένονταν με αποσταγμένο νερό και τοποθετούνταν σε TBS (Tris Buffer Solution, pH 7,6) για 5 λεπτά. Κατόπιν σε κάθε ένα από τα πλακίδια προσθέτονταν 200-300μl Large Volume Ultra V block

(Sodium Azide) και επώζονταν για 7 λεπτά στους 25°C. Στο στάδιο αυτό δεσμεύονταν οι μη ειδικοί αντιγονικοί παράγοντες του ιστού οι οποίοι θα μπορούσαν να προκαλέσουν μη ειδική χρώση.

### **Επώαση με το κυρίως αντίσωμα**

Στη συνέχεια χωρίς να προηγηθεί ξέπλυμα των πλακιδίων τοποθετούνταν το κυρίως αντίσωμα σε αραιώση 1/10 (TGFb1), ή 1/20 (TGFb2, TGFb3) και τα πλακίδια επώζονταν επί 12 ώρες (TGFb1) ή επί 2 ώρες (TGFb2, TGFb3) στους 25°C.

Ο διαλύτης για την αραιώση του αντισώματος ήταν ο Dako Rear TM Antibody Diluent της εταιρείας Dako (REF S2022).

Σε κάθε τομή προσθέτονταν περίπου 200-300 μl διαλύματος. Μετά την επώαση με το κυρίως αντίσωμα οι τομές ξεπλένονταν σε TBS. Στην συνέχεια προκειμένου να ενισχυθεί η δράση του πρωτογενούς αντισώματος ακολουθούσε η προσθήκη 200-300μl Large Volume Primary Antibody Enhancer ενισχυτή του πρωτογενούς αντισώματος με τον οποίο και επώζονταν για 20 λεπτά στους 25°C. Μετά την επώαση με τον ενισχυτή οι τομές ξεπλένονταν σε TBS.

### **Τεχνική αλκαλικής φωσφατάσης-AP (άμεση ανοσοϊστοχημική τεχνική)**

Στην φάση αυτή το δευτεροταγές αντίσωμα Large Volume AP Polymer που ήταν συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση επώζονταν για 30 λεπτά. Το δευτεροταγές αντίσωμα συνδέονταν ανοσοενζυμικά με το κυρίως αντίσωμα και η συνδεδεμένη αλκαλική φωσφατάση ανιχνεύονταν από το σύστημα υποστρώματος-χρωμογόνου, που ήταν το επόμενο βήμα. Το δευτεροταγές αντίσωμα χρησίμευε ουσιαστικά ως γέφυρα (bridge antibody) μεταξύ του κυρίως αντισώματος και του αντισώματος του επόμενου βήματος.

### **Χρώση**

Ακολουθούσε ξέπλυμα με TBS και αποσταγμένο νερό, επώαση με το υπόστρωμα naphthol phosphate και ανάδειξη του τελικού προϊόντος με την χρωστική Fast Red. με (Thermo Scientific Fast Red Substrate System) για 20 λεπτά στους 25°C. Τα παρασκευάσματα ξεπλένονταν σε τρεχούμενο νερό για 5 λεπτά και τοποθετούνταν σε αιματοξυλίνη Mayer για 3 λεπτά. Ακολούθως ξεπλένονταν σε

τρεχούμενο νερό για 10 λεπτά και κατόπιν εμβαπτίζονταν σε διάλυμα αμμωνίας (1lt H<sub>2</sub>O + 2,5 ml αμμωνία 29.5%) 10 φορές.

Τέλος ξεπλένονταν σε τρεχούμενο νερό και καλύπτονταν με τις ειδικές καλυπτρίδες αφού προηγουμένως είχε τοποθετηθεί υδατικό μέσο Glycergel<sup>®</sup>

### **3.4. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΤΟΜΕΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ**

Τομές παραφίνης ηπατικών βιοψιών πάχους 3μm αποπαραφινόνονταν σε ξυλόλη και ενυδατώνονταν σε κατιούσα συγκέντρωση οιοπνευμάτων ( 100%, 95%, 80%, 70%). Ακολούθως, η ανάκτηση του αντιγόνου κατορθώνονταν με επώαση για 2 ώρες με στους 37°C με κιτρικό buffer (1,8mM citric acid and 8,2mM sodium citrate).

Μετά το blocking με PBS που περιείχε 0.2% TritonX-100, 2mM MgCl<sub>2</sub> και 1% ζελατίνη από το δέρμα του ψαριού των ψυχρών υδάτων Aldrich. (Sigma-Germany) για 10 λεπτά, οι τομές επώζονταν όλη τη νύχτα στους 4°C με αντί-ανθρώπινο TGFβ<sub>1</sub> παραθέν σε ποντίκι (R&D Systems, UK, dilution 1/10, ) σε blocking buffer .Στην συνέχεια, οι τομές πλένονταν με blocking buffer 4 φορές από 5 λεπτά και επώζονταν με Alexa fluor 488 F(ab')<sub>2</sub> τμήμα IgG αντισώματος ποντικού παραθέντος σε αίγα. (H+L) (Invitrogen, UK, dilution 1/1000) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τελικώς οι τομές ξεπλένονταν σε blocking buffer 3 φορές από 5 λεπτά και με PBS 1 φορά για 5 λεπτά και αποκαλύπτοντο με υλικό επιστοιβάξεως (mounting) περιέχοντος Dapi (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Germany).

Για την ανίχνευση των TGFb2 και TGFb3 (R&D Systems, U.K, dilution 1/20) ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στον TGFb1 με την διαφορά ότι η επώαση διαρκούσε 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Τα αρνητικά controls και στις δύο μεθόδους, της αλκαλικής φωσφατάσης και του ανοσοφθορισμού επιτεύχθηκαν με την παράλειψη του πρωτογενούς αντισώματος.

### **3.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΗΠΑΤΟΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ KUPFFER ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ**

Η απομόνωση αστεροειδών κυττάρων του ήπατος και των κυττάρων Kupffer από ήπαρ αρουραίου βασίστηκε στο συνδυασμό και κατάλληλη τροποποίηση δημοσιευμένων μεθόδων απομόνωσης που περιλαμβάνουν ενζυμική πέψη του ιστού με *in situ* διήθηση εκ της πυλαίας φλέβας , φυγοκέντρηση σε Iodixanol, φυγόκεντρο έκλουση και εκλεκτική προσκόλληση στο πλαστικό [\*].

Το πειραματόζωο αναισθητοποιούνταν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση Πεντοβαρβιτάλης (50 mg/kg) ή Θειοπεντάλης (150 mg/kg) κατόπιν εισαγωγής με Ισοφλουράνιο. Ακολουθούσε μέση υπερ/υπομφάλιος τομή στο κοιλιακό τοίχωμα και αποκάλυψη της πυλαίας φλέβας. Η πυλαία φλέβα καθετηριάζονταν με πλαστικό καθετήρα 22 G και ηπαρινίζονταν με 1000 IU ηπαρίνης σε 1 ml 0.9% NaCl. Ο καθετήρας στερεώνονταν με ράμματα Mersilk 3.0 και συνδέονταν με την συσκευή διήθησης.

Για την ενζυμική πέψη του ηπατικού παρεγχύματος εφαρμοζόταν η μέθοδος της διπλής διήθησης του ηπατικού ιστού με Collagenase-Pronase διαμέσου του αγγειακού δέντρου της πυλαίας φλέβας . Ο ιστός διηθούνταν αρχικά *in situ* με 200 ml HBSS w/o  $Ca^{++}$  /  $Mg^{++}$  . Κατόπιν το ήπαρ εκτέμνονταν και μεταφέρονταν σε τρυβλίο 35mm<sup>2</sup> χωρίς να αφαιρεθεί ο καθετήρας διήθησης και ακολουθούσε διήθηση *ex situ* με 60 ml διαλύματος 0.2% Pronase σε HBSS και στην συνέχεια διήθηση με 225 ml διαλύματος 0.012% Collagenase σε HBSS. Η διήθηση πραγματοποιούνταν με σταθερή ροή 10 ml/min με την χρήση αντλίας ακριβείας Masterflex 7521-25 (Cole Parmer, Chicago, USA) χωρίς ανακύκλωση των διαλυμάτων και στους 37°C.

Μετά το τέλος της διήθησης το ήπαρ μεταφερόταν στην Hood σε τρυβλίο όπου η κάψα του οργάνου αφαιρούνταν και το ιστικό ομογενοποίημα μεταφερόταν σε στείρο δοχείο, αναμιγνύονταν με προθερμασμένο στους 37°C διάλυμα 0.03% Pronase και 0.01% DNase σε HBSS μέχρι τελικού όγκου 100 ml και επωάζονταν υπό συνεχή ανάδευση στους 37°C για 30 λεπτά. Ο ομογενοποιημένος ιστός διηθούνταν κατόπιν διαμέσου nylon γάζας (120μm) για την κατακράτηση του ιστού που δεν είχε υποστεί πέψη και το κυτταρικό εναιώρημα που προέκυπτε

αναμιγνύονταν με HBSS (4 °C) μέχρι τελικού όγκου 200ml και φυγοκεντρώνταν στα 400g για 7 λεπτά, 4 °C.

Για τον διαχωρισμό των τραυματισμένων από την Pronase ηπατοκυττάρων από τα κύτταρα των ηπατικών κολποειδών χρησιμοποιούνταν φυγοκέντρηση σε Iodixanol. Το κυτταρικό ίζημα που προέκυπτε μετά την διαδικασία της ενζυμικής πέψης του ιστού διαλύονταν σε HBSS μέχρι τελικό όγκο 24 ml που αναμιγνύονταν με 16 ml 29.4% Iodixanol ώστε να προκύψει διάλυμα 11.7% Iodixanol (d=1.066 gr/ml). Στην συνέχεια ακολουθούσε επιστοιβάξη του κυτταρικού εναιωρήματος σε διάλυμα 17.6% Iodixanol (d=1.0974 gr/ml) με αποτέλεσμα τον σχηματισμό διπλής διαβάθμισης πυκνότητας (double layer discontinuous gradient). Το τελικό διάλυμα φυγοκεντρώνταν στα 1400g για 17 λεπτά και στους 4 °C.

Με το πέρας της φυγοκέντρησης σχηματιζόνταν δυο κυτταρικές στοιβάδες, μία στην κορυφή του διαλύματος πυκνότητας 11.0% και μια στο ενδιάμεσο μεταξύ των δύο πυκνοτήτων 11.0 και 17.6% . Η κορυφαία στοιβάδα περιείχε τα μικρότερου ειδικού βάρους αστεροειδή κύτταρα του ήπατος και η στοιβάδα της μεσόφασης τα μεγαλύτερα και βαρύτερα κύτταρα Kupffer μαζί με όσα εναπομείναντα ζώντα μικρά ηπατοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος. Το κυτταρικό ίζημα που σχηματιζόνταν στον βυθό του σωληναρίου αποτελούνταν κυρίως από νεκρά ηπατοκύτταρα.

Οι δύο εμπλουτισμένες με κολποειδικά κύτταρα κυτταρικές στοιβάδες συλλέγονταν ξεχωριστά και επαναδιαλύονταν σε HBSS και ξεπλένονταν με

φυγοκέντρηση στα 400g για 7 λεπτά και στους 4 °C.

Τα αστεροειδή κύτταρα (επάνω σιβάδα) μετρούνταν σε κυτταρομετρική πλάκα Neubauer και η βιωσιμότητα τους ελέγχονταν με κυανούν του τρυπανίου. Στη συνέχεια τοποθετούνταν απευθείας σε καλλιέργεια σε καλλιεργητικό μέσο (DMEM high glucose) εμπλουτισμένο με αντιβιοτικά και 10% ορό εμβρύου βοός σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> στους 37 °C και χρησιμοποιούνταν για πειράματα μετά από τουλάχιστον τέσσερις ανακαλλιέργειες.

Το ίζημα της κάτω σιβάδας (Kupffer, ενδοθηλιακά, μικρά ηπατοκύτταρα) επαναδιαλύονταν σε 20 ml 0.05% DNase σε HBSS και τα κυτταρικά συσσωματώματα διαχωρίζονταν μέσω αναρρόφησης με βελόνη 22G.

Ο εμπλουτισμός σε κύτταρα Kirpffer επιτυγχάνονταν με κλασματικό διαχωρισμό με την μέθοδο της φυγοκέντρου έκλουσης.

Η διαδικασία φυγοκέντρου έκλουσης πραγματοποιούνταν στις 2500 rpm και στους 25° C. Ως μέσω έκλουσης χρησιμοποιούνταν διάλυμα HBSS. Το κυτταρικό εναιώρημα εισάγονταν στον ρότορα με αρχική ροή 18.5 ml/min. Ακολουθούσε έκλουση τουλάχιστον 200ml διαλύματος. Η εισαγωγή όλου του δείγματος εντός του ρότορα επιβεβαιωνόταν από την εμφάνιση κυτταρικού ιζήματος σταθερού όγκου εντός του ρότορα. Ακολουθούσε κλασματική έκλουση των κυττάρων με σταδιακή αύξηση της ροής της αντλίας διατηρώντας σταθερές τις στροφές της φυγοκέντρου. Οι ροές που χρησιμοποιήθηκαν και ο όγκος των κλασμάτων που απομονώνονταν περιγράφονται στον πίνακα \*.

Τα κλάσματα III-IV συλλέγονταν και φυγοκεντρώνονταν στα 400g για 7 λεπτά και στους 4° C. Το κυτταρικό ίζημα συλλέγονταν και επαναδιαλύονταν σε καλλιεργητικό μέσο (DMEM high glucose) εμπλουτισμένο με αντιβιοτικά και 10% ορό εμβρύου βοός. Τα κύτταρα μετρούνταν σε κυτταρομετρική πλάκα Neubauer και η βιωσιμότητα τους ελέγχονταν με κυανούν του τρυπανίου.

Για την λήψη κεκαθαρωμένων πληθυσμών κυττάρων Kirpffer χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της εκλεκτικής προσκόλλησης στο πλαστικό. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα των κυττάρων Kirpffer να προσκολλούνται σε πλαστικά τρυβλία εντός βραχέως διαστήματος επώασης φαινόμενο που επιτείνεται κατόπιν εξεργασίας του ιστού με Pronase. Για τον σκοπό αυτό τα κύτταρα από τα κλάσματα III-IV ετίθεντο σε καλλιέργεια σε πλάκες 6 βοθρίων με πυκνότητα  $1-3 \times 10^6$  /βοθρίο. Στην συνέχεια επωάζονταν σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37°, 5% CO<sub>2</sub> για δυο ώρες. Τα κύτταρα που δεν προσκολλούνταν στον βυθό του καλλιεργητικού τρυβλίου ξεπλένονταν με νέο καλλιεργητικό μέσο.

Τα κύτταρα που προσκολλούνταν στο πλαστικό μετά από 2 ώρες επώαση καλλιεργούνταν στην συνέχεια σε πλάκες 6 βοθρίων με την προσθήκη νέου καλλιεργητικού μέσου DMEM εμπλουτισμένου με αντιβιοτικά και 10% FCS για 24 ώρες σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> στους 37° C.



**Πίνακας\*. Φυγόκεντρος έκλυση κυττάρων Kupffer αρουραίου (2500rpm, 25°C)**

Κλάσματα	Ροή αντλίας (ml/min)	Κυτταρικό μέθοδος (μm)	Όγκος (ml)	Κυτταρικοί πληθυσμοί
0	18.5		200	Εισαγωγή δείγματος, έκλυση κυτταρικών συγκριμάτων
I	25	<7.9	100	Κύτταρα αίματος (ερυθρά, λεμφοκύτταρα)
II	35	7.9-10.5	100	Ενδοθηλιακά, κύτταρα Ito
III	45	10.5-12	100	Κύτταρα Kupffer
IV	60	12-14	100	Κύτταρα Kupffer
V	80	14-16	100	Κύτταρα Kupffer, μικρά ηπατοκύτταρα
VI	100	16-18	100	Ηπατοκύτταρα

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ :**

**Αστεροειδή κύτταρα ήπατος**

Μετά από 4 ανακαλλιέργειες τα κύτταρα ανακαλλιεργούνταν σε πλάκες 6 βοθρίων μέχρι να καλλύνουν πλήρως την καλλιεργητική επιφάνεια.

Στη συνέχεια το καλλιεργητικό μέσο αντικαθιστούνταν με νέο DMEM χωρίς FCS. Κατόπιν 24ωρης επώασης το καλλιεργητικό μέσο αντικαθιστούνταν ξανά με DMEM χωρίς FCS που περιείχε (ή όχι) τις προς μελέτη ουσίες.

**Κύτταρα Kupffer**

Την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας το καλλιεργητικό μέσο αντικαθιστούνταν με νέο DMEM χωρίς FCS. Κατόπιν 4ωρης επώασης το καλλιεργητικό μέσο αντικαθιστούνταν ξανά με DMEM χωρίς FCS που περιείχε (ή όχι) τις προς μελέτη ουσίες.

Και στις δύο ανωτέρω περιπτώσεις (αστεροειδή και Kupffer) κατόπιν χρόνου επώασης με ή χωρίς τις δραστικές ουσίες για 24 και 48 ώρες το υπερκείμενο συλλέγονταν, φυγοκεντρούνταν για να κατακρημνισθούν τα κυτταρικά συγκρίματα

στα 700g για 10 λεπτά, 4°C και μοιράζονταν σε κλάσματα μικρού όγκου που φυλάσσονταν στους -70°C μέχρι την πραγματοποίηση των μετρήσεων. Η κυτταρική στοιβάδα μετά την λήψη του υπερκλειμένου ομογενοποιούνταν με 1 ml Trizol<sup>®</sup> (Gibco-BRL) ή 1 ml διαλύματος πρωτεϊνικής ομογενοποίησης και φυλάσσονταν στους -70°C για την απομόνωση ολικού RNA ή πρωτεϊνών αντίστοιχα. Ο συνολικός χρόνος φύλαξης δεν υπερέβη τους 4 μήνες και όλα τα δείγματα ξεπάγωναν για μία και μοναδική φορά.

### **3.6. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ (PBL)**

Περιφερικό αίμα αραιωνόταν αμέσως μετά την λήψη του με Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, UK), εμπλουτισμένο με 10 UI ηπαρίνης ελεύθερης συντηρητικών (Sigma, St Louis, MO, USA). Το αραιωμένο αίμα φυγοκεντρούνταν σε Lymphoprep (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway) στα 400 g επί 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απομονωθούν τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs).

Τα CD3+ κύτταρα που αντιπροσωπεύουν τα T-λεμφοκύτταρα, απομονώθηκαν από το σύνολο των PBMC κυττάρων με την μέθοδο του μαγνητικού διαχωρισμού (MACS Mitenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε όλα τα πειράματα, η καθαρότητα των υποπληθυσμών ήταν >95%, όπως έδειχνε η κυτταρομετρία ροής. Τα απομονωμένα CD3+ κύτταρα τοποθετούνταν σε TRIZOL για να εξαχθεί το mRNA [1].

### **3.7. PCR ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ (RT-PCR)**

Ολικό RNA εξαγόταν από τα περιφερικά T-λεμφοκύτταρα ή από απομονωθέντα κύτταρα Kupffer ή αστεροειδή κύτταρα αρουραίου (Ακτιβίνη Α) ή από ηπατικό ιστό ομογενοποιημένο σε πάγο με γυάλινο ομογενοποιητή και με την χρήση 1ml διαλύματος RNeasy. Η εξαγωγή του RNA και η RT-PCR γινόταν σύμφωνα με την

προηγούμενη περιγραφείσα μέθοδο [2]. Εν συντομία, 100 ng mRNA κατεργαζόταν με την παρουσία 5mM oligo (dT) 12-18 primer. Έπειτα γινόταν η αντίστροφη μεταγραφή σε 10ml όγκο με Superscript II (Gibco), 1x RT buffer, 1 mM deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), 5mM DDT και 2.5U/ml RNAsin (Promega) στους 42°C επί 60 min. Δείγματα 1ml cDNA υφίσταντο πολλαπλασιασμό με PCR σε ένα μείγμα 25 ml που περιείχε reaction : 1 X PCR buffer, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.5 mM sense και antisense primers για FoxP3 η Ακτιβίνη και 18s, και 0.4U High Fidelity Expand polymerase (Roche). Τα προϊόντα της PCR αναλύονταν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική 2% αγαρόζης και απεικονίζονταν με χρώση Βρωμιούχου Εθιδίου. Παράλληλα γινόταν μία αντίδραση PCR με υλικό που δεν είχε υποστεί προηγουμένως αντίστροφη μεταγραφή. Η αναλογία των προϊόντων της PCR, όπως αυτά μετρούνταν με πυκνομετρία (densitometry), μεταξύ των υπό έλεγχο γονιδίων και του γονιδίου GAPDH σε σταθερό όγκο RT προϊόντος, χρησιμοποιούνταν για συγκρίσεις μεταξύ των δειγμάτων. Η αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδίων και το μέγεθος των ζευγών primers που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ως ακολούθως: **GAPDH** Forward: CAACGGATTGGTCGTATTG, **GAPDH** Reverse: GATGACAAGCTTCCCGTTCT, **FoxP3** Forward: ACTCAGGTTGTGGCGGATG, **FoxP3** Reverse: TCACCTACGCCACGCTCAT**Activin-A**forward GGACCTAACTCTCAGCCAGAGATG, **Activin-A** reverse TCTCAAAATGCAGTGTCTTCCTGG, **18sRNA** forward GTAACCCGTTGAACCCATT, **18sRNA** reverse CCATCCAATCGGTAGTAGCG. Η θερμοκρασία που χρησιμοποιούνταν (annealing) ήταν 59°C. Όλα τα ζεύγη primers είχαν συντεθεί από την Invitrogen (UK). Κάθε ζεύγος δοκιμαζόταν με τρία τουλάχιστον διαφορετικά δείγματα RNA σε ανεξάρτητα πειράματα

### 3.8. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η κανονική κατανομή των δεδομένων (Gaussian) εξετάσθηκε με την δοκιμασία Kolmogorof και Smirnof. Η δοκιμασία Bartlett έδειξε ότι οι διαφορές μεταξύ των σταθερών αποκλίσεων (Standard Deviation) ήταν σημαντικές. Ως εκ τούτου, για την σύγκριση μεταξύ όλων των ομάδων χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική ANOVA κατά Kruskal-Wallis. Η δοκιμασία Dunn για πολλαπλές μη παραμετρικές συγκρίσεις, χρησιμοποιήθηκε για την ανεύρεση διαφορών μεταξύ δύο ομάδων.

Η ικανότητα κάθε δείκτη του ορού για να την διάκριση μεταξύ πρώιμης και προχωρημένης ίνωσης στην πρωτογενή χολική κίρρωση και στην χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια εκτιμήθηκε με καμπύλες Receiver Operating Characteristic (ROC) και με τον προσδιορισμό της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη (Area under the curve, AUC). Η ειδικότητα, η ευαισθησία, η θετική προγνωστική αξία (PPV) και η αρνητική προγνωστική αξία (NPV), υπολογίστηκαν με τιμή cut-off που προσδιορίζεται από την ανάλυση της καμπύλης ROC και εφαρμογή του δείκτη Youden. (Δείκτης Youden = (ευαισθησία)+(ειδικότητα)-1) στην καμπύλη των αποτελεσμάτων. Το σημείο με τον υψηλότερο δείκτη Youden χρησιμοποιούνταν ως cut-off.

Όλες οι δοκιμασίες έγιναν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS ver. 15. Τιμές  $p < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές. Όλες οι τιμές εκφράστηκαν ως ενδιάμεσες (median) με τα 95% όρια εμπιστοσύνης (confidence interval), για την λαμινίνη, λεπτίνη, υαλουρονικό οξύ και κολλαγόνο IV, ή ως ενδιάμεσες με την διακύμανση του εύρους (range) για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες.

### **3.9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Koumaki V, Papadaki HA, Stefanaki K, Damianaki A, Gemetzi C, Katonis P, Vrentzos G, Eliopoulos GD. Increased cell apoptosis in bone marrow trephine biopsies and immunomagnetically isolated myeloid progenitor cells in patients with chronic idiopathic neutropenia. *Ann Hematol* 2003;82:641-645.
2. Valatas V, Kolios G, Manousou P, et al. 2004. Octreotide regulates CC but not CXC LPS-induced chemokine secretion by rat Kupffer cells. *Br J Pharmacol*; 141:477-487
3. Notas G, Kolios G, Mastrodimou N, et al.: Cortistatin production by HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line and distribution of somatostatin receptors. *J Hepatol* 2004;40:792-798

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1. ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ, ΛΕΠΤΙΝΗ, ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ- IV, ΛΑΜΙΝΙΝΗ

#### 4.1.1. Αποτελέσματα

##### 4.1.1.1. Επίπεδα ορού

###### Υαλουρονικό οξύ

Υπήρχε ισχυρή στατιστική διαφορά μεταξύ όλων των ομάδων ( $p < 0.0001$ ). Οι υγιείς μάρτυρες είχαν επίπεδα υαλουρονικού 13.6 ng/ml (95%CI 8.8-29.9). Όλες οι ομάδες των κίρρωτικών είχαν σημαντικώς υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

Υψηλότερες τιμές υπήρχαν στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση σταδίου III-IV 154.5 ng/ml (95%CI 55.3-764.4,  $p < 0.001$ ) και στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο 218.5 ng/ml (95%CI 34.4-807.0,  $p < 0.001$ ) ενώ, υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ ΠΧΚ σταδίου III-IV και ΠΧΚ σταδίου I-II (54.5 ng/ml; 95%CI 27.3-426.9,  $p < 0.05$ ). [Εικόνα 1Α]

Ενδιαφέρον ήταν ότι τα επίπεδα στον ορό που προερχόταν από την ηπατική φλέβα ήταν παρόμοια (97.9 ng/ml; 95%CI 49.0-147.9) με εκείνα του περιφερικού αίματος για την ιογενή κίρρωση (90.3 ng/ml ;95%CI 25.1-249.9, δεδομένα δεν εμφανίζονται στον πίνακα), αλλά αυτό δεν συνέβαινε στην ΠΧΚ σταδίου IV (ηπατική φλέβα IV 67.8 ng/ml; 95%CI 53.6-81.6 ng/ml,  $p < 0.05$ , δεδομένα δεν εμφανίζονται στον πίνακα) .

## **Λεπτίνη**

Αν και υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ( $p < 0.01$ ), μόνο τα επίπεδα στην όψιμη ΠΧΚ (18.9 ng/ml ;95%CI 2.6-37.8) ήταν σημαντικά διαφορετικά από των υγιών μαρτύρων (8.6ng/ml ;95%CI 1.7-21.0,  $p < 0.05$ ). Επίσης, δεν υπήρχε διαφορά ανάμεσα στην όψιμη και στην πρώιμη ΠΧΚ (11.8 ng/ml ;95%CI 2.0-35.3) ή ανάμεσα στην χρόνια ηπατίτιδα (7.5 ng/ml ;95%CI 0.7-45.0) και στην ιογενή κίρρωση (5.2 ng/ml ;95%CI 0.8-36.8).

Τα επίπεδα στην ηπατική φλέβα δεν ήταν στατιστικώς διαφορετικά από εκείνα στο περιφερικό αίμα είτε στην ΠΧΚ (18.1 ng/ml ;95%CI 10.1-34.1), είτε στην ιογενή κίρρωση (8.0 ng/ml ;95%CI 5.7-11.9). **[Εικόνα 1B]**

## **Κολλαγόνο IV**

Επίσης, υπήρχε ισχυρή στατιστική διαφορά ( $p < 0.0001$ ) μεταξύ των ομάδων. Όλες οι ομάδες των κίρρωτικών είχαν σημαντικώς υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

Στα δείγματα του ορού των υγιών μαρτύρων τα επίπεδα του κολλαγόνου IV ήταν 68.0 ng/ml ;95%CI 43.0-100.0. Πάλι, υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στην όψιμη ΠΧΚ (195.3 ng/ml ;95%CI 117.6-647.5,  $p < 0.001$ ) και στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο (250.1 ng/ml ;95%CI 115.3-672.0,  $p < 0.001$  vs control). Δεν υπήρχε διαφορά ανάμεσα στην όψιμη και στην πρώιμη ΠΧΚ (148.4 ng/ml ;95%CI 72.2-453.8,  $p < 0.05$  vs control). αλλά υπήρχε σημαντική διαφορά ανάμεσα στην χρόνια ενεργό ηπατίτιδα (102.3 ng/ml ;95%CI 72.2-117.6 και στην ιογενή κίρρωση (212.2 ng/ml ;95%CI 129.1-323.9,  $p < 0.05$ ).

Τα επίπεδα στην ηπατική φλέβα ήταν παρόμοια με εκείνα στο περιφερικό αίμα, είτε στην ΠΧΚ (168.8 ng/ml; 95%CI 103.8-204.7) είτε στην ιογενή κίρρωση (192.5 ng/ml ;95%CI 112.8-266.7) **[Εικόνα 1C]**

### **Λαμινίνη**

Υπήρχε υψηλή στατιστική διαφορά ( $p < 0.0001$ ) της λαμινίνης του ορρού μεταξύ όλων των ομάδων. Οι υγιείς μάρτυρες είχαν 170 ng/ml (95%CI 138.0-180.1) λαμινίνη στον ορρό τους.

Οι ασθενείς με πρώιμη (165.8 ng/ml; 95%CI 52.6-333.4) και όψιμη (247.9; 95%CI 87.5-411.4) ΠΧΚ δεν διέφεραν σημαντικά. Στατιστικώς υψηλότερα επίπεδα παρατηρήθηκαν στην ιογενή κίρρωση (348.4 ng/ml; 95%CI 52.6-859.9  $p < 0.01$ ), ενώ υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας (203.2 ng/ml; 95%CI 13.4-645.6) και ιογενούς κίρρωσης ( $p < 0.05$ ). Οι υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στα δείγματα της ηπατικής φλέβας στην ΠΧΚ και στην ιογενή κίρρωση (487.9 ng/ml; 95%CI 199.7-744.9,  $p < 0.001$ ) **[Εικόνα 1D]**.

### **Διάκριση μεταξύ πρώιμης και όψιμης ηπατικής βλάβης**

Το σημείο με τον υψηλότερο δείκτη Youden, επελέγη ως cut-off : Υαλουρονικό οξύ 71.5 ng/ml, Λεπτίνη 14.8 ng/ml, Λαμινίνη 208.3 ng/ml, Κολλαγόνο IV 171.78 ng/ml.

Ο **Πίνακας 1** και ο **Πίνακας 2** δείχνουν ευαισθησία, ειδικότητα, θετική προγνωστική αξία (PPV), αρνητική προγνωστική αξία (NPV), περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) and Likelihood Ratio (LR) για όλους του δείκτες στην όψιμη έναντι της πρώιμης ΠΧΚ και της χρόνιας ηπατίτιδας έναντι της ιογενούς κίρρωσης.

Μία τιμή AUC 0.74 επετεύχθη για το υαλουρονικό οξύ στην ΠΧΚ και ήταν η καλύτερη μεταξύ όλων των δεικτών. Η ευαισθησία (91.3%) και η αρνητική προγνωστική τιμή (90%) ήταν επίσης υψηλά για την διάκριση μεταξύ πρώιμης και όψιμης ΠΧΚ. Οι τιμές για την λεπτίνη, την λαμινίνη και το κολλαγόνο IV ήταν χαμηλότερες και δεν επέτρεπαν ικανοποιητική διάκριση.



Αντιθέτως, η λαμινίνη με ειδικότητα 100% και θετική προγνωστική αξία 100%, επέτρεπε τον καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας και ιογενούς κίρρωσεως.

Η **Εικόνα 2** δείχνει τα αποτελέσματα όταν οι πριν την θεραπεία ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα C ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τον BMI, το Ishak score και την στεάτωση. Μόνο οι ασθενείς με Ishak score 4-5 έδειξαν υψηλότερα επίπεδα Υαλουρονικού οξέος και Κολλαγόνου IV σε σχέση με τους ασθενείς με Ishak score 0-3 ( $p < 0.05$ ). Καμία άλλη διαφορά δεν βρέθηκε σε όλους τους άλλους αντιπροσωπευτικούς δείκτες.

#### **4.1.1.2. Αποτελέσματα Θεραπείας**

##### **Σωματοστατίνη**

##### **Υαλουρονικό οξύ**

Η θεραπεία με σωματοστατίνη στους ασθενείς με ΗΚΚ δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στα επίπεδα του υαλουρονικού. Το ίδιο ίσχυε στην ιογενή κίρρωση και στην ΠΧΚ είτε αυτό αφορούσε το περιφερικό είτε το κεντρικό αίμα [**Εικόνα 3Α**].

##### **Λεπτίνη και Λαμινίνη**

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για την λεπτίνη [**Εικόνα 3Β**] και την λαμινίνη [**Εικόνα 3D**], και η θεραπεία με σωματοστατίνη δεν επηρέασε τις τιμές του περιφερικού ή του κεντρικού αίματος.

##### **Κολλαγόνο IV**

Η θεραπεία δεν είχε επίδραση στις τιμές του κολλαγόνου στους ασθενείς με ΗΚΚ, ιογενή κίρρωση ή ΠΧΚ. [**Εικόνα 3C**]

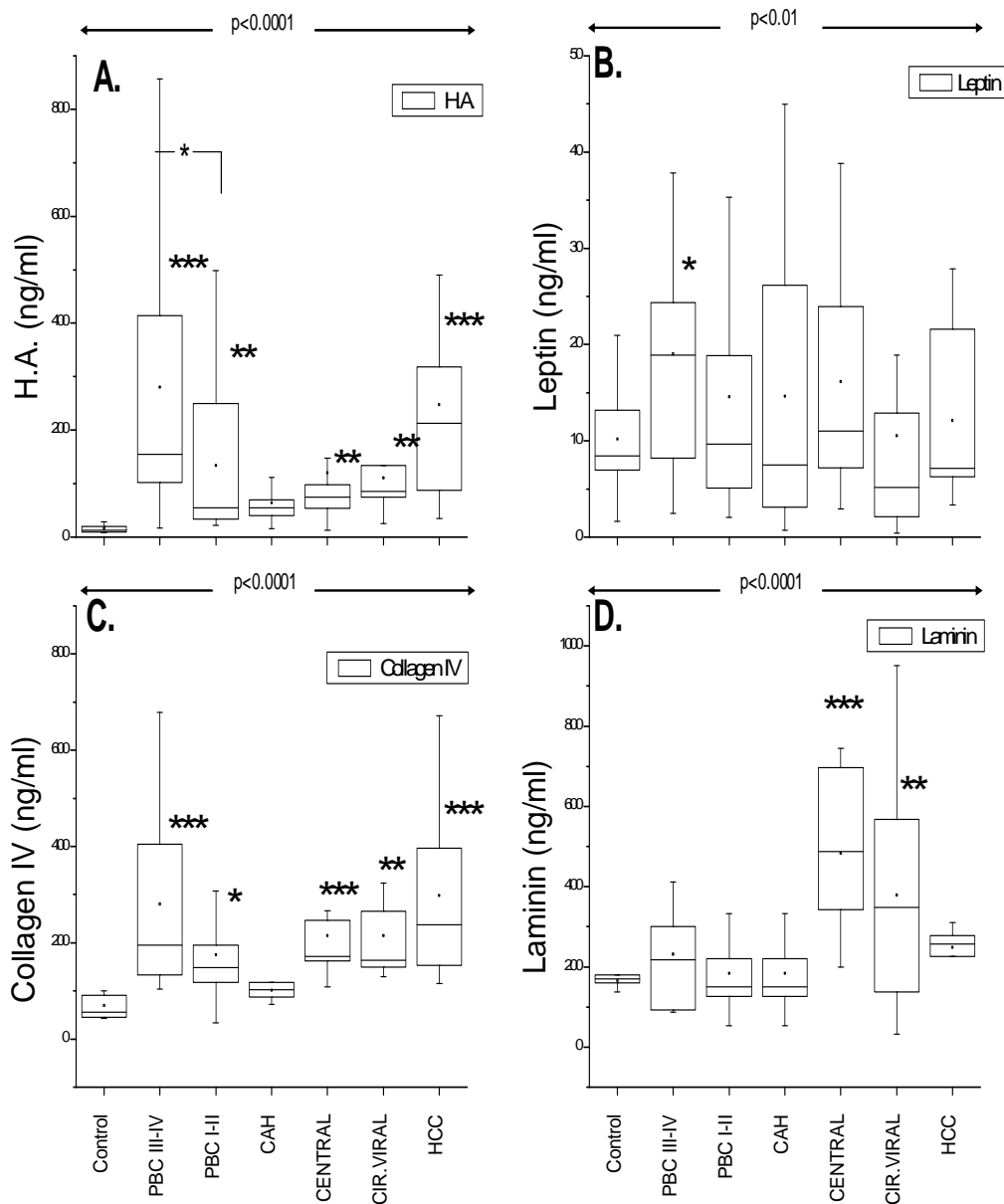
##### **Ουρσοδεοξυχολικό οξύ**

Πρακτικώς το ουρσοδεοξυχολικό οξύ δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στους αντιπροσωπευτικούς δείκτες που μετρήθηκαν. Υπήρχε μία αύξηση του υαλουρονικού οξέος στο περιφερικό αίμα ( $p < 0.001$ ), που δεν αντανάκλαται στο αίμα της ηπατικής φλέβας. [**Εικόνα 4**]

### **Ιντερφερόνη και Ριμπαβιρίνη**

Η **Εικόνα 5** δείχνει το αποτέλεσμα στην χρόνια μη κίρρωτική HCV βλάβη σύμφωνα με την απάντηση στην θεραπεία.

Το υαλουρονικό ήταν αυξημένο μετά την θεραπεία, είτε στους ανταποκριθέντες, είτε στους μη ανταποκριθέντες ή στους υποτροπιάσαντες. Επίσης παρατηρήθηκε μείωση του κολλαγόνου IV τόσο στους ανταποκριθέντες όσο και στους μη ανταποκριθέντες. Οι άλλοι 2 αντιπροσωπευτικοί δείκτες λαμινίνη και λεπτίνη δεν έδειξαν διαφορές πριν και μετά την θεραπεία ασχέτως της απάντησης.



**Εικόνα 1.** Τα θηκογράμματα δείχνουν το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (box), την ενδιάμεση τιμή (οριζόντια γραμμή) και το εύρος (κάθετες γραμμές) των επιπέδων του ορού του Υαλουρονικού (A), της Λεπτίνης (B), του Κολλαγόνου IV (C) και της Λαμινίνης (D) στην ΠΧΚ σταδίου I-II, ΠΧΚ σταδίου III-V, στην χρόνια ενεργό ηπατίτιδα (CAH), στο αίμα της ηπατικής φλέβας ασθενών με ΠΧΚ και ιογενή κίρρωση (CENTRAL), στην ιογενή κίρρωση και στον ΗΚΚ. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Πίνακας 1. ΠΧΚ σταδίου III-IV έναντι ΠΧΚ σταδίου I-II**

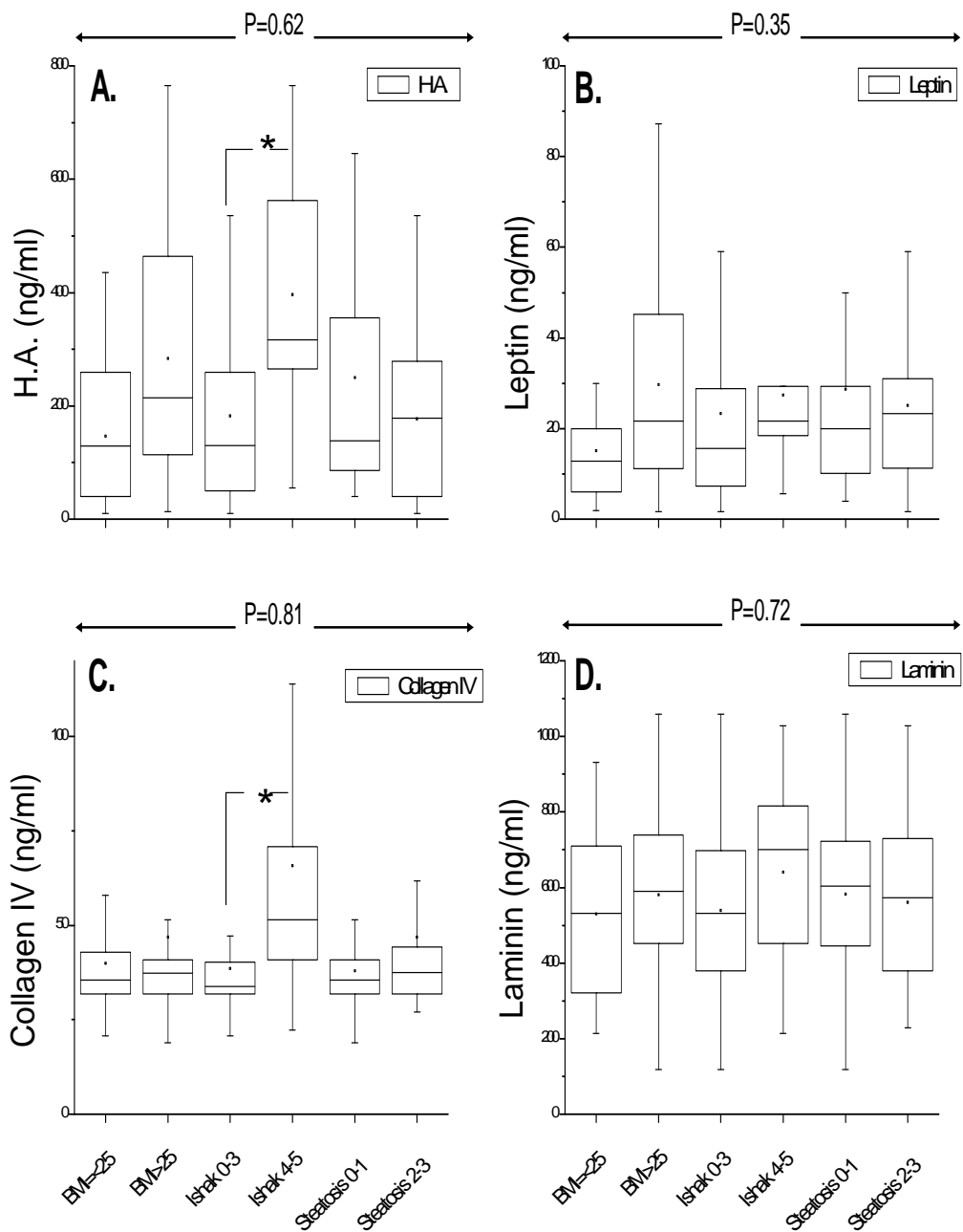
Ευαισθησία, Ειδικότητα, Θετική προγνωστική αξία (PPV), Αρνητική προγνωστική αξία (NPV), Περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) και Likelihood Ratio (LR) για Θετικά αποτελέσματα του Υαλουρονικού οξέος, της Λεπτίνης, της Λαμινίνης και του κολλαγόνου IV στη διάκριση μεταξύ ΠΧΚ σταδίου I-II και σταδίου III-IV.

	<b>ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ</b>	<b>ΛΕΠΤΙΝΗ</b>	<b>ΛΑΜΙΝΙΝΗ</b>	<b>ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ IV</b>
<b>Ευαισθησία</b>	91.3%	66.7%	66.7%	65%
<b>Ειδικότητα</b>	58.1%	66.7%	66.7%	71%
<b>Θετική προγνωστική αξία (PPV )</b>	61.7%	60.0%	50%	62.5%
<b>Αρνητική προγνωστική αξία (NPV)</b>	90%	72.7%	80%	73.3%
<b>Περιοχή κάτω από την καμπύλη AUC (95% CI)</b>	0.74 (0.60-0.87)	0.63 (0.37-0.89)	0.59 (0.27-0.92)	0.70 (0.55-0.84)
<b>LR</b>	2.18	2.00	2.00	2.25

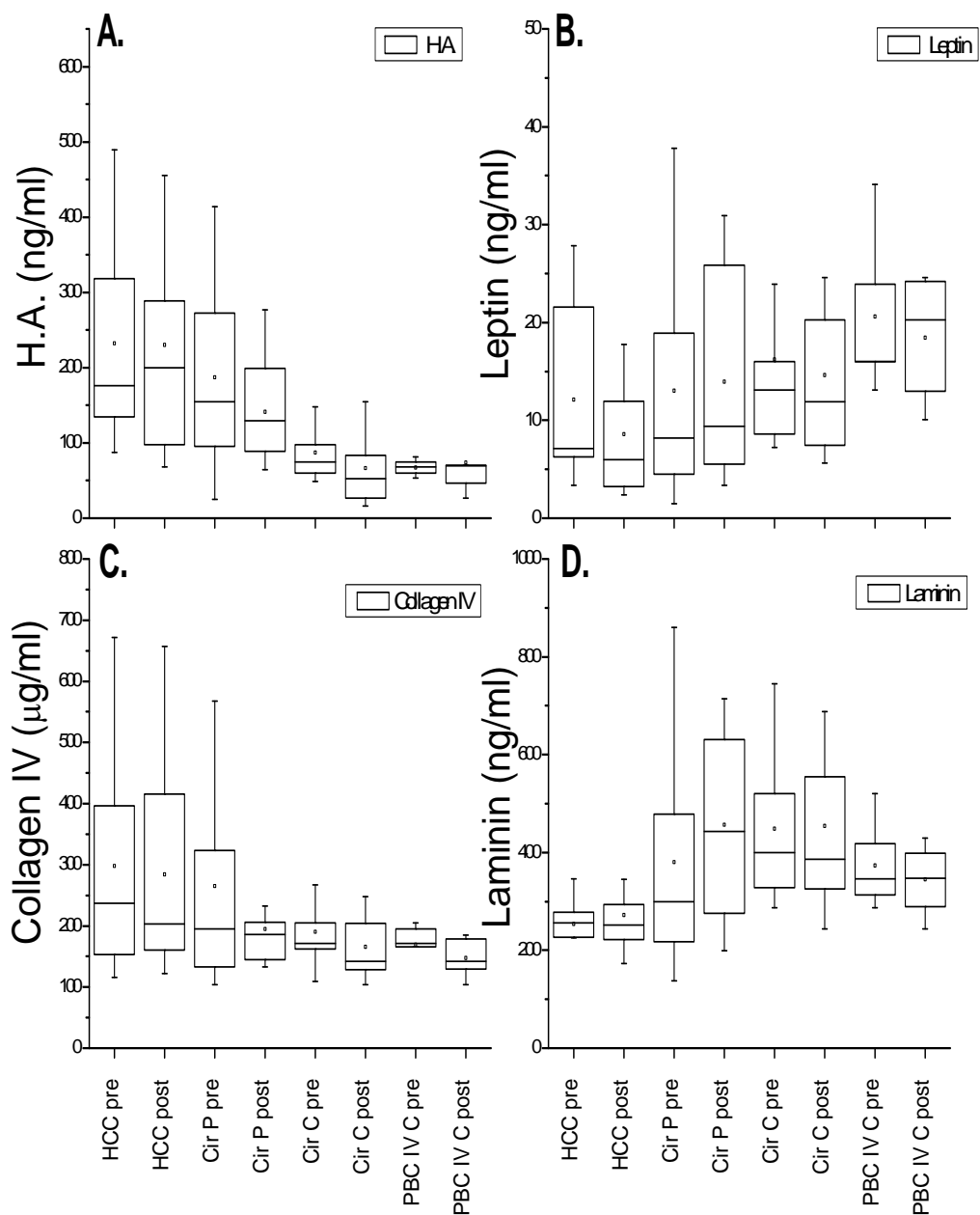
**Πίνακας 2. Χρόνια ηπατίτιδα C έναντι Ιογενούς κίρρωσης**

Ευαισθησία, Ειδικότητα, Θετική προγνωστική αξία (PPV), Αρνητική προγνωστική αξία (NPV), Περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) και Likelihood Ratio (LR) για θετικά αποτελέσματα του Υαλουρονικού οξέος, της Λεπτίνης, της Λαμινίνης και του Κολλαγόνου IV στη διάκριση μεταξύ χρόνιας ηπατίτιδας C και ιογενούς κίρρωσης.

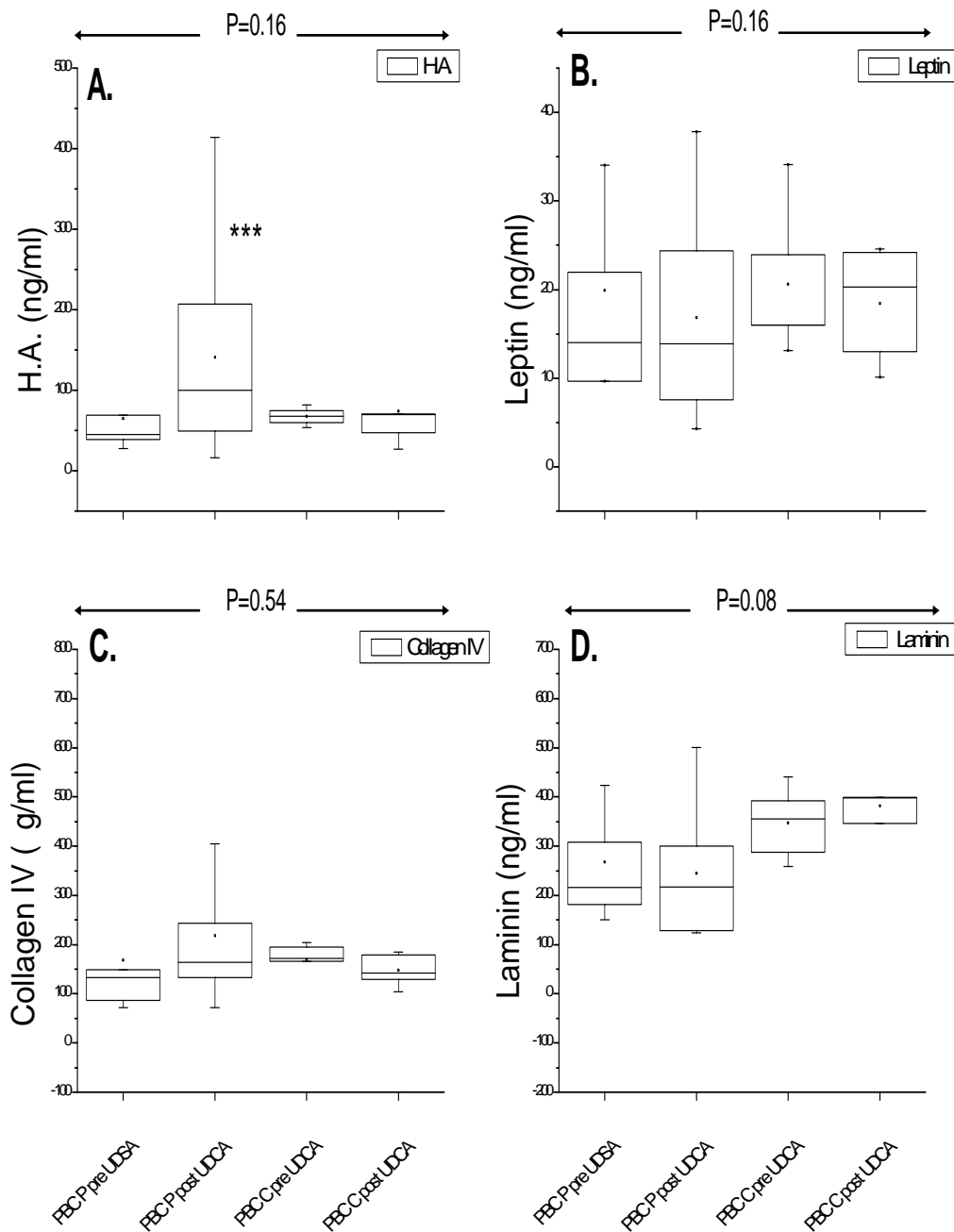
	<b>ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ</b>	<b>ΛΕΠΤΙΝΗ</b>	<b>ΛΑΜΙΝΙΝΗ</b>	<b>ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ IV</b>
<b>Ευαισθησία</b>	75%	24%	50%	60%
<b>Ειδικότητα</b>	83.3%	53.6%	100%	50%
<b>Θετική προγνωστική αξία (PPV )</b>	62.5%	63.6%	100%	71.4%
<b>Αρνητική προγνωστική αξία (NPV)</b>	90%	24.1%	76.9%	37.5%
<b>Περιοχή κάτω από την καμπύλη AUC (95% CI)</b>	0.74 (0.65-0.93)	0.60 (0.40- 0.80)	0.70 (0.60-0.86)	0.94 (0.87-0.99)
<b>LR</b>	1.34	0.41	1.3	2



**Εικόνα 2.** Τα θηκογράμματα δείχνουν το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (box), την ενδιάμεση τιμή (οριζόντια γραμμή) και το εύρος (κάθετες γραμμές) των επιπέδων του ορού του Υαλουρονικού (A), της Λεπτίνης (B), του Κολλαγόνου IV (C) και της Λαμινίνης (D) σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C οι οποίοι ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τον BMI, το στάδιο Ishak και την στεατώση. \*  $p < 0.05$ .

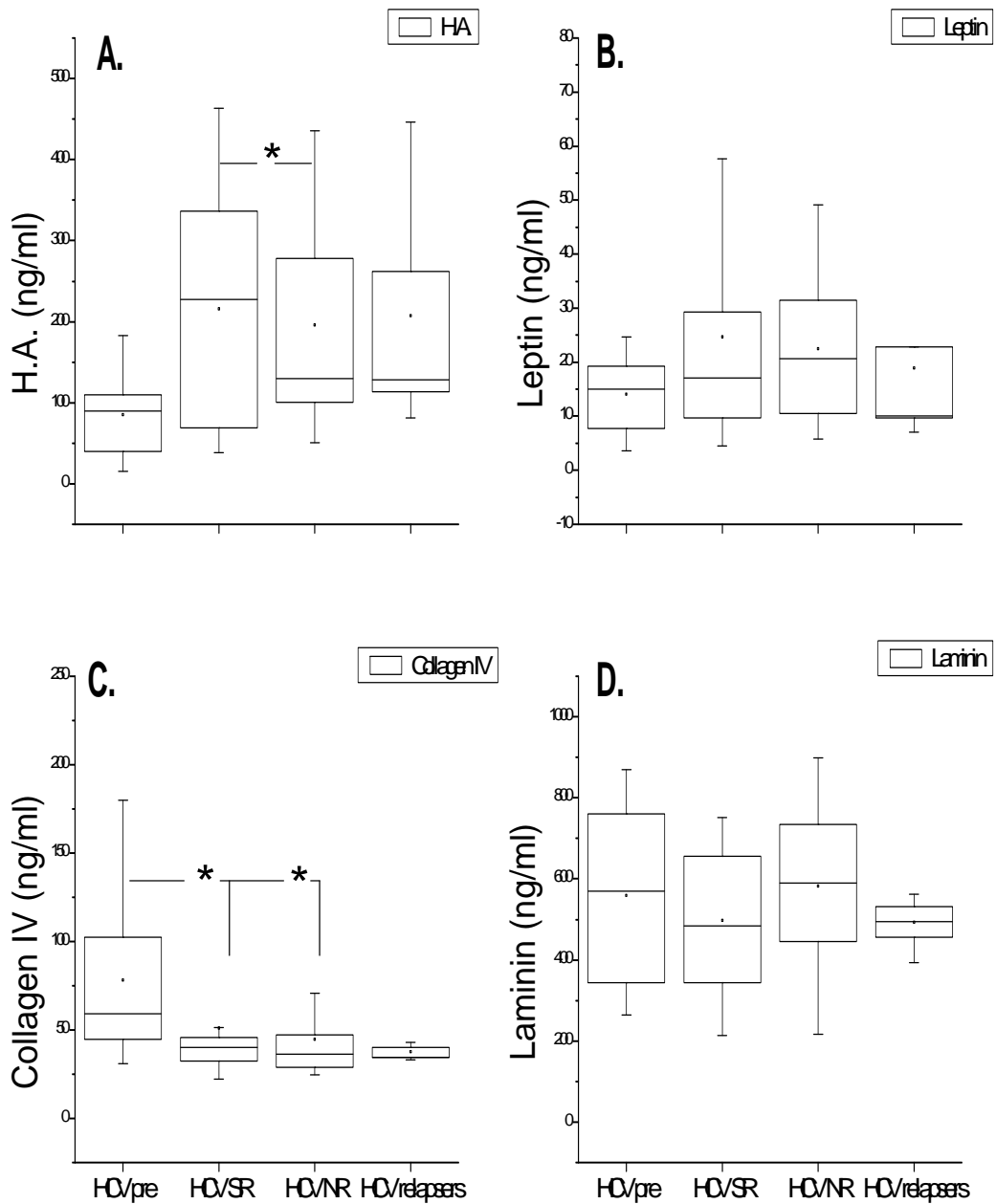


**Εικόνα 3.** Τα θηκογράμματα δείχνουν το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (box), την ενδιάμεση τιμή (οριζόντια γραμμή) και το εύρος (κάθετες γραμμές) των επιπέδων του ορού του Υαλουρονικού (A), της Λεπτίνης (B), του Κολλαγόνου IV (C) και της Λαμινίνης (D) στον περιφερικό ορρό των ασθενών με ΗΚΚ, στον περιφερικό ορρό (P) και στο ορρό της ηπατικής φλέβας (C) των κίρρωτικών ασθενών και στο αίμα της ηπατικής φλέβας (C) των ασθενών με ΠΧΚ πριν και μετά την θεραπεία με μακράς δράσης σωματοστατίνη.



**Εικόνα 4.** Τα θηκογράμματα δείχνουν το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (box), την ενδιάμεση τιμή (οριζόντια γραμμή) και το εύρος (κάθετες γραμμές) των επιπέδων του ορού Υαλουρονικού (A), της Λεπτίνης (B), του Κολλαγόνου IV (C) και της Λαμινίνης (D) στον ορρό της περιφερικής (P) και της ηπατικής (C) φλέβας ασθενών με ΠΧΚ πριν και μετά την θεραπεία με ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UDCA). \*\*\*  $p < 0.001$ .





**Εικόνα 5.** Τα θηκογράμματα δείχνουν το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (box), την ενδιάμεση τιμή (οριζόντια γραμμή) και το εύρος (κάθετες γραμμές) των επιπέδων του ορού του Υαλουρονικού (A), της Λεπτίνης (B), του Κολλαγόνου IV (C) και της Λαμινίνης (D) των χρόνιων HCV μη κίρρωτικών ασθενών, πριν και μετά την θεραπεία οι οποίοι επέδειξαν απάντηση (SR), μη απάντηση (NR) ή υποτροπή της νόσου \*  $p < 0.05$

### 4.1.2. Συζήτηση

Η βιοψία ήπατος παραμένει η μέθοδος αναφοράς για την εκτίμηση του ιστολογικού σταδίου της ηπατικής ίνωσης [1], αλλά δεν παύει να αποτελεί επεμβατική μέθοδο με υπαρκτούς κινδύνους. Μολονότι η θνητότητα μειώνεται ουσιαστικά στο μηδέν όταν εκτελείται υπό υπερηχογραφικό έλεγχο, η νοσηρότητα παραμένει περίπου στο 3% [2]. Η ομοιογένεια της ίνωσης στο ήπαρ των ασθενών με ΠΧΚ είναι περιορισμένη, αφού σε μία μελέτη που αφορούσε ηπατικό ιστό προερχόμενο από μεταμοσχεύσεις ήπατος παρατηρήθηκε μία διαφορά 80% στον βαθμό της ίνωσης εντός του ίδιου ήπατος [3]. Τώρα είναι ευρέως αποδεκτό ότι υπάρχουν διαφορετικού βαθμού βλάβες στα διάφορα τμήματα του ήπατος των ασθενών με ΠΧΚ, καθιστώντας το λάθος του δείγματος περισσότερο πιθανό γι αυτήν την πάθηση.

Ως εκ τούτου υπάρχει σημαντική ανάγκη για την ανεύρεση μη επεμβατικών δεικτών που να διαχωρίζουν την προχωρημένη από την πρώιμη ίνωση ή ακόμη καλύτερα που να μπορούν να ταξινομήσουν τους ασθενείς στα διάφορα στάδια της ίνωσης.

Σε μία προσπάθεια να μειωθούν οι ανάγκες για βιοψία ήπατος χρησιμοποιήθηκαν είτε απλοί βιοχημικοί δείκτες που σχετίζονται με την διαδικασία της ίνωσης (τάξη I) ή πλέον σύνθετοι δείκτες (τάξη II) [4].

Μεταξύ των σύνθετων δεικτών, το Fibrotest έχει μελετηθεί επαρκέστερα [5]. Δυστυχώς η διαθεσιμότητα του για τις κλινικές μελέτες είναι περιορισμένη λόγω του υψηλού κόστους.

Πολλοί έχουν αξιολογηθεί είτε στην χρόνια ιογενή ηπατίτιδα και κίρρωση [6,7] είτε στην μη αλκοολική στεατοηπατοπάθεια (NAFLD) [8,9] και λιγότερο συχνά στην αλκοολική ηπατοπάθεια [10]. Στην ΠΧΚ τα δεδομένα είναι ελάχιστα διότι οι ασθενείς αυτοί συνήθως περιλαμβάνονται σε ομάδες χρόνιας ηπατοπάθειας και δεν αναλύονται χωριστά. Επιπλέον μέχρι τώρα δεν έχουν μελετηθεί οι δείκτες του ορού που προέρχονται από αίμα της ηπατικής φλέβας. Επιπρόσθετα, το αποτέλεσμα της θεραπείας με UDCA επί των ορολογικών δεικτών δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Επιλέξαμε να εκτιμήσουμε το αποτέλεσμα βραχυχρόνιας θεραπείας με ουρσοδεοξυχολικό οξύ, δηλ. μετά από 6μηνη χορήγηση του, με σκοπό την αποφυγή της πιθανής παρέμβασης της φυσικής εξέλιξης της νόσου στα αποτελέσματα. Παρόμοια επίπεδα μετά από 2ετή θεραπεία θα μπορούσαν να υποδηλώνουν είτε αρνητική επίδραση του φαρμάκου είτε διακοπή της πορείας της ίνωσης. Επεξήγηση θα ήταν δυνατή

μόνο εάν υπήρχε διαθέσιμη ομάδα ελέγχου, κάτι που δεν θεωρείται σήμερα ηθικό. Ως εκ τούτου επιλέξαμε μία σύντομη περίοδο αφού η βιοχημική βελτίωση εμφανίζεται 4-5 μήνες μετά την θεραπεία με ουρσοδεοξυχολικό οξύ. Ως νοσήματα ελέγχου μελετήθηκαν ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C και ασθενείς με ιογενή κίρρωση.

Ασθενείς με κίρρωση του ήπατος και ηπατοκυτταρικό καρκίνο επιλέχθηκαν ως επιπρόσθετη ομάδα ελέγχου για να εκτιμηθεί εάν η παρουσία του ΗΚΚ μπορεί να τροποποιήσει τα αποτελέσματα.

Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί ότι **το υαλουρονικό οξύ** έχει προγνωστική αξία για την πρόβλεψη της προόδου από τα πρώιμα προς τα τελικά στάδια της ΠΧΚ [13], εύρημα που επιβεβαιώνει προηγούμενη ένδειξη ότι το υαλουρονικό συσχετίζεται με τα ιστολογικά στάδια [14,15].

Εν τούτοις, συσχέτιση του υαλουρονικού με την επιβίωση δεν διαπιστώθηκε μολονότι ασθενείς με προχωρημένη νόσο είχαν υψηλότερες τιμές [16]. Σε πρόσφατη δημοσίευση από την Φιλανδία [17], οι τιμές της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC) του υαλουρονικού για τα αρχικά και τελικά στάδια της ΠΧΚ ήταν περίπου 0.65 σαφώς μικρότερες από τις δικές μας 0.74.

Επίσης σε συμφωνία με την Φιλανδική μελέτη οι τιμές του υαλουρονικού αλλά και του κολλαγόνου IV στην μελέτη μας ήταν αυξημένες στα τελικά στάδια της ΠΧΚ σε σύγκριση με τα αρχικά, αν και στην παρούσα μελέτη η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική για το κολλαγόνο IV.

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα του υαλουρονικού ήταν σημαντικά αυξημένα σε όλες τις περιπτώσεις χρόνιας ηπατοπάθειας ανεξαρτήτως αιτιολογίας. Μεταξύ των απλών βιοχημικών δεικτών της τάξης I το υαλουρονικό εμφανίζει ευαισθησία μεταξύ 86-100%, ειδικότητα περίπου 88%, υψηλή αρνητική προγνωστική αξία (98-100%), αλλά χαμηλότερη θετική προγνωστική αξία (61%), τουλάχιστον στην (NAFLD) [18] και στην χρόνια ηπατίτιδα C [19,20]. Στους δικούς μας ασθενείς με ΠΧΚ βρέθηκαν παρόμοιες τιμές για όλα αλλά η ειδικότητα του 58% ήταν σημαντικά χαμηλότερη από αυτές που προαναφέρθηκαν.

Τα επίπεδα του υαλουρονικού επηρεάζονται τόσο από την έκκριση από τα ενεργοποιημένα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα όσο και από την μειωμένη κάθαρση από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών [21]. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι ο κύριος λόγος για τα αυξημένα επίπεδα υαλουρονικού τόσο στην ΠΧΚ όσο και στον ΗΚΚ είναι πιθανώς η μειωμένη κάθαρση δεδομένου ότι τα επίπεδα στην ηπατική φλέβα είναι σχετικά χαμηλά [Εικόνα 1].

Επιπλέον εμείς θεωρούμε ότι το αρνητικό αποτέλεσμα του UDCA στα επίπεδα του υαλουρονικού στο περιφερικό αίμα μπορεί να υποδηλώνει ότι το φάρμακο δεν διορθώνει την πιθανή βλάβη στην κάθαρση του Υαλουρονικού από τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Από την άποψη αυτή είναι σημαντικό ότι ακόμη και ασθενείς με πρώιμη ΠΧΚ έχουν υψηλά επίπεδα υαλουρονικού.

Σε προηγούμενες μελέτες από το εργαστήριο μας έχουν αναφερθεί αυξημένα επίπεδα ενδοθηλίνης 2, ήδη από τα αρχικά στάδια της ΠΧΚ θέτοντας την υπόθεση ότι κάποια ανωμαλία των ενδοθηλιακών κυττάρων πιθανόν να σχετίζεται με την παθογένεια της ΠΧΚ [22,23]. Σε συμφωνία με την υπόθεση αυτή τα υψηλά επίπεδα του υαλουρονικού πιθανόν υποδηλώνουν μία τέτοια είδους ανωμαλία.

Στην παρούσα μελέτη όσον αφορά στην διάκριση μεταξύ πρώιμης και προχωρημένης ίνωσης η AUC ήταν 0.74 τόσο για την ΠΧΚ όσο και για την χρόνια ηπατίτιδα C, αντιθέτως προς μία AUC 0.90 για την ηπατίτιδα C που έχει αναφερθεί από άλλους [24] αλλά σε συμφωνία με AUC 0.65 που αναφέρθηκε σε αιμοκαθερόμενους ασθενείς με ηπατίτιδα C [25] ή σε άλλη με AUC 0.75 σε ασθενείς με NAFLD [26].

Μεταξύ των άλλων βιοχημικών δεικτών που μελετήθηκαν στην ΠΧΚ, **το κολλαγόνο IV** φαίνεται να είναι ο περισσότερο υποσχόμενος δείκτης μολονότι σε μία προηγούμενη μικρή μελέτη μόνο 4/22 ασθενείς με ΠΧΚ είχαν αυξημένα επίπεδα [13]. Αντιθέτως, μελέτη από την Ιαπωνία έδειξε υψηλά επίπεδα του 7S κολλαγόνου IV σε συμπτωματικούς ασθενείς με ΠΧΚ σε σύγκριση με τους ασυμπτωματικούς και οι τιμές συσχετιζόνταν με το ιστολογικό στάδιο [27], αποτελέσματα που συμφωνούν με την δική μας μελέτη **[Εικόνα 1]**.

Παρά την AUC 0.70 στους ασθενείς μας με ΠΧΚ το κολλαγόνο IV του ορού παρουσίαζε μέτρια ευαισθησία, ειδικότητα, PPV και NPV καθιστώντας το ακατάλληλο για την διάκριση της ίνωσης. Το κολλαγόνο IV έδειξε ευαισθησία 41% και ειδικότητα 95% στη διάκριση μεταξύ πρώιμης και προχωρημένης ίνωσης στην NASH [28], ενώ σε άλλη εργασία στο ίδιο νόσημα αναφέρθηκε AUC 0.76 [26], αποτελέσματα όμοια με τα δικά μας στην ΠΧΚ. Στην τελευταία αυτή εργασία το κολλαγόνο IV αυξανόταν σταδιακά αναλόγως με το στάδιο της ίνωσης. Αυτό ήταν αληθές και στην μελέτη μας όπου οι τιμές για την ιογενή κίρρωση ήταν υψηλότερες από την χρόνια ηπατίτιδα όπως και στα προχωρημένα στάδια της ΠΧΚ σε σχέση με τα πρώιμα. Εν τούτοις, η διαφορά

δεν ήταν στατιστικώς σημαντική λόγω της ευρείας διασποράς των αποτελεσμάτων.

Τα αποτελέσματα για **την λαμινίνη** είναι αντιφατικά. Παλαιότερες μελέτες έδειξαν σημαντική αύξηση στην ΠΧΚ σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα [13], ενώ σε μεγαλύτερες σειρές η λαμινίνη δεν ήταν μεταξύ των παραγόντων που συνδυάζονταν με την είσοδο στο τελικό στάδιο της νόσου [27], αποτέλεσμα που συμφωνεί με την δική μας μελέτη, όπου στους ασθενείς με ΠΧΚ τα επίπεδα της λαμινίνης στον ορό δεν διαφέρουν από αυτά των φυσιολογικών ατόμων.

Επί πλέον, η λαμινίνη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διάκριση μεταξύ πρώιμης και προχωρημένης ίνωσης στην ΠΧΚ. Επίσης, υπήρξε αναφορά όπου τα επίπεδα της λαμινίνης συσχετίζονται με την πίεση εντός της πυλαίας φλέβας[29]. Στην μελέτη μας, σε αντίθεση με την ΠΧΚ, τα επίπεδα του ορού αυξάνονται σημαντικά μόνο στην ιογενή κίρρωση. Ομοίως, η 100% ειδικότητα και PPV [Πίνακας 2] καθιστούν την λαμινίνη τον καλύτερο απλό βιοχημικό δείκτη για τις διαχρονικές μελέτες της ίνωσης στην χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια. Όπως αναφέρθηκε ήδη για το υαλουρονικό ένα από τα προβλήματα των βιοχημικών δεικτών της ίνωσης είναι ότι τα επίπεδα του ορού δεν επηρεάζονται μόνο από την παραγωγή αλλά και από άλλους παράγοντες. Μολονότι το κολλαγόνο IV και η λαμινίνη έδειξαν ικανοποιητική συσχέτιση με τον βαθμό της ηπατικής ίνωσης [30,31], αντανακλούν την αναδόμηση/αποδόμηση της βασικής μεμβράνης και πιθανόν την τριχοειδοποίηση των κολποειδών[32]. Θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν την ινόλυση μάλλον παρά την ίνωση [33]. Η λαμινίνη, όπως και το υαλουρονικό, θεωρείται ότι καθαιρείται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών [34]. Εν τούτοις, τα αποτελέσματα μας δεν υποστηρίζουν αυτό δεδομένου ότι τα επίπεδα της λαμινίνης στις ηπατικές φλέβες είναι πολύ υψηλά, αλλά αυτό δεν συμβαίνει με το υαλουρονικό, πιθανώς δείχνοντας ότι τα υψηλά επίπεδα στην ηπατική φλέβα οφείλονται στην αυξημένη αναδόμηση/αποδόμηση της βασικής μεμβράνης παρά στην μειωμένη κάθαρση.

**Η Λεπτίνη** έχει μελετηθεί για τον ρόλο της στην ίνωση [35] και αυτός είναι ο λόγος που επιλέγει στην παρούσα μελέτη. Ενεργοποιεί τα κύτταρα του Kupffer και υποκινεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα να παράγουν TGFβ [36]. Επίσης έχει άμεση δράση στην μετατροπή των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων σε μία προ ινωτική μορφή. [37].

Τα επίπεδα λεπτίνης αναφέρθηκαν αυξημένα στην ιογενή κίρρωση σε σχέση με την χρόνια ηπατίτιδα [38] αλλά αυτό δεν επιβεβαιώνεται στην μελέτη μας.

Επιπλέον μελετήσαμε τα επίπεδα στον ορό σύμφωνα με το BMI και την παρουσία της στεάτωσης στην ιογενή ηπατίτιδα και κίρρωση. Αυτό έγινε διότι τα επίπεδα της λεπτίνης στην NASH, έχουν δημοσιευτεί είτε αυξημένα αλλά μη σχετιζόμενα με το BMI [39] είτε χωρίς διαφορές μεταξύ ασθενών με NASH και υγιών ατόμων [40]. Σε μία άλλη μελέτη έχει αναφερθεί συσχέτιση με τον βαθμό της στεάτωσης αλλά όχι της ίνωσης [41].

Σε έναν αριθμό μελετών τα επίπεδα λεπτίνης, μολονότι αυξημένα σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα, δεν συνδυάζονταν με την σοβαρή ίνωση στην χρόνια ηπατίτιδα C [41-44]. Σε συμφωνία με τις μελέτες αυτές στην δική μας μελέτη τα επίπεδα λεπτίνης ήταν επίσης αυξημένα στην χρόνια ηπατίτιδα ανεξαρτήτως του Ishak score, του δείκτη μάζας σώματος (BMI) ή της στεάτωσης αλλά το ίδιο συνέβαινε και στον ΗΚΚ και στην πρόιμη και προχωρημένη ΠΧΚ σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Ουδεμία διαφορά διαπιστώθηκε μεταξύ πρόιμης και προχωρημένης ίνωσης. Έτσι τα αυστηρά δεδομένα που προκύπτουν από μελέτες σε ζωικά μοντέλα για την λεπτίνη, ως ενός προϊνωτικού παράγοντα, δεν είναι παράλληλα με τα δεδομένα που προκύπτουν από τα επίπεδα του ορού των ασθενών, εύρημα παρόμοιο με τα δικά μας.

Βιβλιογραφικά έχει δειχθεί ότι η λεπτίνη συσχετίζεται είτε με την αυξημένη αγγειογένεση στον ΗΚΚ[11] είτε με την επαγωγή, τον πολλαπλασιασμό και την διηθητικότητα του ΗΚΚ [12]. Παρά ταύτα στην παρούσα μελέτη αυτό δεν επιβεβαιώνεται, δεδομένου ότι τα επίπεδα λεπτίνης στον ορό ασθενών με ΗΚΚ δεν διέφεραν από εκείνα των φυσιολογικών μαρτύρων.

Τα δεδομένα μας δεν σχεδιάστηκαν για να προσφέρουν πρόγνωση στην ΠΧΚ αλλά παρά ταύτα η AUC τόσο για το υαλουρονικό όσο και για το κολλαγόνο IV είναι παρόμοιες με ένα περίπλοκο προγνωστικό μοντέλο δημοσιευμένο πρόσφατα [45]. Σε μία μεγάλη σειρά 153 ασθενών με ΠΧΚ μόνο δύο μεταβλητές συσχετιζόνταν ανεξαρτήτως με την εκτεταμένη ίνωση, το υαλουρονικό του ορού και η χολερυθρίνη [46]. Οι συγγραφείς πρότειναν ένα δείκτη ίνωσης αποτελούμενο από το υαλουρονικό και την χολερυθρίνη για την διάκριση μεταξύ εκτεταμένης και ήπιας ίνωσης όπου η AUC ήταν 0.79, η ευαισθησία 94%, η ειδικότητα 13%, η θετική προγνωστική αξία 58% και η αρνητική 62%. Στην δική μας μελέτη το υαλουρονικό μόνο του επιτελεί τον ίδιο ρόλο εξίσου καλά.

Σύμφωνα με τις γνώσεις μας, δεν υπάρχει μέχρι τώρα μελέτη που να εκτιμά τα αποτελέσματα της θεραπείας με **ουρσοδεοξυχολικό οξύ** επί των βιοχημικών δεικτών στην ΠΧΚ. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η βραχυχρόνια θεραπεία

με UDCA δεν επιδρά σε κανέναν από τους δείκτες που μελετήθηκαν. Εάν το φάρμακο έχει οποιοδήποτε αποτέλεσμα στην πρόοδο της ίνωσης, δείκτες που σχετίζονται κυρίως με την ινόλυση, όπως το κολλαγόνο IV, πρέπει να αυξάνουν μετά την θεραπεία. Αυτό πραγματικά συμβαίνει στην μελέτη μας, δεδομένου ότι τα επίπεδα του κολλαγόνου IV αυξήθηκαν μετά την θεραπεία, αν και αυτό δεν ήταν στατιστικώς σημαντικό.

**Η σωματοστατίνη** επίσης ουδεμία επίδραση έδειξε σε όλους τους δείκτες που μελετήθηκαν, πράγμα που υποδηλώνει ότι η μακροχρόνια χρήση της πιθανότατα δεν θα έχει δυσμενή επίδραση στην πορεία της ίνωσης.

Μια πιθανή εξήγηση για τα διαφορετικά αποτελέσματα των διαφόρων μελετών, ίσως αποτελούν οι ανεπαρκείς σταθερές αναφοράς, με άλλα λόγια το μήκος των βιοψιών ήπατος [47], που μπορεί να επηρεάζει την σωστή ταξινόμηση των σταδίων της ίνωσης, ένα πρόβλημα που έχει ανασκοπηθεί πρόσφατα [48]. Προσπαθήσαμε να αποφύγουμε το πρόβλημα αυτό ταξινομώντας την ίνωση με ευρύτερους όρους, συγκρίνοντας δηλαδή την πρώιμη με την προχωρημένη ίνωση. Στους ασθενείς μας με ΠΧΚ, το 90% είχε μήκος βιοπτικού υλικού άνω των 10mm, αλλά μόνον το 30% είχε 11 ή περισσότερα πυλαία διαστήματα ώστε να υπερκερασθεί το συγκεκριμένο πρόβλημα, αποτέλεσμα όμοιο με προηγούμενης μελέτης [17].

Τα περισσότερα προβλήματα της χρήσης των βιοχημικών δεικτών της ηπατικής ίνωσης έχουν ανασκοπηθεί πρόσφατα [49]. Μία από τις προκλήσεις της σύγχρονης ηπατολογίας, είναι η ανάπτυξη αξιόπιστων δεικτών που θα παράσχουν καλύτερα προγνωστικά μοντέλα για την αξιολόγηση των θεραπειών και την πρόβλεψη της θνητότητας [50]. Η ελαστογραφία, μία απλή μη επεμβατική τεχνική μπορεί να είναι χρήσιμη από αυτή την άποψη [51]. Ενδιαφέρουσα θα ήταν η σύγκριση της με τους απλούς δείκτες ορρού.

Κατόπιν των αποτελεσμάτων μας, πιστεύουμε ότι το υαλουρονικό είναι ο πλέον ευαίσθητος και κατάλληλος δείκτης για μακροχρόνιες προοπτικές μελέτες στην ΠΧΚ ενώ η λαμινίνη είναι ο καλύτερος δείκτης για παρόμοιες μελέτες στην χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια.

### **4.1.3. Βιβλιογραφία**

1. Afdhal NH, Nunes D: Evaluation of liver fibrosis: A concise review. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1160-1174.
2. Piccinino F, Sagnelli E, Pasquale G, et al.: Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. *J Hepatol* 1986;2:165-173.
3. Garrido MC, Hubscher SG: Accuracy of staging in primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol* 1996;49:556-559.
4. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM: Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fiction and reality. *J Cell Mol Med* 2007;11:1031-1051.
5. Poynard T, Morra R, Halfon P, et al.: Meta-analyses of fibrotest diagnostic value in chronic liver disease. *BMC Gastroenterol* 2007;7:40.
6. Bourliere M, Penaranda G, Renou C, et al.: Validation and comparison of indexes for fibrosis and cirrhosis prediction in chronic hepatitis c patients: Proposal for a pragmatic approach classification without liver biopsies. *J Viral Hepat* 2006;13:659-670.
7. Parkes J, Guha IN, Roderick P, et al.: Performance of serum marker panels for liver fibrosis in chronic hepatitis c. *J Hepatol* 2006;44:462-474.
8. Poynard T, Ratzu V, Charlotte F, et al.: Diagnostic value of biochemical markers (nashtest) for the prediction of non alcoholic steato hepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2006;6:34.
9. Guha IN, Parkes J, Roderick P, et al.: Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the european liver fibrosis panel and exploring simple markers. *Hepatology* 2008;47:455-460.



10. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, et al.: Serum markers detect the presence of liver fibrosis: A cohort study. *Gastroenterology* 2004;127:1704-1713.
11. Ribatti D, Belloni AS, Nico B, et al.: Leptin-leptin receptor are involved in angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *Peptides* 2008;29:1596-1602.
12. Saxena NK, Sharma D, Ding X, et al.: Concomitant activation of the jak/stat, pi3k/akt, and erk signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2007;67:2497-2507.
13. Poupon RE, Balkau B, Guechot J, et al.: Predictive factors in ursodeoxycholic acid-treated patients with primary biliary cirrhosis: Role of serum markers of connective tissue. *Hepatology* 1994;19:635-640.
14. Nyberg A, Engstrom-Laurent A, Loof L: Serum hyaluronate in primary biliary cirrhosis--a biochemical marker for progressive liver damage. *Hepatology* 1988;8:142-146.
15. Nyberg A, Lindqvist U, Engstrom-Laurent A: Serum hyaluronan and aminoterminal propeptide of type iii procollagen in primary biliary cirrhosis: Relation to clinical symptoms, liver histopathology and outcome. *J Intern Med* 1992;231:485-491.
16. Rimmel T, Rimmel H, Salupere V: Aminoterminal propeptide of type iii procollagen and hyaluronan in patients with primary biliary cirrhosis: Markers of fibrosis in primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:1016-1020.
17. Farkkila M, Rautiainen H, Karkkainen P, et al.: Serological markers for monitoring disease progression in noncirrhotic primary biliary cirrhosis on ursodeoxycholic acid therapy. *Liver Int* 2008;28:787-797.

18. Lydatakis H, Hager IP, Kostadelou E, et al.: Non-invasive markers to predict the liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2006;26:864-871.
19. Guechot J, Laudat A, Loria A, et al.: Diagnostic accuracy of hyaluronan and type iii procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis c evaluated by roc curve analysis. *Clin Chem* 1996;42:558-563.
20. Kaneda H, Hashimoto E, Yatsuji S, et al.: Hyaluronic acid levels can predict severe fibrosis and platelet counts can predict cirrhosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:1459-1465.
21. Gressner AM, Haarmann R: Hyaluronic acid synthesis and secretion by rat liver fat storing cells (perisinusoidal lipocytes) in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;151:222-229.
22. Dimoulis P, Kolios G, Notas G, et al.: Ursodeoxycholic acid reduces increased circulating endothelin 2 in primary biliary cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21:227-234.
23. Kouroumalis E, Notas G: Pathogenesis of primary biliary cirrhosis: A unifying model. *World J Gastroenterol* 2006;12:2320-2327.
24. Parise ER, Oliveira AC, Figueiredo-Mendes C, et al.: Noninvasive serum markers in the diagnosis of structural liver damage in chronic hepatitis c virus infection. *Liver Int* 2006;26:1095-1099.
25. Schiavon LL, Narciso-Schiavon JL, Carvalho Filho RJ, et al.: Serum levels of ykl-40 and hyaluronic acid as noninvasive markers of liver fibrosis in haemodialysis patients with chronic hepatitis c virus infection. *J Viral Hepat* 2008;15:666-674.
26. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, et al.: Type iv collagen 7s domain is an independent clinical marker of the severity of fibrosis in patients with

nonalcoholic steatohepatitis before the cirrhotic stage. *J Gastroenterol* 2007;42:375-381.

27. Fukutomi T, Sakamoto S, Isobe H, et al.: Clinical significance of the serum levels of the 7s domain of type iv collagen in patients with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1992;7:596-601.

28. Shimada M, Kawahara H, Ozaki K, et al.: Usefulness of a combined evaluation of the serum adiponectin level, homa-ir, and serum type iv collagen 7s level to predict the early stage of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1931-1938.

29. Gressner AM, Tittor W, Kropf J: The predictive value of serum laminin for portal hypertension in chronic liver diseases. *Hepatogastroenterology* 1988;35:95-100.

30. Kropf J, Gressner AM, Negwer A: Efficacy of serum laminin measurement for diagnosis of fibrotic liver diseases. *Clin Chem* 1988;34:2026-2030.

31. Yamada S, Suou T, Kawasaki H, et al.: Clinical significance of serum 7s collagen in various liver diseases. *Clin Biochem* 1992;25:467-470.

32. Niemela O, Risteli L, Sotaniemi EA, et al.: Type iv collagen and laminin-related antigens in human serum in alcoholic liver disease. *Eur J Clin Invest* 1985;15:132-137.

33. Schuppan D, Stolzel U, Oesterling C, et al.: Serum assays for liver fibrosis. *J Hepatol* 1995;22:82-88.

34. Smedsrod B, Paulsson M, Johansson S: Uptake and degradation in vivo and in vitro of laminin and nidogen by rat liver cells. *Biochem J* 1989;261:37-42.

35. Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, et al.: Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 2002;37:206-213.

36. Ikejima K, Takei Y, Honda H, et al.: Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002;122:1399-1410.
37. Marra F: Leptin and liver tissue repair: Do rodent models provide the answers? *J Hepatol* 2007;46:12-18.
38. Manolakopoulos S, Bethanis S, Liapi C, et al.: An assessment of serum leptin levels in patients with chronic viral hepatitis: A prospective study. *BMC Gastroenterol* 2007;7:17.
39. Uygun A, Kadayifci A, Yesilova Z, et al.: Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3584-3589.
40. Angulo P, Alba LM, Petrovic LM, et al.: Leptin, insulin resistance, and liver fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2004;41:943-949.
41. Chitturi S, Farrell G, Frost L, et al.: Serum leptin in nash correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: A manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002;36:403-409.
42. Myers RP, Messous D, Poynard T, et al.: Association between leptin, metabolic factors and liver histology in patients with chronic hepatitis c. *Can J Gastroenterol* 2007;21:289-294.
43. Piche T, Vandebos F, Abakar-Mahamat A, et al.: The severity of liver fibrosis is associated with high leptin levels in chronic hepatitis c. *J Viral Hepat* 2004;11:91-96.
44. Testa R, Franceschini R, Giannini E, et al.: Serum leptin levels in patients with viral chronic hepatitis or liver cirrhosis. *J Hepatol* 2000;33:33-37.

45. Mayo MJ, Parkes J, Adams-Huet B, et al.: Prediction of clinical outcomes in primary biliary cirrhosis by serum enhanced liver fibrosis assay. *Hepatology* 2008;48:1549-1557.
46. Corpechot C, Poujol-Robert A, Wendum D, et al.: Biochemical markers of liver fibrosis and lymphocytic piecemeal necrosis in udca-treated patients with primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2004;24:187-193.
47. Standish RA, Cholongitas E, Dhillon A, et al.: An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut* 2006;55:569-578.
48. Burroughs AK, Cholongitas E: Non-invasive tests for liver fibrosis: Encouraging or discouraging results? *J Hepatol* 2007;46:751-755.
49. McHutchison J, Poynard T, Afdhal N: Fibrosis as an end point for clinical trials in liver disease: A report of the international fibrosis group. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:1214-1220.
50. Gluud C, Brok J, Gong Y, et al.: Hepatology may have problems with putative surrogate outcome measures. *J Hepatol* 2007;46:734-742.
51. Castera L, Vergniol J, Foucher J, et al.: Prospective comparison of transient elastography, fibrotest, apri, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis c. *Gastroenterology* 2005;128:343-350.

## 4.2. ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ TGFβ

### 4.2.1. Αποτελέσματα

#### 4.2.1.1. Επίπεδα ορού

##### TGFb1

Υπήρχε ισχυρή διαφορά μεταξύ των διαφόρων ομάδων ( $p < 0.0001$ ). Οι ασθενείς είτε με ιογενή κίρρωση είτε με ΠΧΚ είχαν χαμηλότερες τιμές σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (HCV κίρρωση 11.6 ng/ml εύρος 5.0-33, ΠΧΚ σταδίου III-IV 13.4ng/ml εύρος 7.4-26.2 έναντι 30.9 ng/ml εύρος 20.9-37.8 για τους υγιείς μάρτυρες). Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C είχαν τιμές παρόμοιες με εκείνες των μαρτύρων (26.1ng/ml εύρος 15.4-31.9) [Εικόνα 1]. Οι ασθενείς με πρώιμη ΠΧΚ είχαν χαμηλότερα επίπεδα από την ομάδα ελέγχου (22.5 ng/ml εύρος 7.2-38.3) αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Τα επίπεδα του TGFb1 ήταν επίσης χαμηλά στο αίμα της ηπατικής φλέβας.

##### TGFb2

Επίσης υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ( $p < 0.0001$ ). Εν τούτοις οι ασθενείς με ιογενή κίρρωση (442.4 pg/ml εύρος 282.8-967.0) είχαν υψηλότερα επίπεδα από την ομάδα ελέγχου (370.5pg/ml εύρος 235.0-495.7) ενώ οι κίρρωτικοί ασθενείς με ΗΚΚ είχαν τις υψηλότερες τιμές. Αντίθετα, οι ασθενείς είτε με πρώιμη (349.2 pg/ml εύρος 208.4- 616.2) είτε με προχωρημένη ΠΧΚ (384.7 pg/ml εύρος 298.9-543.8) είχαν επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα των μαρτύρων. Επίσης αυτό είχε αντανάκλαση στις τιμές του αίματος της ηπατικής φλέβας. [Εικόνα 2].

##### TGFb3

Μολονότι η διαφορά μεταξύ των ομάδων ήταν επίσης πολύ σημαντική ( $p < 0.0001$ ) το προφίλ ήταν τελείως διαφορετικό. Οι ασθενείς με πρώιμη (94.3 pg/ml εύρος 41.5-358.6,  $p < 0.05$ ) και προχωρημένη ΠΧΚ (152.8 pg/ml εύρος 60.4-361.2,  $p < 0.001$ ) είχαν υψηλές τιμές σε σύγκριση με τους μάρτυρες (47.2 pg/ml εύρος 27.0-79.7 στους υγιείς μάρτυρες), αλλά οι ασθενείς με ιογενή κίρρωση (37.4 pg/ml εύρος 13.3-84.0,  $p < 0.05$ ) είχαν στατιστικώς χαμηλότερες τιμές σε σύγκριση είτε με τους υγιείς μάρτυρες είτε με τις δύο ομάδες των

ασθενών με ΠΧΚ ( $p < 0.05$  και  $p < 0.01$  αντίστοιχα). Τα επίπεδα ήταν υψηλά στην ηπατική φλέβα των ασθενών με ΠΧΚ ( $p < 0.01$ ) και χαμηλά στο αίμα των ασθενών με ιογενή κίρρωση ( $p < 0.05$ ) [Εικόνα 3].

#### **4.2.1.2. Ανοσοϊστοχημεία**

##### **TGFb1**

Υπήρχε έκφραση στο επιθήλιο των χοληφόρων αγγείων και σε ένα αριθμό μονοπύρηνων κυττάρων στα πυλαία διαστήματα, σε όλες τις ομάδες των ασθενών. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είτε της ηπατικής αρτηρίας είτε της πυλαίας φλέβας ήταν θετικά [Εικόνα 4A]. Τα κύτταρα των κολποειδών ήταν επίσης θετικά. Τα περιπυλαία ηπατοκύτταρα έδειξαν μία παραλλαγή στην έκφραση του TGF b1 και εμφανίζονταν είτε με ένα διάχυτο κυτταροπλασματικό μοτίβο είτε με ένα περισσότερο σφαιρικό κοκκιώμορφο μοτίβο.

##### **TGFb2**

Παρουσιάστηκε μία παρόμοια εικόνα. [Εικόνα 4B]. Η κοκκιώμορφη εναπόθεση του TGFb2 ήταν εμφανής σε πολλά ηπατοκύτταρα. Μόνο μερικά χολαγγειόλια ήταν αρνητικά στους ασθενείς με ΠΧΚ.

##### **TGFb3**

Αν και το μοτίβο ήταν παρόμοιο σε όλα τα νοσήματα ελέγχου [Εικόνα 4C,D,E], τα ηπατοκύτταρα των ασθενών με ΠΧΚ έδειξαν μία ισχυρότερη χρώση σε σύγκριση είτε με την χρόνια HCV ηπατίτιδα είτε με την HCV κίρρωση [Εικόνα 5B]. Επιπλέον, στον ανοσοφθορισμό, θετικά λεμφοκύτταρα που διηθούν τα πυλαία χοληφόρα εμφάνισαν πιο ασθενή περιμεμβρανική κυκλική χρώση σε σύγκριση με άλλα θετικά πυλαία λεμφοκύτταρα [Εικόνα 5A].

#### **4.2.1.3. Έκφραση των FoxP3 στον ηπατικό ιστό και στα CD3+ve λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος**

Υπήρχε μεγάλη έκφραση του FoxP3 RNA στον ηπατικό ιστό των ασθενών με ΠΧΚ και HCV χρόνια ηπατοπάθεια. [Εικόνα 6]. Αν και η μέθοδος ήταν ημιποσοτική δεν μπόρεσαν να αναγνωρισθούν διαφορές στην έκφραση.

Τα FoxP3 εκφράστηκαν επίσης στα περιφερικά CD+ve λεμφοκύτταρα των ασθενών είτε με ΠΧΚ ή χρόνια HCV. Αντίθετα, FoxP3 RNA δεν εκφράστηκε στα λεμφοκύτταρα των υγιών μαρτύρων.

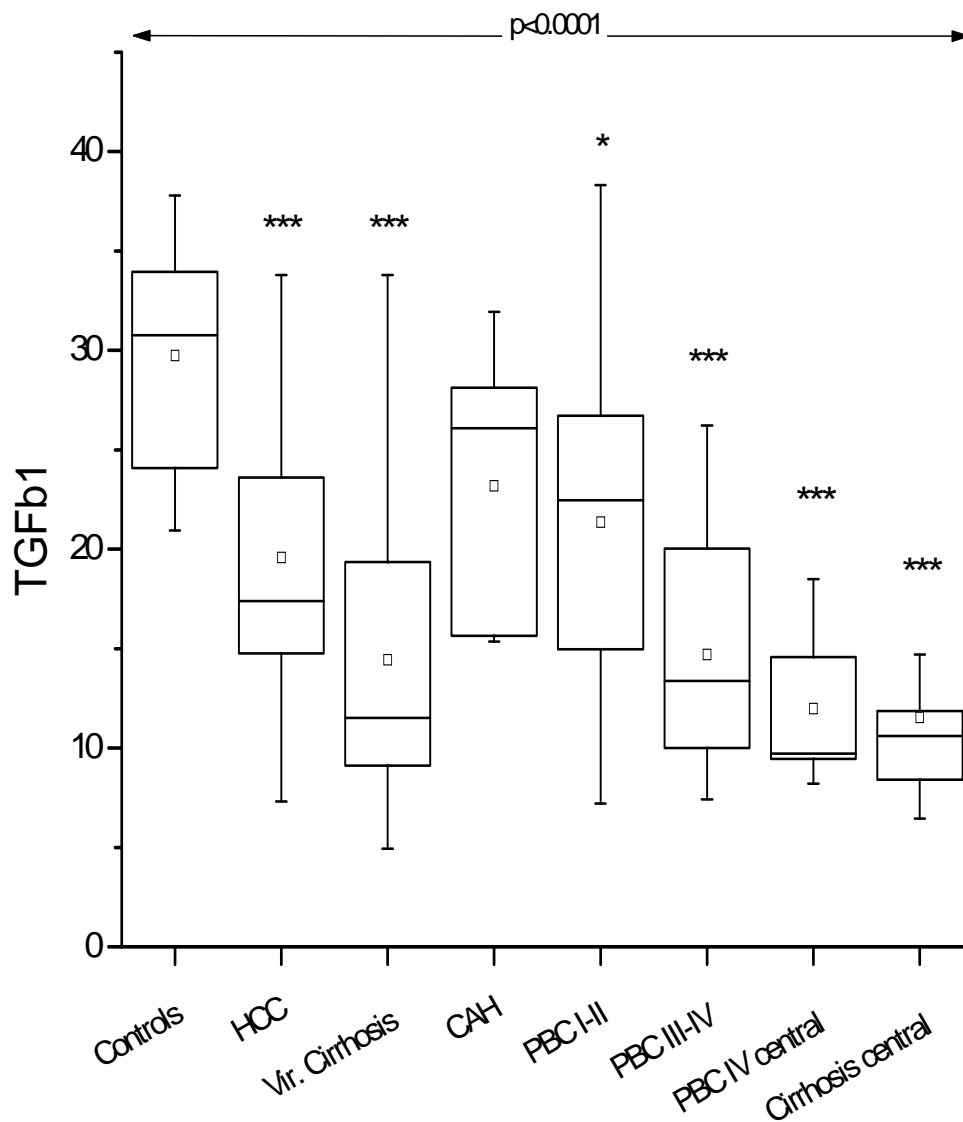
#### **4.2.1.4. Χρήση των ισομορφών ως δεικτών ίνωσης στις χρόνιες ηπατοπάθειες.**

Η δημιουργία καμπυλών ROC επέτρεψε την διακρίβωση των σημείων cut-off σε μία προσπάθεια να χρησιμοποιηθούν οι τρεις ισομορφές ως δείκτες ίνωσης για την διάκριση μεταξύ πρώιμης και προχωρημένης ίνωσης (Πίνακας 1,2).

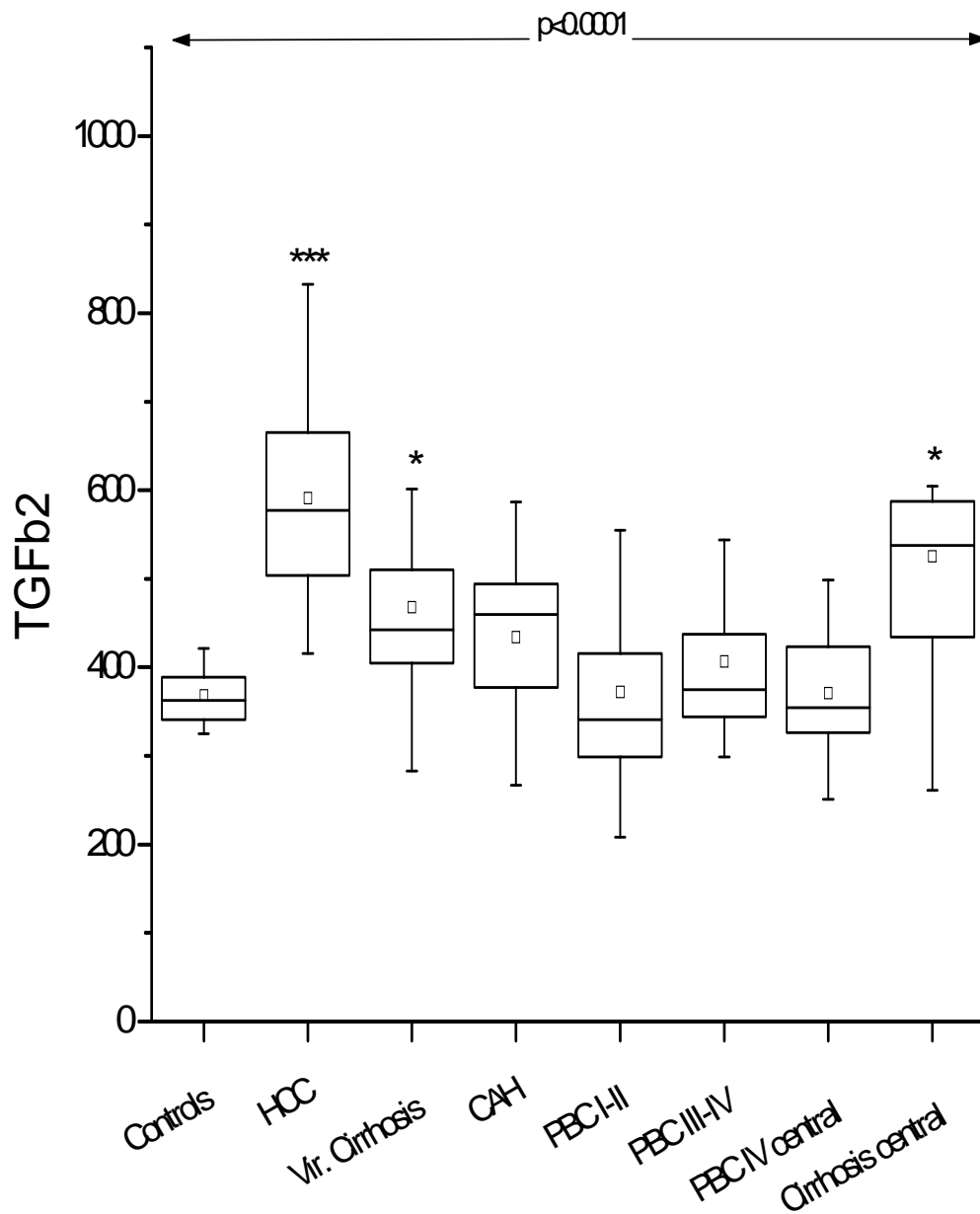
Φαίνεται ότι με όριο τα 26ng/ml ο TGF $\beta$ 1 έχει άριστη ευαισθησία , αλλά χαμηλή ειδικότητα για την διάκριση μεταξύ πρώιμων και ινωτικών σταδίων της ΠΧΚ. Όμως λόγω της υψηλής PPV και NPV είναι αναγκαίο να γίνει προοπτική αξιολόγηση (validation) στην ΠΧΚ.

Στις ιογενείς ηπατοπάθειες τα αποτελέσματα δεν είναι τόσο ικανοποιητικά.

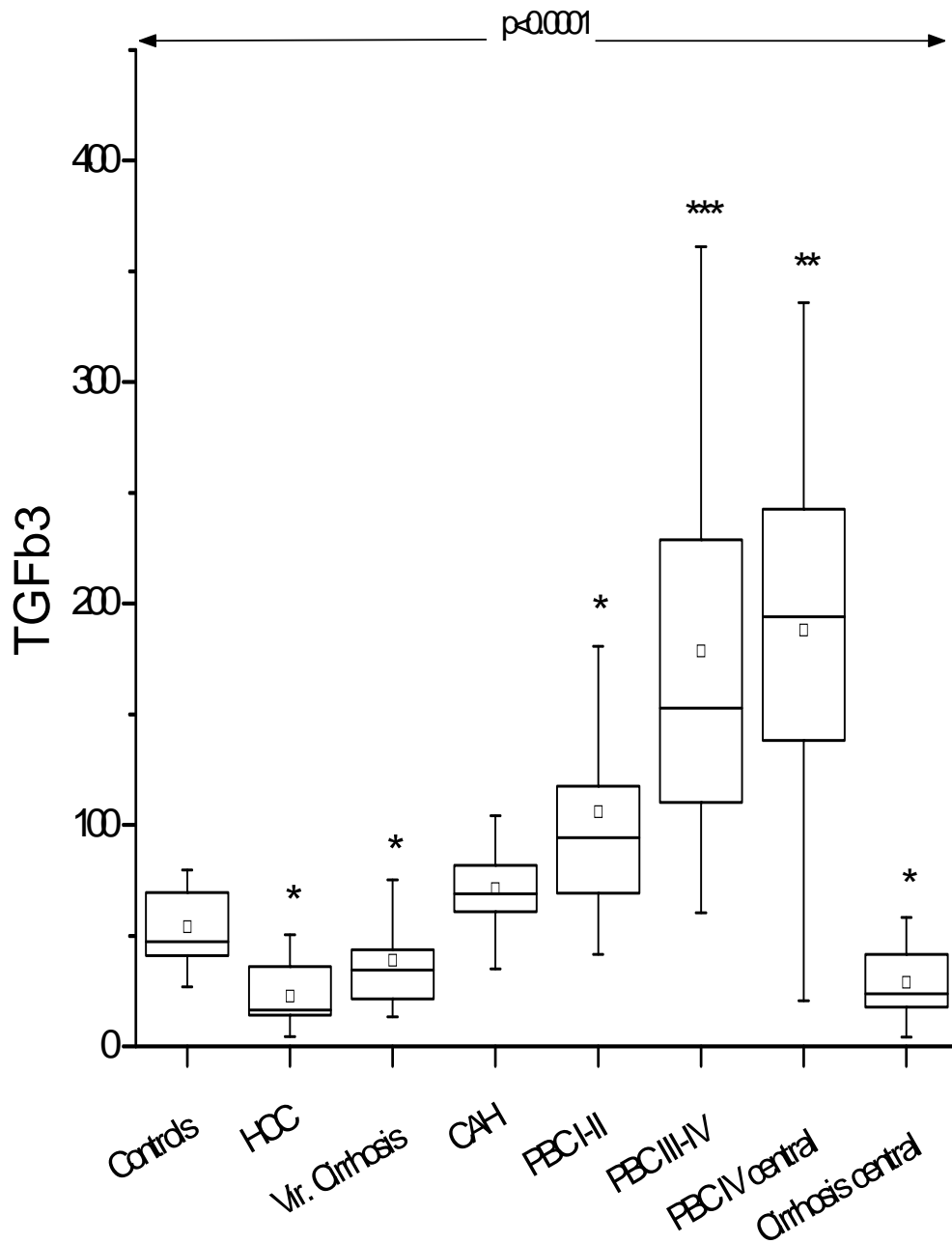




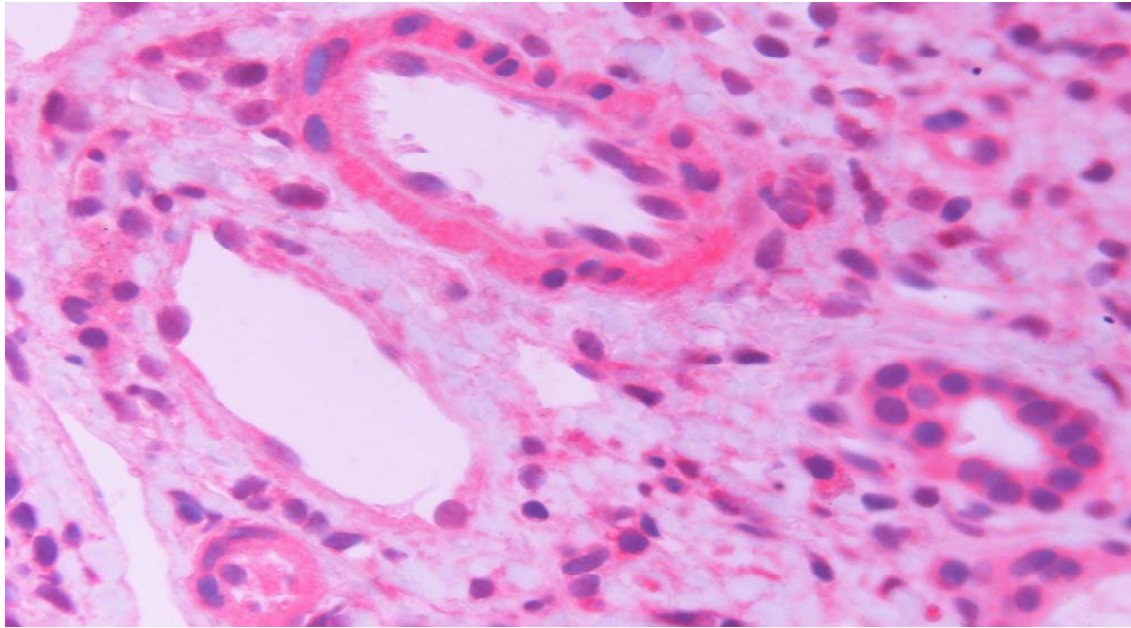
**Εικόνα 1.** Τα θηκογράμματα δείχνουν το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (box), την ενδιάμεση τιμή (οριζόντια γραμμή) και το εύρος (κάθετες γραμμές) των επιπέδων του ορού του TGFb1 στους υγιείς μάρτυρες, στους ασθενείς με ΗΚΚ, στην ιογενή κίρρωση, στην χρόνια ενεργό ηπατίτιδα C (CAH), στην ΠΧΚ στάδιο I-II, στην ΠΧΚ στάδιο III-V, στο αίμα της ηπατικής φλέβας των ασθενών με ΠΧΚ και ιογενή κίρρωση (CENTRAL). \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .



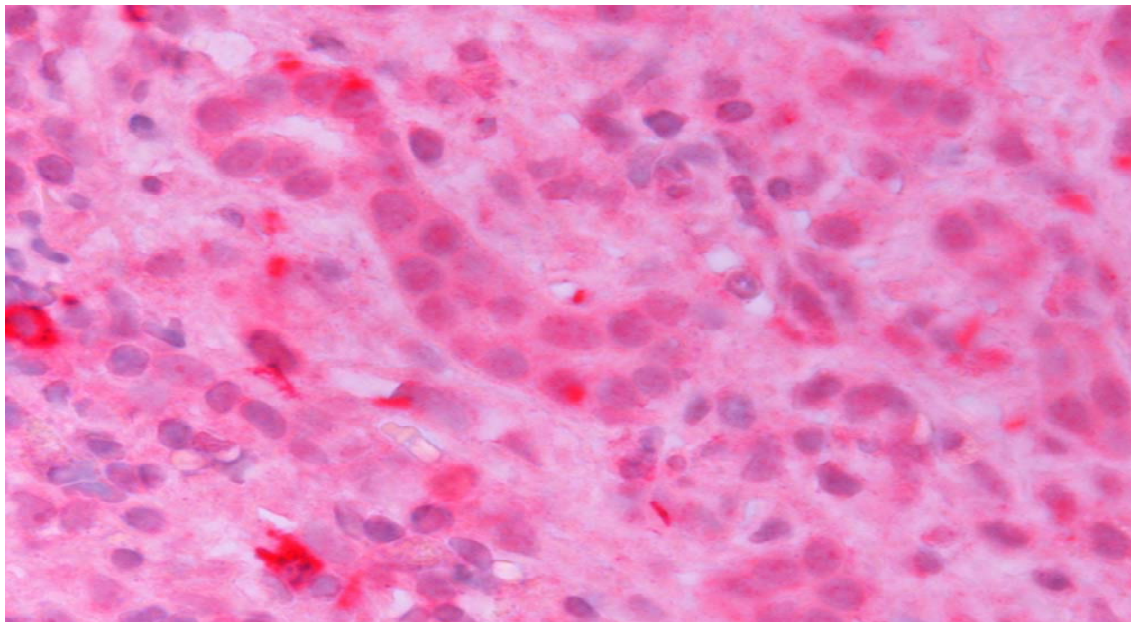
**Εικόνα 2.** Τα θηκογράμματα δείχνουν το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (box), την ενδιάμεση τιμή (οριζόντια γραμμή) και το εύρος (κάθετες γραμμές) των επιπέδων του ορού του TGFb2, της ίδιας ομάδας ασθενών στην περιφερική (P) και στην ηπατική φλέβα (C) \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



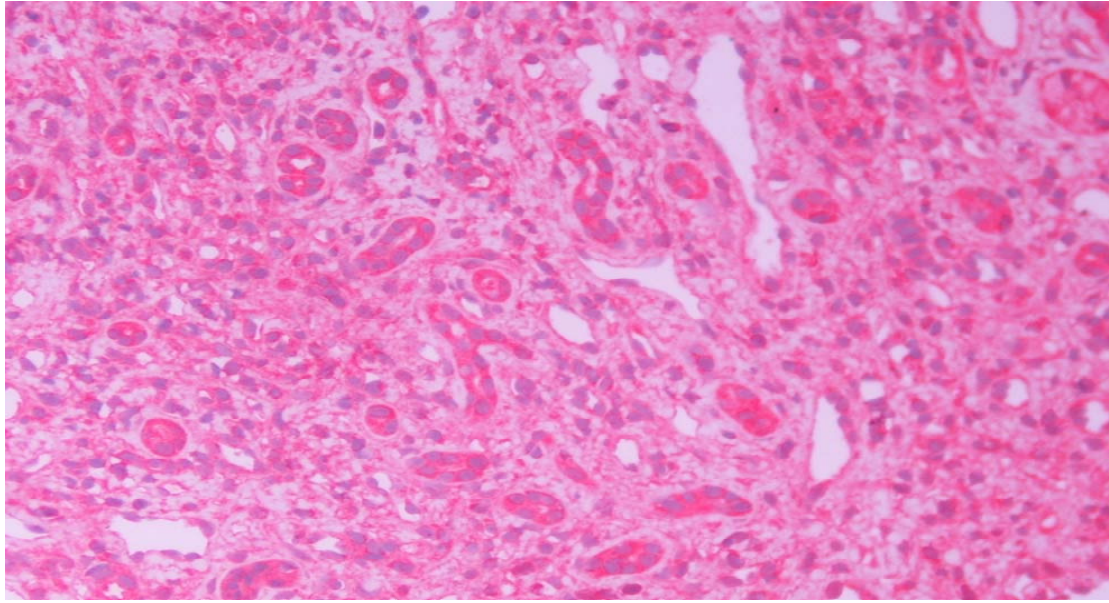
**Εικόνα 3.** Τα θηκογράμματα δείχνουν το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (box), την ενδιάμεση τιμή (οριζόντια γραμμή) και το εύρος (κάθετες γραμμές) των επιπέδων του ορού του TGFb3, της ίδιας ομάδας ασθενών στην περιφερική (P) και στην ηπατική φλέβα (C).\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.



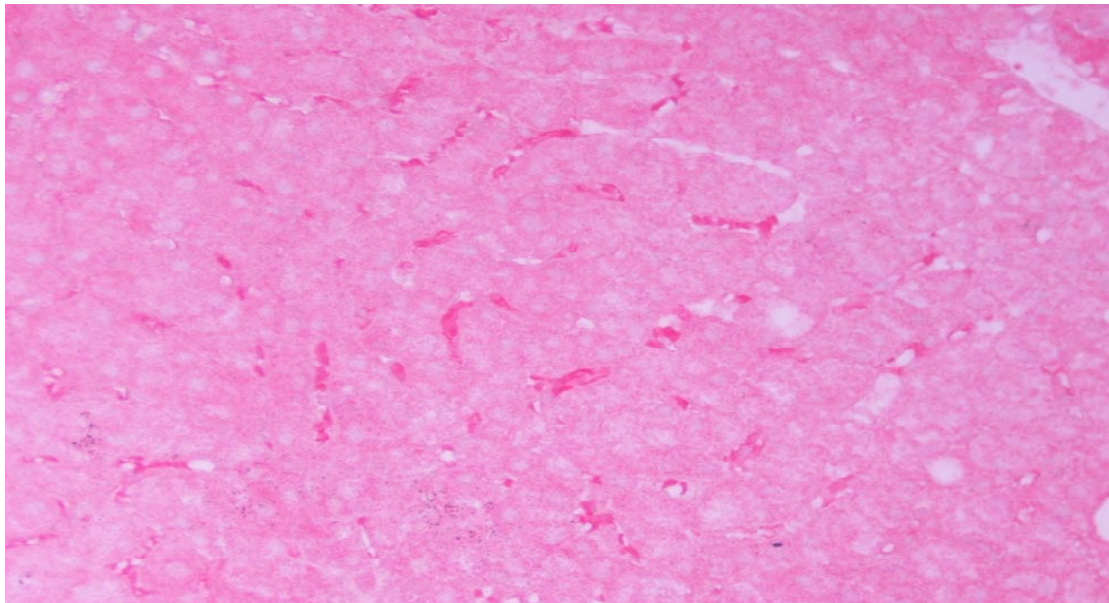
**Εικόνα 4Α.** Ιογενής κίρρωση, TGFb1. Θετικά χολαγγειοκύτταρα , κύτταρα στο τοίχωμα της ηπατικής αρτηρίας και πολλά θετικά λεμφοκύτταρα.



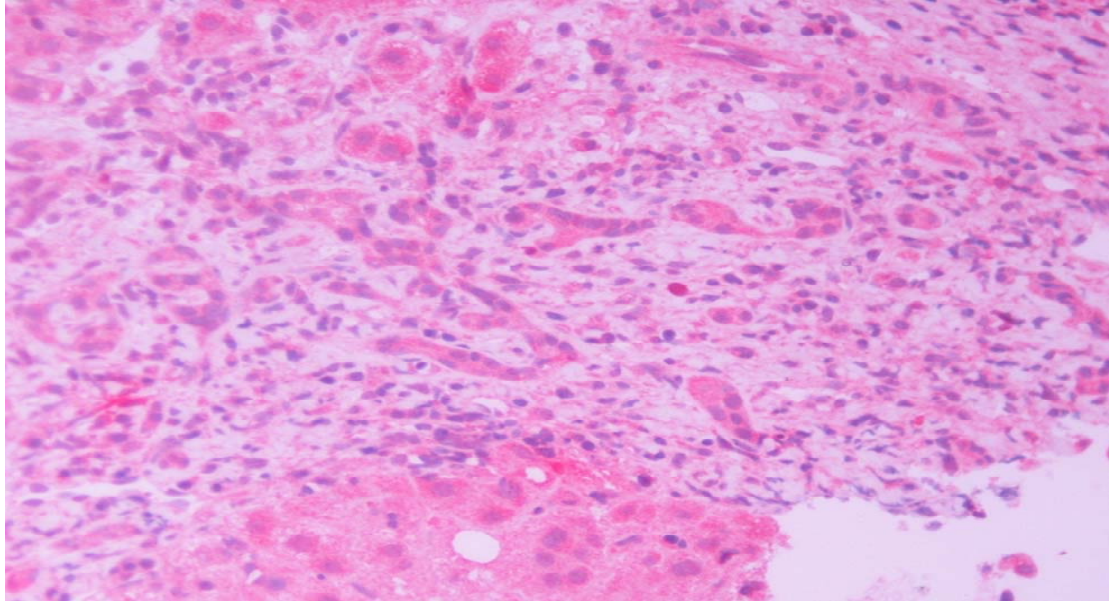
**Εικόνα 4Β.** ΠΧΚ, Στάδιο ΙΙ, TGFb2. Πολλά θετικά χολαγγειόλια και μονοπύρρηνα κύτταρα, πιθανώς λεμφοκύτταρα.



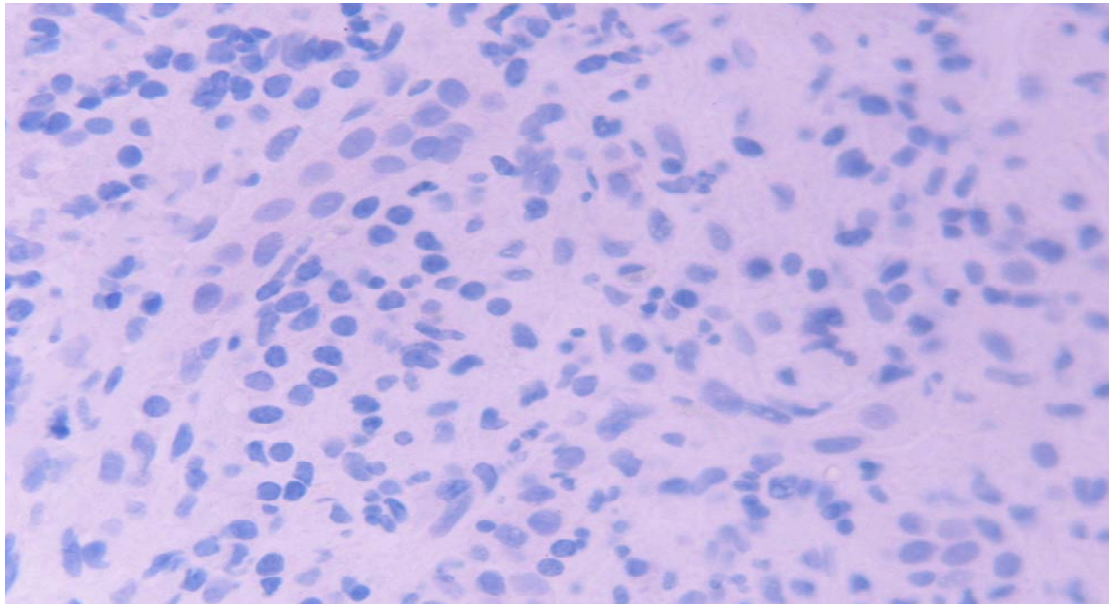
**Εικόνα 4C.** Ιογενής κίρρωση, TGFβ3. Πολλά θετικά υπερπλαστικά χολαγγειόλια καθώς και θετικά λεμφοκύτταρα.



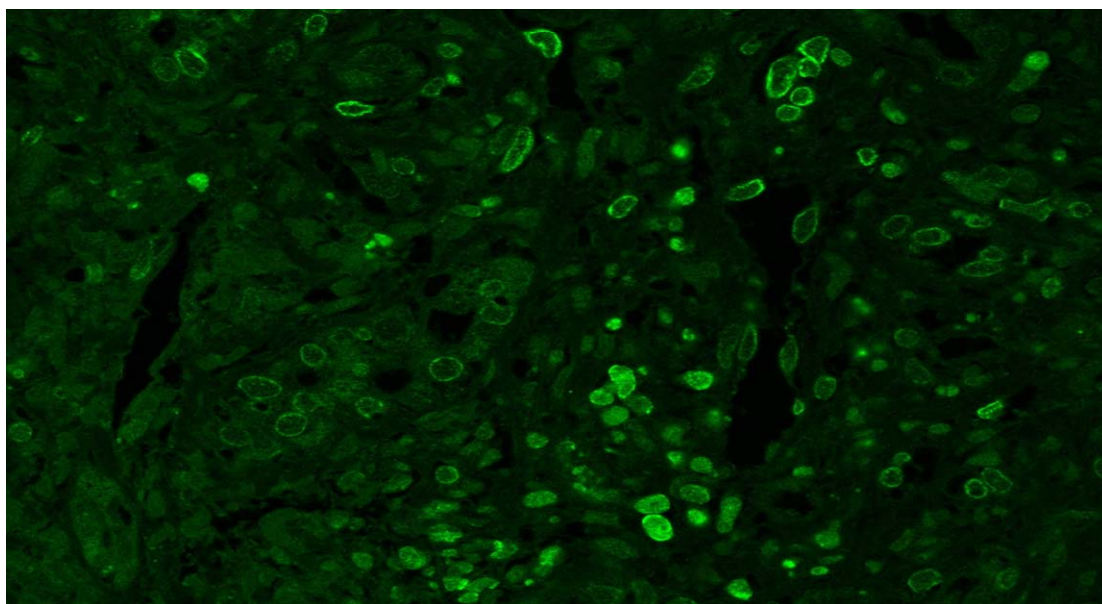
**Εικόνα 4D.** ΠΧΚ Στάδιο I, TGFβ3. Ισχυρή έκφραση στα κολποειδικά κύτταρα.



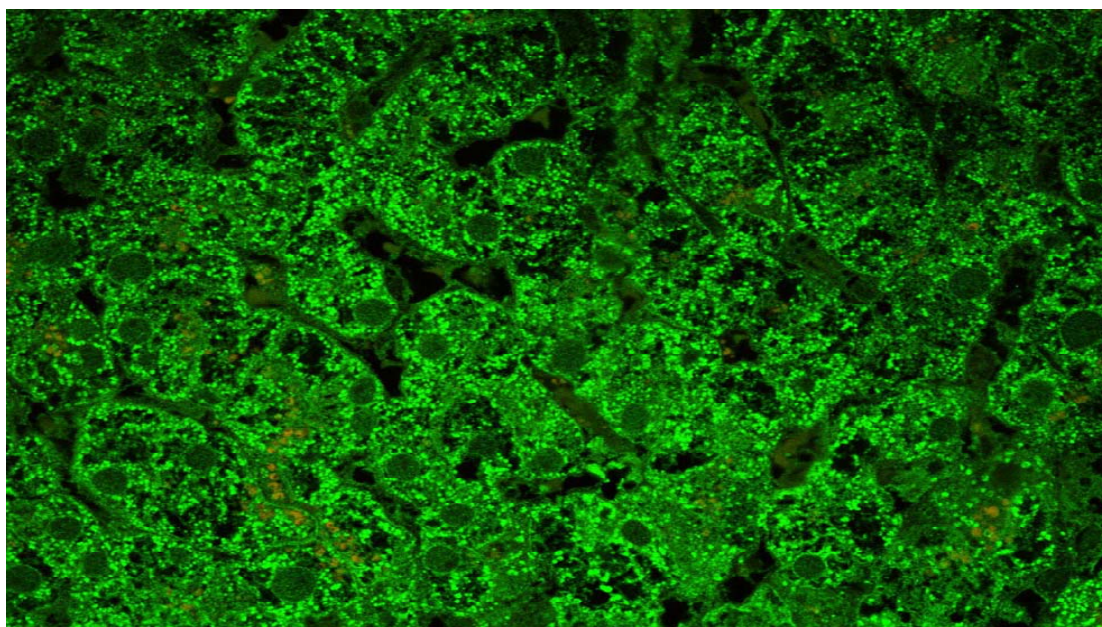
**Εικόνα 4Ε.** ΠΧΚ, Στάδιο IV, TGFβ3. Θετικά ηπατοκύτταρα, χολαγγειόλια και μονοπύρρηνα κύτταρα.



**Εικόνα 4F.** ΠΧΚ, στάδιο IV. Αρνητικός μάρτυρας.

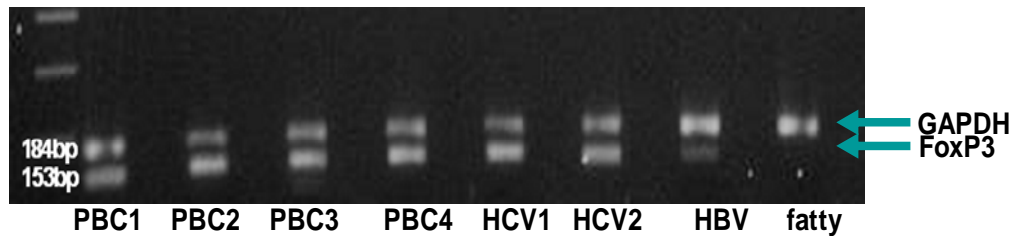


**Εικόνα 5A.** ΠΧΚ, TGFb3. Πολλά θετικά μονοπύρρηνα κύτταρα. Περιμεμβρανική χρώση διαφόρου έντασης είναι εμφανής. Μερικά κύτταρα με χαμηλή περιμεμβρανική χρώση φαίνεται να διηθούν το πυλαίο χοληφόρο.

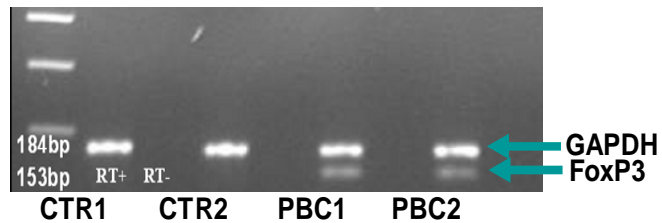


**Εικόνα 5B.** ΠΧΚ, TGFb3. Ηπατοκύτταρα με ισχυρή κοκκιώμορφη χρώση στο στάδιο IV.

## Liver tissue



## CD3+ PBL



**Εικόνα 6.** Τα Fox P3 αναγνωρίζονται στον ηπατικό ιστό τόσο στην πρώιμη όσο και στην προχωρημένη ΠΧΚ. Ισχυρή έκφραση βρέθηκε επίσης στην HCV χρόνια ηπατοπάθεια. Τα περιφερικά CD3+ve λεμφοκύτταρα είναι επίσης θετικά για FoxP3 σε αντίθεση με τους υγιείς μάρτυρες. Στην HCV χρόνια ηπατοπάθεια τα περιφερικά λεμφοκύτταρα επίσης εκφράζουν FoxP3 (δεδομένα δεν εμφανίζονται στην εικόνα).



**Πίνακας 1. ΠΧΚ III-IV vs ΠΧΚ I-II.** Χρήση των 3 ισομορφών του TGFb ως δεικτών για την διάκριση μεταξύ πρώιμης και προχωρημένης ίνωσης στην ΠΧΚ. Με cut off <26ng/ml ο TGFb1 έχει μεγάλη ευαισθησία, θετική προγνωστική αξία και αρνητική προγνωστική αξία αλλά πολύ χαμηλή ειδικότητα.

	<b>TGFb1</b>	<b>TGFb2</b>	<b>TGFb3</b>
<b>Ευαισθησία</b>	100%	40%	100%
<b>Ειδικότητα</b>	30%	65%	0%
<b>PPV</b>	100%	40%	44%
<b>NPV</b>	100%	65%	0%
<b>Cut-off</b>	< 26ng/ml	407 ng/ml	29 ng/ml

**Πίνακας 2. Κίρρωση C vs Χρόνια Ηπατίτιδα C.** Χρήση των 3 ισομορφών του TGFb ως δεικτών για την διάκριση μεταξύ πρώιμης και προχωρημένης ίνωσης στην ηπατίτιδα C. Ο TGFb1 έχει μεγάλη ευαισθησία και θετική προγνωστική αξία αλλά χαμηλή αρνητική προγνωστική αξία και ειδικότητα.

	<b>TGFb1</b>	<b>TGFb2</b>	<b>TGFb3</b>
<b>Ευαισθησία</b>	88%	75%	63%
<b>Ειδικότητα</b>	55%	48%	0%
<b>PPV</b>	88%	64%	15%

## 4.2.2. Συζήτηση

Στην μελέτη μας αναδείξαμε αύξηση του TGFb3 στο περιφερικό αίμα και στο αίμα της ηπατικής φλέβας των ασθενών με ΠΧΚ. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η αύξηση του TGFb3 παρατηρήθηκε ήδη από τα πρώιμα στάδια της ΠΧΚ, υποδηλώνοντας ότι αυτό είναι ένα ειδικό εύρημα της νόσου και όχι μόνον το αποτέλεσμα της πορείας της κίρρωσης.

Ο TGFb1 ήταν μειωμένος σε όλους τους κίρρωτικούς ασθενείς, είτε έπασχαν από HCV κίρρωση είτε από ΠΧΚ και παρόμοια ευρήματα παρατηρήθηκαν και στο αίμα της ηπατικής φλέβας.

Ο TGFb2 ήταν η ισομορφή η οποία ήταν αυξημένη στην ιογενή κίρρωση αλλά όχι και στην ΠΧΚ, κάτι που είχε επίσης αντανάκλαση και στο αίμα της ηπατικής φλέβας.

Επιπλέον, αναγνωρίσαμε τα χολαγγειοκύτταρα ως πηγή των ηπατικών ισομορφών του TGFb, επιπλέον των πυλαίων λεμφοκυττάρων και των κολποειδικών κυττάρων. Τα ηπατοκύτταρα ήταν επίσης θετικά για τις ισομορφές του TGF αλλά υπήρχε ισχυρή έκφραση του TGFb3 στα ηπατοκύτταρα των ασθενών με ΠΧΚ.

Βάσει ισχυρών πειραματικών δεδομένων ο TGFb εμπλέκεται στην παθογένεια της ΠΧΚ, πιθανώς μέσω της απορύθμισης των T ρυθμιστικών κυττάρων.

Διαγονιδιακά ποντίκια με κυρίαρχο-αρνητικό TGFb τύπου II υποδοχέα (dn TGFbRII), αυτομάτως αναπτύσσουν νόσο των χοληφόρων που μοιάζει με την ανθρώπινη ΠΧΚ (1) υποδηλώνοντας ότι αποκλεισμός της TGFb σηματοδότησης των Th κυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα την νόσο των χοληφόρων. Εν τούτοις, στο μοντέλο αυτό δεν υπήρχε υπεροχή του φύλου και αύξηση των IgM, χαρακτηριστικά και τα δύο της ανθρώπινης νόσου.

Στο ίδιο μοντέλο, τα NKT κύτταρα επιδεινώνουν την ηπατική βλάβη (2). Εν τούτοις, ήταν το CD8 και όχι το CD4 κλάσμα των σπληνικών T κυττάρων από αυτά τα ποντίκια που προκαλούσε νόσο των χοληφόρων όταν προσαρμοστικά μεταφερόταν μέσα σε άλλο ποντίκι (3).

Το φυσιολογικό ήπαρ περιέχει μόνο λίγα ήρεμα CD4 FoxP3 T-regs αλλά μπορεί γρήγορα να στρατολογήσει αυτά τα κύτταρα όταν εμφανισθούν CD8 T βλάστες (4).

Η καταστροφή των κυττάρων των χοληφόρων στο ήπαρ, στην ΠΧΚ, γίνεται με την μεσολάβηση των T κυττάρων που διηθούν το ήπαρ, ειδικώς των CD8

κυτταροτοξικών κυττάρων με τα οποία είναι πολύ εμπλουτισμένο το ήπαρ στην ΠΧΚ (5,6). Όμως, στο CD25-ve μοντέλο ποντικού, η έλλειψη των CD8 κυττάρων μειώνει αλλά δεν καταργεί την καταστροφή των χοληφόρων αγγείων, υποδηλώνοντας ότι ένας ακόμη επιπρόσθετος μηχανισμός καταστροφής υπάρχει στην ΠΧΚ. (7).

Όλα τα CD8 λεμφοκύτταρα δεν είναι κυτταροτοξικά. Έχει αποδειχθεί ότι CD8+ CD25+FoxP3+, TGFb ενεργοποιημένα κύτταρα επίσης ασκούν κατασταλτική δράση (8, 9).

Σε πρόσφατη μελέτη, έχει βρεθεί ότι και τα B κύτταρα έχουν ανοσορυθμιστική δράση σε αυτό το μοντέλο, αφού διασταύρωση και αναπαραγωγή των dn TGFbRII ποντικών με ανεπαρκή σε B κύτταρα ποντίκια έχει σαν αποτέλεσμα σοβαρότερες χολαγγειίτιδες σχετιζόμενες με μειωμένη συχνότητα των FoxP3+ve Treg κυττάρων στο ήπαρ (10).

Ο TGFbRII επίσης εμπλέκεται στην ηπατική ίνωση (11).

Σε ένα άλλο πειραματικό μοντέλο, ποντίκια με ανεπάρκεια στον IL-2 υποδοχέα (CD25) εμφανίζουν στο ήπαρ βλάβη παρόμοια με εκείνη της ΠΧΚ (12). Ένα παιδί με πλήρη ανεπάρκεια της α υπομονάδας του IL-2 υποδοχέα στα περιφερικά CD25 λεμφοκύτταρα ανέπτυξε βλάβη παρόμοια με αυτή της ΠΧΚ (13), δείχνοντας ότι τα ζωικά μοντέλα μπορεί να είναι σχετικά με την ανθρώπινη ασθένεια. Ομοίως, πειραματικά δεδομένα που αναφέρουν ότι τα Tregs είναι μειωμένα στο μοντέλο της ΠΧΚ (14) έχουν ελεγχθεί σε ανθρώπινα νοσήματα, όπου έχει βρεθεί μείωση του αριθμού των περιφερικών και των ηπατικών T regs σε ασθενείς με ΠΧΚ και επιπλέον στο περιφερικό αίμα των συγγενών τους (15). Τα αποτελέσματα μας δεν έδειξαν [Εικόνα 6] καμία προφανή διαφορά στην έκφραση των FoxP3 είτε στον ηπατικό ιστό είτε στα T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος των ασθενών με ΠΧΚ σε σύγκριση με την χρόνια ηπατίτιδα C, αλλά πρέπει να τονισθεί ότι η μέθοδος ήταν ημιποσοτική και είναι αναγκαίες πολλές άλλες λεπτομερείς μελέτες με την χρήση real time PCR για να φανεί εάν οι διαφορές που βρήκαμε στο προφίλ του TGFb στην ΠΧΚ μπορούν να επηρεάσουν την παρουσία των Tregs.

Αν και τα FoxP3 φαίνεται να είναι αναγκαία για την ανάπτυξη και την λειτουργία των ανθρώπινων T-reg-κυττάρων, μόνο η έκφραση των FoxP3 είναι ξεκάθαρα μη επαρκής καθώς ένα σημαντικό ποσοστό των ανθρώπινων ενεργοποιημένων T κυττάρων εκφράζει FoxP3 και όμως δεν φαίνεται να έχουν ρυθμιστική δράση(16-20).

Επιπλέον, η επαγωγή των FoxP3 στα ανθρώπινα T κύτταρα από τον TGFβ φαίνεται να μην οδηγεί πάντοτε σε έναν κατασταλτικό φαινότυπο, σε αντίθεση με τα συμβαίνοντα στο ποντίκι. (20). Συνεπώς, τα FoxP3 μπορεί να μην είναι καλός δείκτης για τα ανθρώπινα Treg κύτταρα, οπότε αυτό μπορεί να δικαιολογήσει τα δικά μας αρνητικά αποτελέσματα με την ημιποσοτική PCR (21). Τα πράγματα περιπλέκονται από το γεγονός ότι ένας ουσιαστικός αριθμός των FoxP3 T-regs είναι αρνητικός για το CD25 (9,22). Πιστεύουμε επομένως ότι τα θετικά για TGFb λεμφοκύτταρα όπως αυτά αναγνωρίζονται ιστοχημικά στην δική μας μελέτη είναι είτε CD25-FoxP3 T-regs ή άλλα συμβατικά T κύτταρα ικανά παραγωγής TGFb ισομορφών (23, 24).

Τα επίπεδα του TGFb στο περιφερικό αίμα δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς στην ΠΧΚ και πολύ περισσότερο οι 3 ισομορφές του. Τα κυκλοφορούντα επίπεδα του TGFb (και του TNFα) έχει δημοσιευθεί ότι αντανακλούν την σοβαρότητα της ΠΧΚ και μειώνονται μετά από θεραπεία με UDCA για 2 έτη. (25).

Μολονότι, οι τρεις ισομορφές του TGFb θεωρήθηκε ότι έχουν παρόμοιες λειτουργίες, υπάρχουν δεδομένα ότι αυτό μπορεί να μην ισχύει. Η έλλειψη του TGFb1 είναι συμβατή με την μεταγεννητική επιβίωση, αλλά το ήπαρ και οι άλλοι ιστοί είναι διηθημένοι με μονοπύρηνια κύτταρα, ενώ η έλλειψη των TGFb2 και TGFb3 οδηγεί σε περιγεννητικό θάνατο (26, 27). Λαμβάνοντας υπόψη τα ευρήματά μας, η τοπική μείωση του TGFb1 θα μπορούσε να είναι ένας από τους λόγους για την πυλαία διήθηση των μονοκυττάρων που παρατηρείται πολύ πρώιμα στην ΠΧΚ.

Τα ηπατοκύτταρα και τα κύτταρα του Kupffer έχει δημοσιευτεί ότι αποτελούν τις κύριες πηγές του TGFb (28). Εν τούτοις, η προέλευση των ισομορφών του TGFb δεν είναι καλά θεμελιωμένη. Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι τα κύτταρα του Kupffer σε φυσιολογική κατάσταση εκφράζουν και τις τρεις ισομορφές (29). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν κυρίως TGFb1 και σε χαμηλότερα επίπεδα TGFb2 και TGFb3 ενώ τα αστεροειδή κύτταρα εκφράζουν πολύ λίγο TGFb και τα ηπατοκύτταρα δεν έχουν βασική (constitutional) έκφραση (30). Μετά από μία ινωτική βλάβη όλες οι ισομορφές του TGFb αυξάνονται στα αστεροειδή κύτταρα πιθανώς μέσω της διέγερσης από το ρετινοϊκό οξύ που παράγεται από την υδρόλυση των ρετινοϊκών εστέρων κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης των αστεροειδών κυττάρων (31). Τα επαγόμενα T-regs εκκρίνουν TGFb (32). Ως εκ τούτου η ανάλυση των περιφερικών επιπέδων είναι δύσκολη εξ' αιτίας των δυνητικά πολλών πηγών του TGFb από τις οποίες μπορεί να φθάνει στην κυκλοφορία. Ειδικότερα οι κυτταρικές πηγές

του TGFb που είναι αναγκαίες για την διατήρηση των T-reg κυττάρων στην ΠΧΚ ή σε άλλα ηπατικά νοσήματα δεν είναι σαφείς. Φαίνεται ότι η παραγωγή του TGF από τα nT-κύτταρα είναι κρίσιμη (33), αλλά ο TGFb προερχόμενος από άλλες πηγές, όπως είναι τα δενδριτικά κύτταρα μπορεί επίσης να είναι σημαντικός (34,35).

Τα δικά μας ιστοχημικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα λεμφοκύτταρα των πυλαίων διαστημάτων αποτελούν πηγές των ισομορφών του TGFb στην ΠΧΚ και στην χρόνια HCV όπως συμβαίνει και με τα κολποειδικά κύτταρα. Όπως έχει αναφερθεί ήδη τα λεμφοκύτταρα είναι πιθανώς T-ρυθμιστικά κύτταρα αν και απαιτούνται λεπτομερείς μελέτες. Αλλά στην μελέτη μας αναγνωρίσαμε μία νέα πηγή ισομορφών του TGFb καθώς τα ενδοηπατικά χοληφόρα αγγεία ήταν ισχυρώς θετικά για τον TGFb. Στην HCV κίρρωση η υπερπλασία των χολαγγειολίων είναι συχνό εύρημα [Εικόνα 4C]. Αντίθετα στην ΠΧΚ η καταστροφή των μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων ξεκινά στα πρώιμα στάδια και γίνεται προεξέχουσα στο στάδιο της κίρρωσης. Είναι επομένως κατανοητό ότι η αύξηση του TGFb3 η οποία παρατηρείται στην ΠΧΚ, εάν προέρχεται από τα χολαγγειοκύτταρα πρέπει να είναι αποτέλεσμα αυξημένης παραγωγής από τα κύτταρα αυτά. Παρομοίως, η αύξηση του TGFb2 που βρέθηκε στην ιογενή κίρρωση ίσως επίσης να προέρχεται από τα χολαγγειοκύτταρα.

Υπάρχει και εναλλακτική εξήγηση. Η κάθαρση του TGFb είναι σύνθετη. Μπορεί να δεσμευθεί από την  $\alpha 2$  μακροσφαιρίνη (36), μπορεί να υποστεί νεφρική κάθαρση ή μπορεί να τον προσλαμβάνουν τα ηπατοκύτταρα (37). Αυτό μπορεί ενδεχομένως να εξηγήσει τα θετικά σφαιρίδια τα οποία παρατηρήθηκαν εντός των ηπατοκυττάρων στην μελέτη μας τουλάχιστον για τους TGFb1 και TGFb2. Εν τούτοις τα ηπατοκύτταρα των ασθενών με ΠΧΚ ιδιαίτερος σταδίου IV ήταν ισχυρά θετικά για τον TGFb3 σε σύγκριση με τις άλλες δύο ισομορφές [Εικόνα 5B] εύρημα το οποίο είναι απίθανο να οφείλεται στην αυξημένη πρόσληψη. Το αυξημένο περιεχόμενο TGFb3 των ηπατοκυττάρων των ασθενών με ΠΧΚ μπορεί επομένως να υποδηλώνει μία επιπρόσθετη πηγή για τα αυξημένα επίπεδα του TGFb3 στους ασθενείς με ΠΧΚ.

Μία επιβεβαίωση της προσέγγισης που επεχειρήθη παραπάνω ως προς την προέλευση των αυξημένων επιπέδων του TGFb3 στην ΠΧΚ προέρχεται από τα επίπεδα που μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη στην ηπατική φλέβα των ασθενών με ΠΧΚ.

Τα επίπεδα των TGFb3 και TGFb2 στην ηπατική φλέβα ακολουθούν το ίδιο μοτίβο με το περιφερικό αίμα αποτελώντας την επιβεβαίωση ότι το ήπαρ είναι η κυρία πηγή των ισομορφών TGFb, όσο και των διαφορών που βρέθηκαν στην μελέτη μας.

Ένα επί πλέον σημείο που αφορά στην λειτουργικότητα των ισομορφών χρειάζεται περαιτέρω σχολιασμό. Στην μελέτη μας οι συγκεντρώσεις του ορρού των ισομορφών του TGFb δείχνουν ότι οι TGFb2 και TGFb3 κυκλοφορούν σε ποσότητες pg σε σύγκριση με τα ngs του TGFb1. Εν τούτοις, σε καλλιέργειες ινοβλαστών, ο TGFb3 αποδείχθηκε 3-5 φορές πιο ισχυρός απ' ότι ο TGFb1 (38). Πειραματικώς, ο TGFb3 είναι επίσης σημαντικά πιο ισχυρός από ότι οι άλλες δύο ισομορφές στην διέγερση της νεοαγγείωσης (27).

Επιπλέον, η *in vitro* ανασταλτική δράση του TGFb3 πάνω σε μία σειρά επιθηλιακών κυττάρων κυμαινόταν μεταξύ των 10-50pg/ml (39) ενώ η μετατροπή και ο πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών του αρουραίου επιτυγχάνεται σε συγκέντρωση 100pg/ml. Επομένως τα επίπεδα που εμείς βρήκαμε είναι βιολογικώς σχετικά.

Βάσει προηγούμενων δημοσιεύσεων και των αποτελεσμάτων της δικής μας μελέτης, προτείνουμε ένα υποθετικό μοντέλο για την παθογένεια της ΠΧΚ βασισμένο σε ένα διπλό μηχανισμό καταστροφής των χοληφόρων αγγείων.

Τα ευρήματά μας μπορεί να αποτελούν την σύνδεση για την εξήγηση των δημοσιευμένων αποσπασματικών ανοσολογικών ανωμαλιών στην ΠΧΚ.

Η καταστροφή των ενδοηπατικών χοληφόρων αγγείων είναι αποτέλεσμα της εμφάνισης των CD8 κυτταροτοξικών αυτοαντιδρώντων T κυττάρων ακολουθούμενων από την στρατολόγηση των T-regs κυττάρων. Εν τούτοις, διαφορές στις ισομορφές του TGFb μπορούν να οδηγήσουν σε μία διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ των T-regs and Th17 κυττάρων. Ο TGFb1 είναι αυτός που ρυθμίζει την έκφραση των FoxP3 και την κατασταλτική δράση των CD4 κυττάρων (40). Η αύξηση των επιπέδων του TGFb3 τοπικά (και η συνακόλουθη σχετική έλλειψη του TGFb1) από κοινού με τα αυξημένα επίπεδα της IL-6 μπορεί να μετατοπίσει την ισορροπία σε μία αυξημένη δράση των προ-φλεγμονοδών Th17 κυττάρων προσθέτοντας έναν επιπλέον καταστρεπτικό μηχανισμό ενώ αυτό ταυτόχρονα οδηγεί σε λειτουργικώς ελαττωματικά T-regs.

Αν και τα επίπεδα του ορρού της IL6 είναι μειωμένα στην ΠΧΚ (41) τα μονοκύτταρα των ασθενών με ΠΧΚ εκκρίνουν περισσότερο IL1 και IL6 μετά από *in vitro* πρόκληση με δεσμευτές των Toll-like υποδοχέων (42), ενώ αυξημένη έκφραση της IL-6 έχει περιγραφεί στο ήπαρ ασθενών με ΠΧΚ (43-

45). Ενδιαφέρουσα είναι η δημοσίευση ότι το ρετινοϊκό οξύ παραγόμενο από την υδρόλυση των εστέρων της ρετινόλης κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης των αστεροειδών κυττάρων μέσω της άμεσης επιρροής του TGF $\beta$  αναστέλλει την έκφραση της IL6Ra, (31) η οποία στην συνέχεια θα σταματήσει τον σχηματισμό των Th17 κυττάρων.

Η αύξηση του TGF $\beta$ 3 εις αντικατάσταση του TGF $\beta$ 1 θα μπορούσε να είναι ένας επιπλέον μηχανισμός ο οποίος ευνοεί την δράση των Th17 δεδομένου ότι κάποιος μπορεί να υποθέσει ότι ο TGF $\beta$ 3 μπορεί είτε να συνδέεται με την δυσλειτουργία των T-regs είτε ότι άμεσα ευνοεί την αύξηση και την διατήρηση των Th17, πιθανώς μέσω της αναστολής της IL6Ra. Επιπλέον δεδομένα που ενισχύουν μία τέτοια υπόθεση, έρχονται από μία πρόσφατη δημοσίευση που αναφέρει ότι τα ποντίκια με μεταλλαγή στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα των FoxP3, θετικοποίησαν τα AMA και εμφάνισαν χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα της ΠΧΚ στον άνθρωπο, με αυξημένα επίπεδα των IL-17 and IL-23, δηλαδή κυτταροκινών που συνδέονται με τα Th17 κύτταρα. (46). Υπάρχουν επίσης πρόσφατα δεδομένα ότι τα Th17 κύτταρα εμπλέκονται στην παθογένεια της ΠΧΚ αφού αυτά εμφανίζονται αυξημένα στα πυλαία διαστήματα των ασθενών με ΠΧΚ (47).

Αφού βρήκαμε ότι τα χολαγγειοκύτταρα είναι πιθανόν μία κύρια πηγή παραγωγής των ισομορφών του TGF $\beta$  στο ήπαρ, κάποιος μπορεί περαιτέρω να υποθέσει ότι αυτά τα κύτταρα μπορεί να είναι η αρχή της παρεκκλίνουσας παραγωγής των ισομορφών του TGB στην ΠΧΚ. Αυτό χρειάζεται περαιτέρω διευκρίνιση.

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα προσφέρουν επιπλέον υποστήριξη στην υπόθεση για έναν κρίσιμο ρόλο του TGF $\beta$ 3 στην παθογένεια της ΠΧΚ. Έχει δημοσιευτεί ότι ο TGF $\beta$ 3 μειώνει την σύνθεση του κολλαγόνου και την έκφραση του TIMP1 και αυξάνει την MMP9 (αλλά όχι την MMP2) στην CC14 επαγόμενη ηπατική ίνωση (48). Τα ευρήματα αυτά μπορούν να προσφέρουν μία πιθανή εξήγηση για την καθυστερημένη ανάπτυξη της ίνωσης και της κίρρωσης στην ΠΧΚ σε σύγκριση με τα άλλα χρόνια ηπατικά νοσήματα.

Τέλος, εξετάζοντας τα ευρήματα μας στον ΗΚΚ, διαπιστώσαμε αυξημένα επίπεδα και των τριών ισομορφών. Αυτό είναι σε συμφωνία με προηγούμενες δημοσιεύσεις της αυξημένης έκφρασης του TGF $\beta$  στον ανθρώπινο ΗΚΚ (49,50). Οι συγγραφείς υπαινίσσονται μία αυξημένη αντίσταση στην ανασταλτική αυξητική δράση του TGF $\beta$  στον ΗΚΚ. Αυτό μπορεί να συμβαίνει εξ' αιτίας των

αναφερόμενων μεταλλαγών του τύπου II TGFb υποδοχέα στον ΗΚΚ (51,52), ένα εύρημα που όμως έχει αμφισβητηθεί από άλλους (53,54).

Στην μελέτη μας επίσης βρήκαμε σημαντικά αυξημένα επίπεδα του TGFb2 στην ΗCV κίρρωση με υψηλότερες τιμές στις περιπτώσεις με ΗΚΚ. Ενδιαφέρον είναι, ότι ο αριθμός των T ρυθμιστικών κυττάρων είναι αυξημένος και σχετίζεται με την πρόοδο της νόσου καθώς και με την επιβίωση των ασθενών με ΗΚΚ (55-57). Εάν αυτές οι ανωμαλίες είναι αιτιολογικά συνδεδεμένες με την παρεκκλίνουσα παραγωγή του TGFb2 πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω. Το ίδιο μπορεί να ισχύει στην χρόνια ΗCV όπου έχουν δημοσιευτεί αυξημένα ΗCV ειδικά T-κατασταλτικά κύτταρα (58-60). Συμπερασματικά, έχουμε δείξει ότι το προφίλ των τριών ισομορφών του TGFβ στον ορρό είναι διαφορετικό στις ομάδες των ασθενών που μελετήσαμε. Η άνοδος του TGFβ3 είναι ένα χαρακτηριστικό της ΠΧΚ ανεξάρτητα του σταδίου και ως εκ τούτου μπορεί να είναι παθογενετικά σημαντική. Τα αποτελέσματα από τα δείγματα της ηπατικής φλέβας δείχνουν ότι το ήπαρ φαίνεται να είναι η πηγή των ανωμαλιών του TGFb. Επίσης θεωρούμε ότι αυτά τα ευρήματα μπορεί να είναι ο αιτιολογικός σύνδεσμος που οδηγεί στην απορύθμιση των T-reg και/ή των Th17 κυττάρων που έχουν αναφερθεί στην ΠΧΚ.



### 4.2.3. Βιβλιογραφία

1. Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* (Baltimore, Md 2000 May;31(5):1094-1106.
2. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002 Apr 1;7:d793-807.
3. Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA. The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *Journal of hepatology* 1999 Jan;30(1):77-87.
4. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* (New York, NY 2003 Feb 14;299(5609):1057-1061.
5. Hsu W, Zhang W, Tsuneyama K, Moritoki Y, Ridgway WM, Ansari AA, et al. Differential mechanisms in the pathogenesis of autoimmune cholangitis versus inflammatory bowel disease in interleukin-2Ralpha(-/-) mice. *Hepatology* (Baltimore, Md 2009 Jan;49(1):133-140.
6. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, et al. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nature genetics* 1995 Dec;11(4):415-421.
7. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *The New England journal of medicine* 2005 Sep 22;353(12):1261-1273.
8. Cox DA. Transforming growth factor-beta 3. *Cell biology international* 1995 May;19(5):357-371.

9. Kapp JA, Bucy RP. CD8+ suppressor T cells resurrected. *Human immunology* 2008 Nov;69(11):715-720.
10. Kawate S, Takenoshita S, Ohwada S, Mogi A, Fukusato T, Makita F, et al. Mutation analysis of transforming growth factor beta type II receptor, Smad2, and Smad4 in hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology* 1999 Jan;14(1):127-131.
11. Kita H, Lian ZX, Van de Water J, He XS, Matsumura S, Kaplan M, et al. Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 2002 Jan 7;195(1):113-123.
12. Kita H, Matsumura S, He XS, Ansari AA, Lian ZX, Van de Water J, et al. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *The Journal of clinical investigation* 2002 May;109(9):1231-1240.
13. Koumaki V, Papadaki HA, Stefanaki K, Damianaki A, Gemetzi C, Katonis P, et al. Increased cell apoptosis in bone marrow trephine biopsies and immunomagnetically isolated myeloid progenitor cells in patients with chronic idiopathic neutropenia. *Annals of hematology* 2003 Oct;82(10):641-645.
14. Lan RY, Cheng C, Lian ZX, Tsuneyama K, Yang GX, Moritoki Y, et al. Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2006 Apr;43(4):729-737.
15. Lan RY, Salunga TL, Tsuneyama K, Lian ZX, Yang GX, Hsu W, et al. Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *Journal of autoimmunity* 2009 Feb;32(1):43-51.
16. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 2008 Aug 8;134(3):392-404.

17. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 2007 May;26(5):579-591.
18. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology* 2006;24:99-146.
19. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006 May 11;441(7090):231-234.
20. Mao TK, Lian ZX, Selmi C, Ichiki Y, Ashwood P, Ansari AA, et al. Altered monocyte responses to defined TLR ligands in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2005 Oct;42(4):802-808.
21. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 2005 Apr 4;201(7):1061-1067.
22. Matsuzaki K, Date M, Furukawa F, Tahashi Y, Matsushita M, Sakitani K, et al. Autocrine stimulatory mechanism by transforming growth factor beta in human hepatocellular carcinoma. *Cancer research* 2000 Mar 1;60(5):1394-1402.
23. Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *International immunology* 2009 May;21(5):489-498.
24. Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Human immunology* 2005 Jan;66(1):13-20.

25. Moritoki Y, Zhang W, Tsuneyama K, Yoshida K, Wakabayashi K, Yang GX, et al. B cells suppress the inflammatory response in a mouse model of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2009 Mar;136(3):1037-1047.
26. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science (New York, NY)* 2007 Jul 13;317(5835):256-260.
27. Nagano T, Yamamoto K, Matsumoto S, Okamoto R, Tagashira M, Ibuki N, et al. Cytokine profile in the liver of primary biliary cirrhosis. *Journal of clinical immunology* 1999 Nov;19(6):422-427.
28. Neubauer K, Kruger M, Quondamatteo F, Knittel T, Saile B, Ramadori G. Transforming growth factor-beta1 stimulates the synthesis of basement membrane proteins laminin, collagen type IV and entactin in rat liver sinusoidal endothelial cells. *Journal of hepatology* 1999 Oct;31(4):692-702.
29. Neuman M, Angulo P, Malkiewicz I, Jorgensen R, Shear N, Dickson ER, et al. Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta reflect severity of liver damage in primary biliary cirrhosis. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2002 Feb;17(2):196-202.
30. Oertelt S, Lian ZX, Cheng CM, Chuang YH, Padgett KA, He XS, et al. Anti-mitochondrial antibodies and primary biliary cirrhosis in TGF-beta receptor II dominant-negative mice. *J Immunol* 2006 Aug 1;177(3):1655-1660.
31. Okuno M, Moriwaki H, Imai S, Muto Y, Kawada N, Suzuki Y, et al. Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF-beta in liver stellate cells. *Hepatology (Baltimore, Md)* 1997 Oct;26(4):913-921.
32. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer research* 2005 Mar 15;65(6):2457-2464.

33. Chuang YH, Lian ZX, Tsuneyama K, Chiang BL, Ansari AA, Coppel RL, et al. Increased killing activity and decreased cytokine production in NK cells in patients with primary biliary cirrhosis. *Journal of autoimmunity* 2006 Jun;26(4):232-240.
34. Pyzik M, Piccirillo CA. TGF-beta1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+ T cell subsets. *Journal of leukocyte biology* 2007 Aug;82(2):335-346.
35. Coffey RJ, Jr., Kost LJ, Lyons RM, Moses HL, LaRusso NF. Hepatic processing of transforming growth factor beta in the rat. Uptake, metabolism, and biliary excretion. *The Journal of clinical investigation* 1987 Sep;80(3):750-757.
36. 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. *Journal of hepatology* 1998 Dec;29(6):915-922.
37. Salas JT, Banales JM, Sarvide S, Recalde S, Ferrer A, Uriarte I, et al. Ae2a,b-deficient mice develop antimitochondrial antibodies and other features resembling primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2008 May;134(5):1482-1493.
38. Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, et al. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995 Mar 28;92(7):2572-2576.
39. Schuftan GG, Bachem MG. Alpha2-macroglobulin reduces paracrine- and autocrine-stimulated matrix synthesis of cultured rat hepatic stellate cells. *European journal of clinical investigation* 1999 Jun;29(6):519-528.
40. Shindo M, Mullin GE, Braun-Elwert L, Bergasa NV, Jones EA, James SP. Cytokine mRNA expression in the liver of patients with primary biliary

cirrhosis (PBC) and chronic hepatitis B (CHB). *Clinical and experimental immunology* 1996 Aug;105(2):254-259.

41. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2003 Dec;38(6):1437-1448.

42. ten Dijke P, Iwata KK, Goddard C, Pieler C, Canalis E, McCarthy TL, et al. Recombinant transforming growth factor type beta 3: biological activities and receptor-binding properties in isolated bone cells. *Molecular and cellular biology* 1990 Sep;10(9):4473-4479.

43. ten Dijke P, Iwata KK, Thorikay M, Schwedes J, Stewart A, Pieler C. Molecular characterization of transforming growth factor type beta 3. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1990;593:26-42.

44. Tiegs G, Lohse AW. Immune tolerance: What is unique about the liver. *Journal of autoimmunity* Feb;34(1):1-6.

45. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 2007 Oct 15;110(8):2983-2990.

46. Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A, Davies S, Gibbs P, Morris LS, et al. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2005 Apr;41(4):722-730.

47. Valatas V, Kolios G, Manousou P, Notas G, Xidakis C, Diamantis I, et al. Octreotide regulates CC but not CXC LPS-induced chemokine secretion in rat Kupffer cells. *British journal of pharmacology* 2004 Feb;141(3):477-487.

48. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006 Feb;24(2):179-189.

49. Veldhoen M, Hocking RJ, Flavell RA, Stockinger B. Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nature immunology* 2006 Nov;7(11):1151-1156.
50. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nature reviews* 2008 Jul;8(7):523-532.
51. Vincent F, Hagiwara K, Ke Y, Stoner GD, Demetrick DJ, Bennett WP. Mutation analysis of the transforming growth factor beta type II receptor in sporadic human cancers of the pancreas, liver, and breast. *Biochemical and biophysical research communications* 1996 Jun 25;223(3):561-564.
52. Wakabayashi K, Lian ZX, Moritoki Y, Lan RY, Tsuneyama K, Chuang YH, et al. IL-2 receptor alpha(-/-) mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2006 Nov;44(5):1240-1249.
53. Wan YY, Flavell RA. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005 Apr 5;102(14):5126-5131.
54. Wan YY, Flavell RA. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunological reviews* 2007 Dec;220:199-213.
55. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *European journal of immunology* 2007 Jan;37(1):129-138.
56. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological reviews* 2001 Aug;182:207-214.
57. Yang GX, Lian ZX, Chuang YH, Moritoki Y, Lan RY, Wakabayashi K, et al. Adoptive transfer of CD8(+) T cells from transforming growth factor beta

receptor type II (dominant negative form) induces autoimmune cholangitis in mice. *Hepatology* (Baltimore, Md 2008 Jun;47(6):1974-1982.

58. Yasoshima M, Kono N, Sugawara H, Katayanagi K, Harada K, Nakanuma Y. Increased expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in pathologic biliary epithelial cells: in situ and culture study. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1998 Jan;78(1):89-100.

59. Zhang W, Sharma R, Ju ST, He XS, Tao Y, Tsuneyama K, et al. Deficiency in regulatory T cells results in development of antimitochondrial antibodies and autoimmune cholangitis. *Hepatology* (Baltimore, Md 2009 Feb;49(2):545-552.

60. Zhang Y, Liu P, Gao X, Qian W, Xu K. rAAV2-TGF-beta(3) Decreases Collagen Synthesis and Deposition in the Liver of Experimental Hepatic Fibrosis Rat. *Digestive diseases and sciences* 2010,55:2821-2830.



## **4.3. ΑΚΤΙΒΙΝΗ**

### **4.3.1 Αποτελέσματα**

#### **4.3.1.1. Συγκέντρωση Ακτιβίνης ορού**

Υπήρχε ισχυρή διαφορά μεταξύ όλων των ομάδων ( $p < 0.0001$ ).

Τα επίπεδα της ακτιβίνης στους υγιείς μάρτυρες ήταν 149 pg/ml (εύρος 91-193 pg/ml). Η ακτιβίνη ήταν σημαντικά αυξημένη ( $p < 0.001$ ) στον ορό των ασθενών με αλκοολική κίρρωση (ενδιάμεση τιμή 673 pg/ml, εύρος 449-3279 pg/ml), σε σχέση είτε με τους υγιείς μάρτυρες είτε με τους ασθενείς με ιογενή κίρρωση (ενδιάμεση τιμή 189 pg/ml, εύρος 81-480 pg/ml), χρόνια ηπατίτιδα C (ενδιάμεση τιμή 142 pg/ml, εύρος 65-559 pg/ml), ΠΧΚ σταδίου I-II (100 pg/ml, εύρος 59-597 pg/ml), και ΠΧΚ σταδίου IV (104 pg/ml, εύρος 81-579 pg/ml). Επίσης οι ασθενείς με ΗΚΚ σε έδαφος ιογενούς κίρρωσης είχαν επίπεδα παρόμοια με αυτά των υγιών μαρτύρων ή των άλλων ομάδων νοσημάτων ενώ οι ασθενείς με ΗΚΚ σε έδαφος αλκοολικής κίρρωσης είχαν επίσης σημαντικά αυξημένα επίπεδα (ενδιάμεσες τιμές 131 pg/ml, εύρος 42-773 pg/ml vs 2403 pg/ml, εύρος 7220 pg/ml,  $p < 0.001$ ).

Τα επίπεδα στον ορό της ηπατικής φλέβας ήταν επίσης σημαντικά υψηλά στην αλκοολική σε σχέση με την ιογενή κίρρωση (ενδιάμεση τιμή 2106 pg/ml, εύρος 1056-4212 pg/ml vs μέσος όρος 169 pg/ml, εύρος 62-557 pg/ml). Οι ασθενείς με αλκοολική ίνωση και στεάτωση του ήπατος είχαν επίπεδα παρόμοια με των άλλων ομάδων νοσημάτων (ενδιάμεση τιμή 262 pg/ml, εύρος 147-519 pg/ml). [\[Εικόνα 1\]](#)

#### **4.3.1.2. Επίδραση Σωματοστατίνης**

Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων πριν και μετά την 6μηνη θεραπεία με οκτρεοτίδη. [\[Εικόνα 2\]](#)

#### **4.3.1.3. Διαχωρισμός μεταξύ αλκοολικής και μη αλκοολικής κίρρωσης (ιογενούς και ΠΧΚ)**

Η ανάλυση των καμπυλών ROC ανέδειξε περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) 0.979. Με cut-off στα 444pg/ml η ευαισθησία ήταν 100 %, η ειδικότητα ήταν 90.2 % .

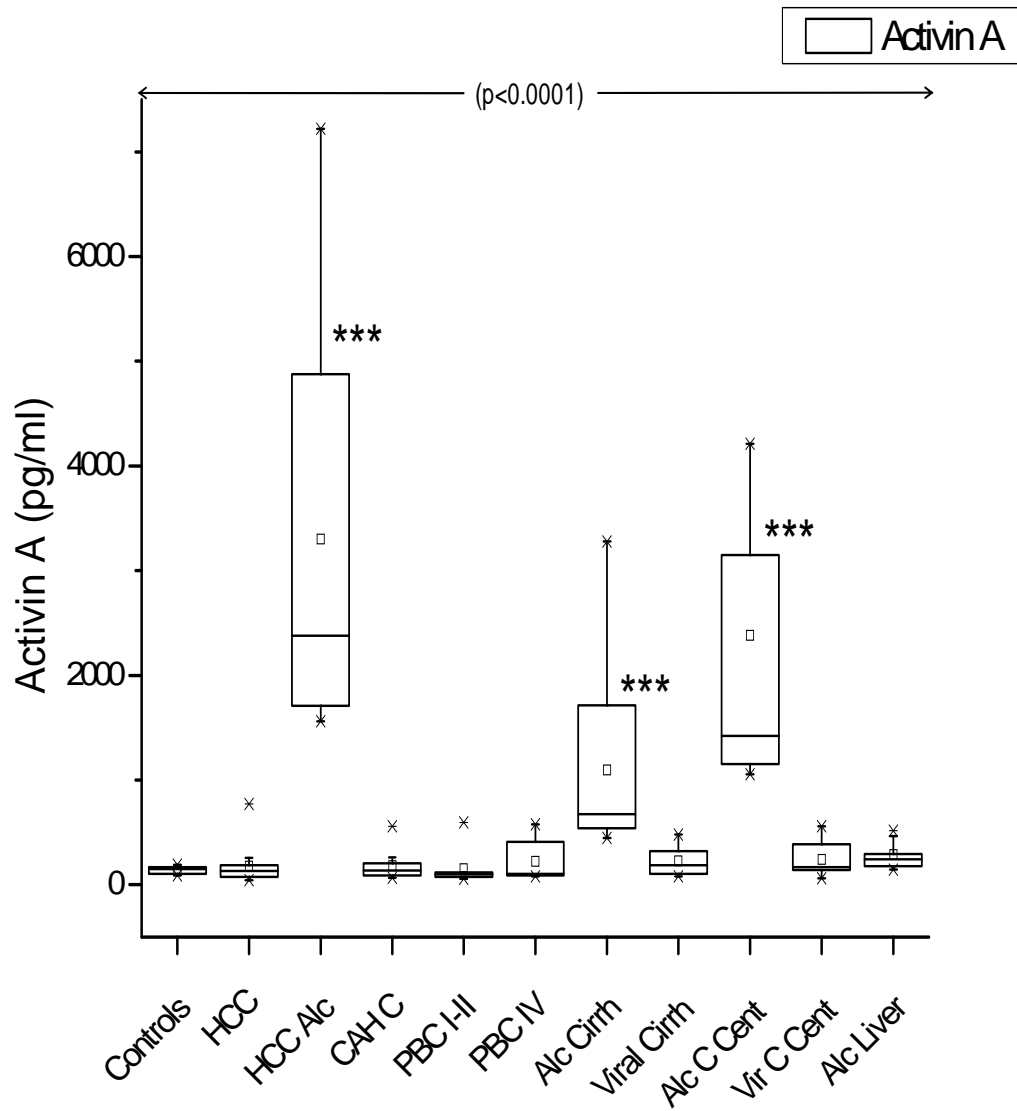
#### **4.3.1.4. Διαχωρισμός μεταξύ αλκοολικής κίρρωσης και αλκοολικής στεάτωσης του ήπατος με ίνωση**

Παρατηρήθηκε περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) 0.957 Με cut-off στα 528 pg/ml η ευαισθησία ήταν 77.3 %, η ειδικότητα ήταν 100 % .

#### **4.3.1.5. Η Ακτιβίνη των κολποειδών του αρουραίου**

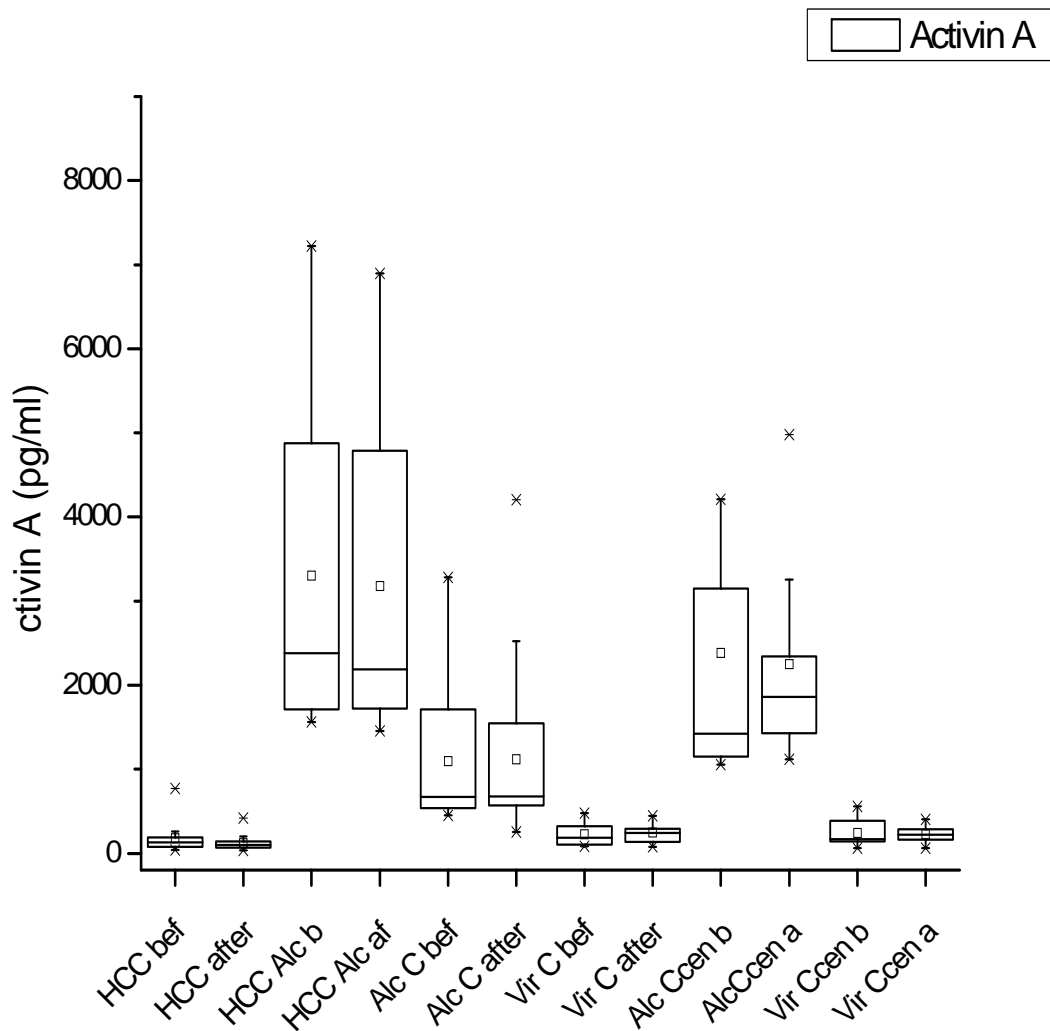
Τα κύτταρα του Kupffer και τα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος του αρουραίου ανέδειξαν την παρουσία RNA Ακτιβίνης [Εικόνα 3].

Η επώαση με Οκτρεοτίδη σε συγκέντρωση  $10^{-8}$  M δεν είχε επίδραση στα αστεροειδή κύτταρα ενώ στα κύτταρα του Kupffer παρατηρήθηκε αύξηση στις 24hrs, αν και η μέθοδος ήταν ημιποσοτική.

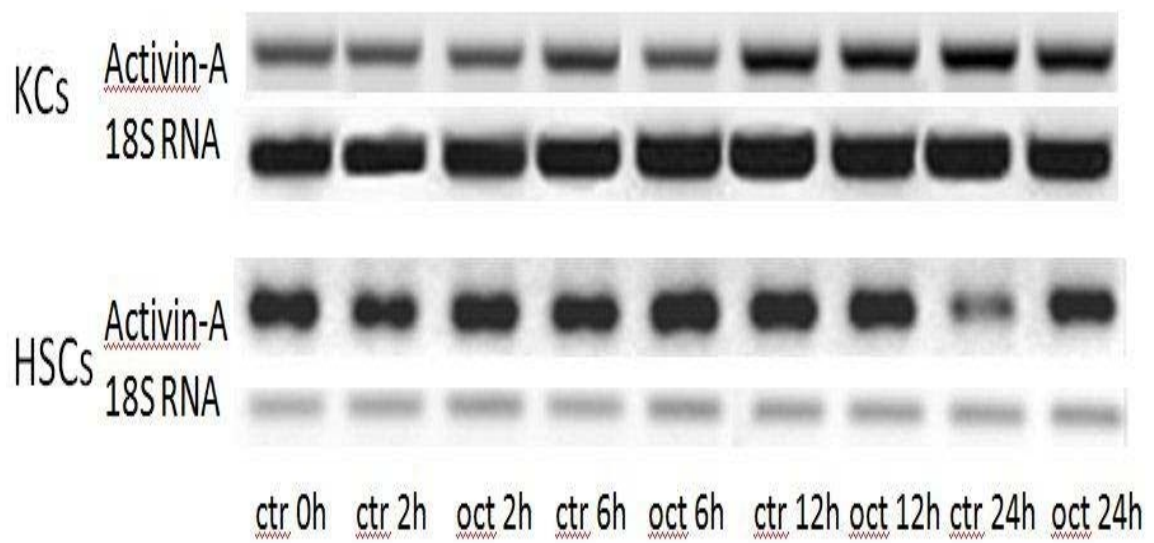


**Εικόνα 1.** Η συγκέντρωση της Ακτιβίνης του ορού σε ηπατικά νοσήματα. Τα θηκογράμματα δείχνουν το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (box), την ενδιάμεση τιμή (οριζόντια γραμμή) και το εύρος (κάθετες γραμμές). Cent. υποδηλώνει τον ορό των ηπατικών φλεβών. \*\*\*  $p < 0.001$ .

Τα επίπεδα ήταν σημαντικά αυξημένα στο περιφερικό αίμα των ασθενών με αλκοολική κίρρωση, με ή χωρίς ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Επίσης, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα στην ηπατική φλέβα των ασθενών με αλκοολική κίρρωση.



**Εικόνα 2.** Η χορήγηση της οκτρεοτίδης δεν είχε επίδραση στα επίπεδα της Ακτιβίνης στον περιφερικό ορρό ή στον ορρό της ηπατικής φλέβας. Τα θηκογράμματα δείχνουν το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (box), την ενδιάμεση τιμή (οριζόντια γραμμή) και το εύρος (κάθετες γραμμές). Cenb και cena υποδηλώνει τον ορρό των ηπατικών φλεβών, πριν και μετά την χορήγηση οκτρεοτίδης.



**Εικόνα 3.**

Έκφραση της Ακτιβίνης σε απομονωμένα κύτταρα του Kupffer (KC) και σε κύτταρα του Ito. Η επώαση με Οκτρεοτίδη σε διαφορετικά χρονικά σημεία δεν προκαλεί μεταβολή της έκφρασης της Ακτιβίνης και στα δύο είδη κυττάρων.

### 4.3.2. Συζήτηση

Στην μελέτη της ακτιβίνης Α διαπιστώσαμε ότι τα επίπεδα της ήταν σημαντικώς αυξημένα στους ασθενείς με αλκοολική κίρρωση αλλά όχι στους ασθενείς με κίρρωση άλλης αιτιολογίας.

Οι διαφορές ήταν σημαντικές και επέτρεπαν τον διαχωρισμό των ασθενών με αλκοολική κίρρωση από τους ασθενείς με ιογενή κίρρωση ή ΠΧΚ.

Επιπλέον, οι ασθενείς με μη κίρρωτική αλκοολική βλάβη του ήπατος είχαν επίπεδα ορρού που δεν διέφεραν από αυτά των υγιών μαρτύρων.

Τα επίπεδα της ακτιβίνης Α του ορρού ήταν επίσης αυξημένα στους ασθενείς με ΗΚΚ σε έδαφος αλκοολικής κίρρωσης αλλά όχι στους ασθενείς με ΗΚΚ σε έδαφος ιογενούς κίρρωσης.

Οι μελέτες της ακτιβίνης στα ηπατικά νοσήματα είναι λίγες.

Τα ευρήματα μας συμφωνούν με προηγούμενες δημοσιεύσεις που αναφέρουν αυξημένα επίπεδα ακτιβίνης Α στην αλκοολικής αιτιολογίας κίρρωση [1], αλλά σε αντίθεση με άλλες δημοσιεύσεις [2] οι δικοί μας ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα είχαν επίπεδα ορρού όχι διαφορετικά από αυτά των υγιών μαρτύρων.

Αυξημένα επίπεδα έχουν επίσης δημοσιευθεί στον ΗΚΚ [3,4] αλλά τα δικά μας αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτό ισχύει μόνον για τον ΗΚΚ που αναπτύσσεται σε έδαφος αλκοολικής κίρρωσης.

Πρόσφατα, αυξημένα επίπεδα ακτιβίνης Α ορρού έχουν ανακοινωθεί στην μη αλκοολική στεάτωση του ήπατος [5].

Δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί η λειτουργική και κλινική σημασία των αυξημένων επιπέδων ακτιβίνης Α στον ορρό. Αυξημένα επίπεδα ακτιβίνης Α έχει θεωρηθεί ότι προκαλούν μείωση της αναγέννησης των ηπατοκυττάρων στην οξεία ηπατική ανεπάρκεια [6].

Ο λόγος Φολιστατίνη/Ακτιβίνη επίσης έχει προταθεί ως δείκτης σοβαρότητας της ηπατικής βλάβης στην ηπατίτιδα που σχετίζεται με οξεία ηπατική ανεπάρκεια[7].

Ιδιαίτερος, η σημασία των αυξημένων επιπέδων της ακτιβίνης Α στην αλκοολική κίρρωση και στον ΗΚΚ που συνδέεται με το αλκοόλ δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη δεδομένου ότι η ακτιβίνη Α είναι μία κυτταροκίνη με διάφορες λειτουργίες οι οποίες μπορεί να είναι είτε ευεργετικές είτε καταστρεπτικές στην ηπατική νόσο. Στην ηπατική ίνωση η ακτιβίνη Α έχει εμπλακεί στην υπερπαραγωγή του κολλαγόνου [8-11] αφού η παραγωγή

κολλαγόνου από τα αστεροειδή κύτταρα είναι αυξημένη μετά από επίδραση της ακτιβίνης A [12]. Σε άλλη μελέτη η ακτιβίνη A ενεργοποιούσε την παραγωγή της φιμπρονεκτίνης από τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα, αλλά η σύνθεση του κολλαγόνου ήταν μόνο ελαφρώς αυξημένη στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα μετά από την ενεργοποίηση της ακτιβίνης [8.] Αντιθέτως, η Φολιστατίνη, ο κύριος βιολογικός αναστολέας της βιοδραστικότητας της ακτιβίνης μειώνει την πειραματική ίνωση με τον περιορισμό του πολλαπλασιασμού των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων και την αναστολή της απόπτωσης των ηπατοκυττάρων [17].

Επίσης, πρόσφατα έχει δημοσιευθεί ότι αυτή επάγει την σύνθεση του αυξητικού παράγοντα του συνδετικού ιστού, μίας σημαντικής προϊνωτικής πρωτεΐνης [13].

Αν και αυτό που μπορεί να είναι αληθές στην αλκοολική κίρρωση, δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ηπατική ίνωση άλλης αιτιολογίας σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα αυτά της ακτιβίνης μπορούν πράγματι και με άλλους τρόπους να είναι καταστροφικά στην αλκοολική κίρρωση. Υπάρχουν ουσιαστικά δεδομένα ότι η ακτιβίνη A είναι ένας σημαντικός αρνητικός ρυθμιστής της ηπατικής αύξησης κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και επίσης συνεισφέρει στον τερματισμό της ηπατικής αναγέννησης. Έχει φανεί ότι η ακτιβίνη A, όπως και ο TGFβ1, μπορεί και καταστέλλει την κατά την μίτωση επαγόμενη DNA σύνθεση και τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων και επάγει την απόπτωση των ηπατοκυττάρων *in vitro* και *in vivo* [14-16]

Μετά από χορήγηση CCl<sub>4</sub> ή μετά από μερική ηπατεκτομή παρατηρήθηκε καταστολή των υποδοχέων της ακτιβίνης στα ηπατοκύτταρα. Η καταστολή των υποδοχέων της Ακτιβίνης στα ηπατοκύτταρα μπορεί να είναι εν μέρει υπεύθυνη ώστε τα κύτταρα αυτά να ανταποκρίνονται στα μιτογόνα ερεθίσματα. Η Φολιστατίνη αφετέρου όταν χορηγείται σε πειραματόζωα μετά από ηπατεκτομή επιταχύνει την ηπατική αναγέννηση [18-21] αλλά αυτό μειώνει την ηπατική λειτουργία.

Από την άλλη μεριά η ακτιβίνη A δυνητικά μπορεί να είναι επωφελής στην ομοιοστασία του ήπατος. Έτσι παρά το ότι μειώνει την ηπατική αναγέννηση φαίνεται ότι αποκαθιστά την ηπατική αρχιτεκτονική [22] και αυξάνει την δημιουργία σωληνοειδών σχηματισμών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα συνεισφέροντας έτσι περαιτέρω στην ιστική αποκατάσταση [23].

Επιπλέον η ακτιβίνη A φαίνεται ότι αναστέλλει την οξεία φάση της αντίδρασης και μπορεί να ανταγωνίζεται την IL-6 [24]. Αυτή η δράση της ίσως είναι ευεργετική στην αλκοολική κίρρωση.

Η σημασία της ακτιβίνης A στον ΗΚΚ είναι το δεύτερο σημείο στο οποίο πρέπει να δοθεί έμφαση.

Η ακτιβίνη A έχει ανασταλτική αυξητική και προ-αποπτωτική δράση σε πολλούς τύπους επιθηλιακών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και των ηπατοκυττάρων και έτσι θεωρείται καταστολέας του όγκου [25].

Η ακτιβίνη A κάτω από φυσιολογικές συνθήκες συνεισφέρει στην ρύθμιση της κυτταρικής αντιγραφής στο ήπαρ και πιστεύεται ότι μία διαφυγή των ηπατοκυττάρων από τον αυξητικό έλεγχο που πραγματοποιείται με την μεσολάβηση της αναμένεται να προωθήσει την ανάπτυξη του όγκου. Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ηπατώματος εκφράζουν φολιστατίνη αλλά έχουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων β της ακτιβίνης σε σχέση με τα φυσιολογικά ηπατοκύτταρα. Η έκτοπη επανέκφραση των υπομονάδων της ακτιβίνης στα κύτταρα του ηπατώματος μειώνει τον αριθμό των κυττάρων και επάγει την απόπτωση. Ομοίως, η φολιστατίνη ήταν υπερεκφρασμένη ενώ και οι δύο υπομονάδες της ακτιβίνης ήταν κατασταλμένες στην πλειοψηφία των ανθρώπινων όγκων του ήπατος ή των όγκων του ήπατος των αρουραίων. [26-28].

Η άποψη ότι η ενδογενής ακτιβίνη A ασκεί ανασταλτική λειτουργία στην κυτταρική αύξηση ενισχύεται από το αναφερόμενο ότι η επώαση μίας σειράς κυττάρων ανθρώπινου ηπατώματος με antisense ολιγονουκλεοτίδια ακτιβίνης A διέγειρε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [29].

Επιπλέον, έκτοπη έκφραση των κυρίαρχων αρνητικών τύπου II υποδοχέων ακτιβίνης ή TGFβ προκάλεσε ηπατική σύνθεση DNA, πράγμα που υποδηλώνει ότι οι αντίστοιχοι δεσμευτές τους συνεισφέρουν στην καταστολή [30].

Η φολιστατίνη και η φολιστατίνη-like 3 δεσμεύουν τις ακτιβίνες και ανταγωνίζονται την δικές τους βιολογικές δραστηριότητες. Η έκφραση της φολιστατίνης-like 3 ήταν χαμηλή στο φυσιολογικό αλλά ενισχυμένη στο καρκινικό ήπαρ του αρουραίου. Αντιθέτως, η ακτιβίνη στο φυσιολογικό ανθρώπινο ήπαρ ήταν άφθονα εκφρασμένη αλλά κατασταλμένη στον καρκίνο του ήπατος. Χορήγηση φολιστατίνης στα φυσιολογικά και προνεοπλασματικά ηπατοκύτταρα ενεργοποιούσε την DNA σύνθεση κατά προτίμηση στα προνεοπλασματικά ηπατοκύτταρα του αρουραίου, ενώ η ακτιβίνη A την κατάσχελλε [31].



Η ευεργετική δράση της ακτιβίνης Α στον ΗΚΚ επιπλέον υποδεικνύεται από τις δημοσιεύσεις ότι ο Smad 7 αναστέλλει την σηματοδότηση της ακτιβίνης και προστατεύει τα ηπατοκύτταρα από την επαγόμενη από την ακτιβίνη Α καταστολή της αύξησης [32]. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυξημένη έκφραση του Smad 7 έχει παρατηρηθεί στον ΗΚΚ [33] κυρίως στον προχωρημένο ΗΚΚ σε σχέση με τον πρώιμο ΗΚΚ ή τους δυσπλαστικούς όζους. Επιπλέον, ανενεργείς μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν τις Smad 2 ή 4, οι οποίες μεταβιβάζουν την σηματοδότηση από την ακτιβίνη Α καθώς και από τον TGFβ, έχουν ανακαλυφθεί περίπου στο 10% των δειγμάτων των ανθρώπινων ηπατωμάτων [34].

Συνεπώς, μία ανασταλτική δράση της ακτιβίνης Α από την οκτρεοτίδη θα είχε σοβαρές συνέπειες στην θεραπευτική χρήση της οκτρεοτίδης στον ΗΚΚ. Τα αποτελέσματα μας όμως δείχνουν ότι η οκτρεοτίδη δεν επηρεάζει τα επίπεδα ακτιβίνης του ορού, ούτε και την έκφραση ακτιβίνης από τα μη παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος.

Όχι μόνο η ακτιβίνη Α αλλά και οι άλλες ακτιβίνες φαίνεται να είναι ευεργετικές στον ΗΚΚ. Ανθρώπινα HepG2 και Hep 3B κύτταρα είχαν δραματικά μειωμένες ακτιβίνες C και E. Η επαγωγή των ακτιβινών C και E αύξανε την απόπτωση αυτών των κυττάρων [35]

Η ακτιβίνη Α μπορεί επίσης να ασκήσει κατασταλτική λειτουργία στον όγκο δρώντας ως αναστολέας της αγγειογένεσης [36]

Αυτό είναι αντιφατικό αφού έχει δημοσιευθεί ότι η ακτιβίνη Α επάγει την έκφραση του VEGF (vascular endothelial growth factor) σε σειρές κυττάρων ανθρώπινου ηπατώματος, [37] υποδηλώνοντας επίσης έναν δυνητικά προ-αγγειογεννητικό ρόλο της ακτιβίνης Α στον ΗΚΚ.

Τέλος, πρέπει να σχολιαστεί η προέλευση της ακτιβίνης Α στην ηπατική βλάβη. Τα δικά μας ευρήματα από την ηπατική φλέβα υποδηλώνουν ότι το ήπαρ είναι η κύρια πηγή των επιπέδων του ορού.

Στο φυσιολογικό ήπαρ η ακτιβίνη Α εκφράζεται και κυρίως συντίθεται στα παρεγχυματικά κύτταρα πάντοτε χωρίς ανάγκη επαγωγής και η έκφραση της χάνεται στο ινωτικό ήπαρ. Κάτω από παθολογικές καταστάσεις τα μη παρεγχυματικά κύτταρα επίσης παράγουν ακτιβίνη Α δεδομένου ότι έκφραση της ακτιβίνης προκλήθηκε στα ενεργοποιημένα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα [38].

Στην μελέτη μας παρατηρήσαμε ότι τα αστεροειδή κύτταρα του αρουραίου εκφράζουν ακτιβίνη Α μετά την απομόνωση τους, αν και κάποια ενεργοποίηση

των κυττάρων αυτών δεν μπορεί να αποκλεισθεί εξ' αιτίας της διαδικασίας απομόνωσης και καλλιέργειας. Επίσης, αναδείξαμε ότι τα αδιέγεργα κύτταρα Kupffer του αρουραίου εκφράζουν ακτιβίνη A.

Συμπερασματικά, η ακτιβίνη A με την αναστολή της αναγέννησης και με την ενίσχυση της ίνωσης στο ήπαρ μπορεί να είναι επιβλαβής στους ασθενείς με αλκοολική κίρρωση, οι οποίοι σύμφωνα με την δική μας μελέτη βρέθηκε να έχουν υψηλά επίπεδα ακτιβίνης. Αλλά η πιθανή ευεργετική επίδραση της στην αναστολή του όγκου και στην αποκατάσταση της ηπατικής αρχιτεκτονικής δεν πρέπει να αγνοηθούν. Μία πρόσφατη δημοσίευση της επίδρασης της ακτιβίνης στην ρύθμιση των βλαστικών κυττάρων μπορεί επίσης να είναι ευεργετική. Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε ενδοδερμικά κύτταρα από την Ακτιβίνη A, ως ένα πρώτο βήμα προς την περαιτέρω διαφοροποίηση τους προς ηπατοκύτταρα [39].

Η διασπορά των δικών μας αποτελεσμάτων υποδηλώνει ότι όλοι οι ασθενείς με αλκοολική κίρρωση και/ή ΗΚΚ δεν έχουν αυξημένα επίπεδα ακτιβίνης A.

Επομένως, αυτό υποδηλώνει ότι η απάντηση στο ερώτημα, εάν η αυξημένη ακτιβίνη A που βρέθηκε στην αλκοολική κίρρωση και/ή στον ΗΚΚ είναι ευεργετική ή καταστρεπτική πιθανόν να δοθεί από μία προοπτική διαχρονική μελέτη παρακολούθησης αυτών των ασθενών με και χωρίς αυξημένα επίπεδα ακτιβίνης A ώστε να εκτιμηθεί η τελική τους πρόγνωση και επιβίωση.

### 4.3.3. Βιβλιογραφία

1. M.F. Yuen, S. Norris, L.W. Evans, P.G. Langley, R.D. Hughes, Transforming growth factor-beta 1, activin and follistatin in patients with hepatocellular carcinoma and patients with alcoholic cirrhosis, *Scand. J. Gastroenterol.* 37 (2002) 233–238
2. S. Patella, D.J. Phillips, D.M. de Kretser, L.W. Evans, N.P. Groome, W. Sievert, Characterization of serum activin-A and follistatin and their relation to virological and histological determinants in chronic viral hepatitis, *J. Hepatol.* 34 (2001) 576–583
3. Pirisi M, Fabris C, Luisi S, Santuz M, Toniutto P, Vitulli D, Federico E, Del Forno M, Mattiuzzo M, Branca B, Petraglia F. Evaluation of circulating activin-A as a serum marker of hepatocellular carcinoma. *Cancer Detect Prev* (2000) 24: 150-155
4. Elsammak, M.Y., Amin, G.M., Khalil, G.M., Ragab, W.S., Abaza, M.M., 2006. Possible contribution of serum activin A and IGF-1 in the development of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients suffering from combined hepatitis C virus infection and hepatic schistosomiasis. *Clin. Biochem.*39:623-629 2006.
5. Yndestad A, Haukeland JW, Børresdatter Dahl T, Bjørø K, et al. A Complex Role of Activin A in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Gastroenterol* 104:2196-2205 2009.
6. R.D. Hughes, L.W. Evans, Activin A and follistatin in acute liver failure, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15 (2003) 127–131.
7. Lin SD, Kawakami T, Ushio A, Sato A, Sato S, Iwai M, Endo R, Takikawa Y, Suzuki K. Ratio of circulating follistatin and activin A reflects the severity of acute liver injury and prognosis in patients with acute liver failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2006,21:374-380.

8. M Date, K. Matsuzaki, M. Matsushita, Y. Tahashi, K. Sakitani, K. Inoue, Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury, *J. Hepatol.* 32 (2000) 251–260
9. M. Sugiyama, T. Ichida, T. Sato, T. Ishikawa, Y. Matsuda, H. Asakura, Expression of activin A is increased in cirrhotic and fibrotic rat livers, *Gastroenterology* 114 (1998) 550–558.
10. D.K. Lee, S.H. Park, Y. Yi, S.G. Choi, C. Lee, W.T. Parks, H. Cho, M.P. de Caestecker, Y. Shaul, A.B. Roberts, S.J. Kim, The hepatitis B virus encoded oncoprotein pX amplifies TGF-beta family signaling through direct interaction with Smad4: potential mechanism of hepatitis B virus-induced liver fibrosis, *Genes Dev.* 15 (2001) 455–466.
11. Sabine Werner , Christian Alzheimer. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease .*Cytokine & Growth Factor Reviews* 17 (2006) 157–171
12. Wada W, Kuwano H, Hasegava Y, Kosima I. The dependence of transforming growth factor-b induced collagen production on autocrine factor Activin A in hepatic stellate cells. *Endocrinology* 145:2753-2759, 2004.
13. Gressner OA, Lahme B, Siluschek M, Rehbein K, Weiskirchen R, Gressner AM. Intracrine signalling of activin A in hepatocytes upregulates connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression *Liver Int.* 2008 Nov;28(9):1207-16.
14. J.R. Hully, L. Chang, R.H. Schwall, H.R. Widmer, T.G. Terrell, N.A. Gillett, Induction of apoptosis in the murine liver with recombinant human activin A, *Hepatology* 20 (1994) 854–862..
15. R.H. Schwall, K. Robbins, P. Jardieu, L. Chang, C. Lai, T.G. Terrell, Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro, *Hepatology* 18 (1993) 347–356)

16. H. Yasuda, T. Mine, H. Shibata, Y. Eto, Y. Hasegawa, T. Takeuchi, S. Asano, I. Kojima, Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes, *J. Clin. Invest.* 92 (1993) 1491–1496.
17. S. Patella, D.J. Phillips, J. Tchongue, D.M. de Kretser, W. Sievert, Follistatin attenuates early liver fibrosis: effects on hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290 (2006) G137–G144.
18. Kogure K, Omata W, Kanzaki M, Zhang YQ, Yasuda H, Mine T, and Kojima I. A single intraportal administration of follistatin accelerates liver regeneration in partially hepatectomized rats. *Gastroenterology* 108:1136–1142, 1995.
19. Kogure K, Zhang YQ, Kanzaki M et al Intravenous administration of follistatin: delivery to the liver and effect on liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 24:361-366, 1996
20. K. Kogure, Y.Q. Zhang, A. Maeshima, K. Suzuki, H. Kuwano, I. Kojima, The role of activin and transforming growth factor beta in the regulation of organ mass in the rat liver, *Hepatology* 31 (2000) 916–921.
21. K. Takabe, L. Wang, A.M. Leal, L.A. Macconell, E. Wiater, T. Tomiya, A. Ohno, I.M. Verma, W. Vale, Adenovirus-mediated overexpression of follistatin enlarges intact liver of adult rats, *Hepatology* 38 (2003) 1107–1115.
22. Endo D, Macu-uchi M, Kojima I. Activin or follistatin: which is more beneficial to support liver regeneration after partial hepatectomy. *Endocrine Journal* 2006, 53:73-78
23. Endo D, Kogure K, Hasegawa Y, Maku-uchi M, Kojima I. Activin A augments vascular endothelial growth factor activity in promoting branching tubulogenesis in hepatic sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 2004; 40: 399-404

24. K.L. Jones, D.M. de Kretser, S. Patella, D.J. Phillips, Activin A and follistatin in systemic inflammation, *Mol. Cell Endocrinol.* 225 (2004) 119–125.
25. G.P. Risbridger, J.F. Schmitt, D.M. Robertson, Activins and inhibins in endocrine and other tumors, *Endocr. Rev.* 22 (2001) 836–858.
26. S. Vejda, N. Erlach, B. Peter, C. Drucker, W. Rossmanith, J. Pohl, R. Schulte-Hermann, M. Grusch, Expression of activins C *Carcinogenesis* 24 (2003) 1801–1809.
27. H. Mashima, M. Kanzaki, R. Nobusawa, Y.Q. Zhang, M. Suzuki, T. Mine, I. Kojima, Derangements in the activin–follistatin system in hepatoma cells, *Gastroenterology* 108 (1995) 834–840.
28. W. Rossmanith, M. Chabicovsky, B. Grasl-Kraupp, B. Peter, E. Schausberger, R. Schulte-Hermann, Follistatin overexpression in rodent liver tumors: a possible mechanism to overcome activin growth control, *Mol. Carcinogen.* 35 (2002) 1–5
29. K. Takabe, J.J. Lebrun, Y. Nagashima, Y. Ichikawa, M. Mitsuhashi, N. Momiyama, T. Ishikawa, H. Shimada, W.W. Vale, Interruption of activin A autocrine regulation by antisense oligodeoxynucleotides accelerates liver tumor cell proliferation, *Endocrinology* 140 (1999) 3125–3132.
30. M. Mori, I. Kojima, Transforming growth factor beta and activin tonically inhibit DNA synthesis in the rat liver, *Hepatology* 34 (2001) 918–925
31. M. Grusch, C. Drucker, B. Peter-Vo“ro“smayr, N. Erlach, A. Losert, W. Schneider, M. Hermann, N. Groome, W. Parzefall, B. Grasl-Kraupp, R. Schulte-Hermann, Deregulation of the activin–follistatin system in hepatocarcinogenesis, *J. Hepatol.*, 2006, 673–680.
32. Kanamaru C, Yasuda H, Takeda M, Ueda N, Suzuki J, Tsuchida T, Mashima H, Ohnishi H, Fujita T. Smad7 is induced by norepinephrine and

protects rat hepatocytes from activin A-induced growth inhibition. *J Biol Chem* 2001; 276: 45636-45641

33. Ji GZ, Wang XH, Miao L, Liu Z, Zhang P, Zhang FM, Yang JB. Role of transforming growth factor-beta1-smad signal transduction pathway in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 644-648 ,

34. M.C. Yakicier, M.B. Irmak, A. Romano, M. Kew, M. Ozturk, Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma, *Oncogene* 18 (1999) 4879-4883.

35. Susanne Vejda \_ Natascha Erlach , Barbara Peter, Claudia Drucker, Walter Rossmann<sup>2</sup>, Jens Pohl<sup>1</sup>, Rolf Schulte-Hermann and Michael Grusch Expression of activins C and E induces apoptosis in human and rat hepatoma cells *Carcinogenesis* vol.24 no.11 pp.1801±1809, 2003

36. Panopoulou E, Murphy C, Rasmussen H, Bagli E, Rofstad EK, Fotsis T. Activin A suppresses neuroblastoma xenograft tumor growth via antimitotic and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res* 65:1877- 1886, 2005

37. K. Wagner, M. Peters, A. Scholz, C. Benckert, H.S. Ruderisch, B. Wiedenmann, S. Rosewicz, Activin A stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human hepatocellular carcinoma cells, *Gastroenterology* 126 (2004) 1828- 1843

38. P.J. De Bleser, T. Niki, G. Xu, V. Rogiers, A. Geerts, Localization and cellular sources of activins in normal and fibrotic rat liver, *Hepatology* 26 (1997) 905-912.

39. Zhou M, Li P, Tan L, Qu S, Ying QL, SongH. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells Into Hepatocytes Induced by a Combination of Cytokines and Sodium Butyrate *Journal of Cellular Biochemistry* 109:606-614 (2010)

## **4.4. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΕΣ (MMPS) ΚΑΙ ΙΣΤΙΚΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΩΝ (TIMP1) ΤΟΥ ΟΡΡΟΥ**

### **4.4.1. Αποτελέσματα**

#### **4.4.1.1. Μεταλλοπρωτεάσες**

Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφόρων ομάδων ασθενών, είτε εξεταζόμενες ως σύνολο ( $P=0.256$ ), είτε κατά την σύγκριση των ομάδων μεταξύ τους ( $P>0.05$  σε όλες τις συγκρίσεις).

Η μέθοδος όμως είναι αδρή αφού μετρά το σύνολο σχεδόν των μεταλλοπρωτεασών του ορρού. Είναι πιθανόν να προέκυπταν διαφορετικά αποτελέσματα, εάν ελέγχονταν οι επί μέρους μεταλλοπρωτεάσες ξεχωριστά.

Η χορήγηση σωματοστατίνης δεν προκάλεσε καμία διαφορά στα επίπεδα του ορρού [Εικόνα 1].

#### **4.4.1.2. TIMP1**

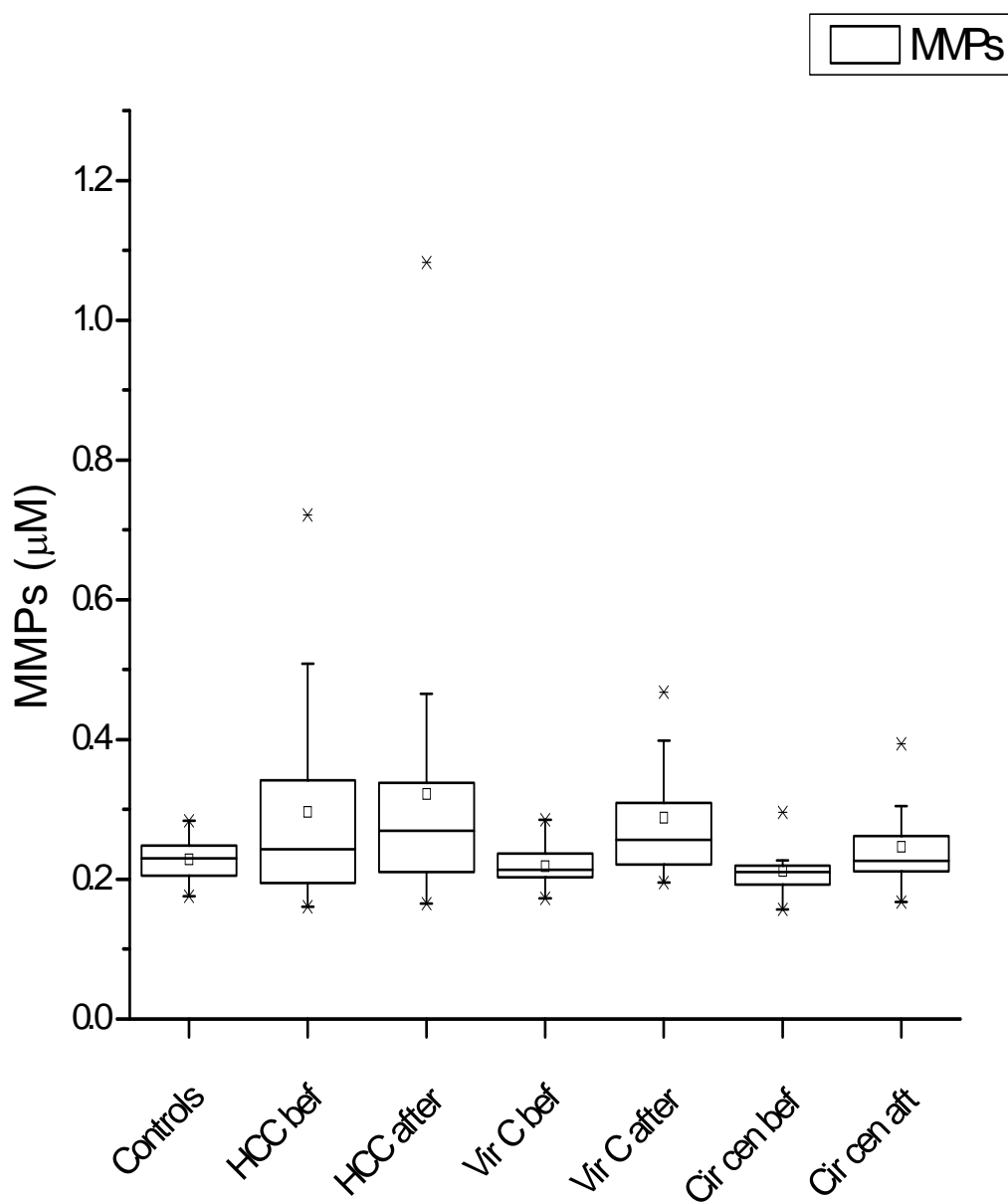
Υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ως σύνολο ( $P<0.001$ , Kruskal-Wallis). Η περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι τα επίπεδα TIMP1 ήταν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια, είτε συνολικά (Εικόνα 2  $P<0.01$ ), είτε όταν διαχωρίζονταν σε αλκοολική κίρρωση ( $P<0.01$ ) και αλκοολική στεάτωση ( $P<0.05$ ) σε σχέση πάντοτε με τους υγιείς μάρτυρες.

Τα επίπεδα ήταν αυξημένα και σε ασθενείς με ιογενή κίρρωση, όπως και σε εκείνους με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Οι διαφορές όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

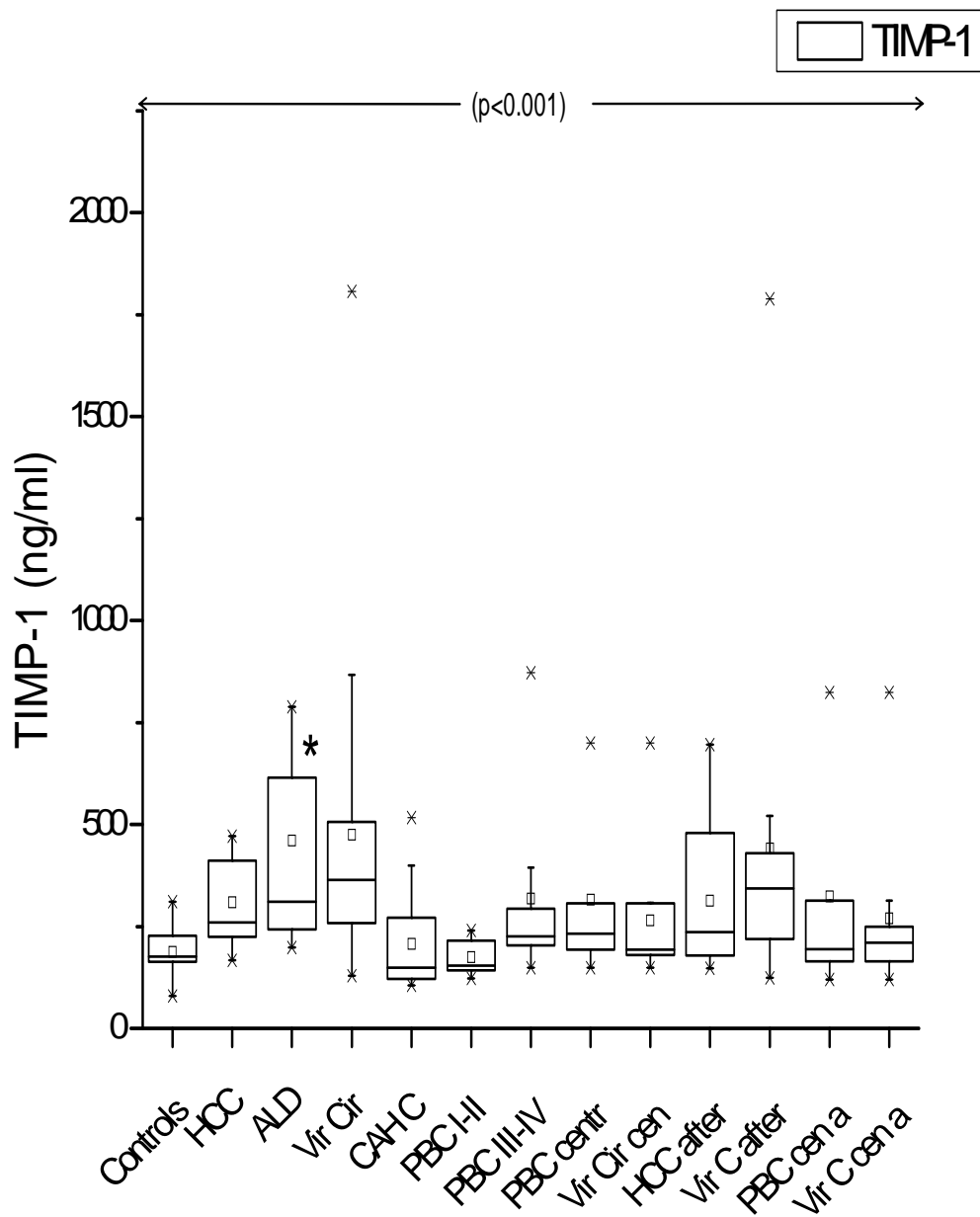
Αντιθέτως ασθενείς με πρωτογενή χολική κίρρωση είχαν επίπεδα παρόμοια με τους μάρτυρες ανεξαρτήτως του σταδίου της νόσου.

Η χορήγηση σωματοστατίνης δεν προκάλεσε καμία διαφορά στα επίπεδα του ορρού [Εικόνα 2].





**Εικόνα 1.** Επίπεδα μεταλλοπρωτεασών σε ασθενείς με χρόνια ηπατοπάθεια. Ουδεμία διαφορά παρατηρείται μεταξύ των ομάδων πριν ή μετά την χορήγηση σωματοστατίνης.



**Εικόνα 2.** Επίπεδα TIMP1 σε ασθενείς με χρόνια ηπατοπάθεια. Σημαντική αύξηση παρατηρείται στο σύνολο και σε ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια. Η χορήγηση σωματοστατίνης δεν επηρεάζει τα επίπεδα.

## 5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ & ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ:**

Η ηπατική ίνωση είναι ένα δυναμικό φαινόμενο η πρόοδος του οποίου εξαρτάται από την ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων του ήπατος. Η παραγωγή θεμέλιας ουσίας υπόκειται στην επίδραση πολλών κυτταροκινών ενώ η κλινική παρακολούθηση ασθενών με χρόνια ηπατοπάθεια επιβάλλει την παρακολούθηση της εξέλιξης της ίνωσης. Μέχρι σήμερα χρυσός κανόνας παραμένει η βιοψία ήπατος, μία μέθοδος αιματηρή με βαθμό νοσηρότητας.

Επιπλέον, παράγοντες που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά είναι δυνατόν να επηρεάσουν αρνητικά την εξέλιξη της ίνωσης με απρόβλεπτα αποτελέσματα.

Η Οκτρεοτίδη (συνθετική σωματοστατίνη) χρησιμοποιείται ευρέως για τον έλεγχο της κίρρωσης και τη θεραπεία του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Η επίδραση της στην διαδικασία της ίνωσης δεν έχει μελετηθεί.

### **ΣΚΟΠΟΣ:**

Μελετήθηκε η επίδραση της Οκτρεοτίδης σε παραμέτρους του ορρού σχετιζόμενους με την ίνωση ασθενών με χρόνια ηπατοπάθεια.

### **ΜΕΘΟΔΟΙ:**

Επιλέχθηκαν πρωτεΐνες του ορρού που έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με την ίνωση. Μελετήθηκαν 4 ομάδες πρωτεϊνών:

**α)** Οι πρωτεΐνες λεπτίνη, λαμινίνη, κολλαγόνο-IV και το υαλουρονικό οξύ. Μετρήθηκαν στο περιφερικό αίμα ασθενών με χρόνιες ηπατοπάθειες όπως και στο αίμα των ηπατικών φλεβών κατόπιν καθετηριασμού κίρρωτικών ασθενών. Επιδιώχθηκε με την δημιουργία περιοχών κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve, AUC), να διερευνηθεί η δυνατότητα διαχωρισμού ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα από ασθενείς με κίρρωση, όπως και η δυνατότητα διαχωρισμού ασθενών με πρώιμα στάδια πρωτογενούς χολικής κίρρωσης από το κίρρωτικό στάδιο της νόσου. Μελετήθηκε επίσης η επίδραση της Οκτρεοτίδης στους παράγοντες αυτούς. Οι μετρήσεις έγιναν με εμπορικά διαθέσιμες ELISA.

**β)** Στους ίδιους ασθενείς μελετήθηκε βιοχημικά (ELISA), η ομάδα των πρωτεϊνών TGFβ, δηλαδή οι TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3 και η επίδραση της Οκτρεοτίδης στα επίπεδά τους. Επί πλέον, στο μέρος αυτό μελετήθηκε

ιστοχημικά (μέθοδοι αλκαλικής φωσφατάσης και ανοσοφθορισμού) η εντόπιση στον ηπατικό ιστό των πρωτεϊνών αυτών. Επίσης, μελετήθηκε σε περιορισμένο αριθμό ηπατικών ιστών η έκφραση του mRNA της πρωτεΐνης FoxP3 χαρακτηριστικής των Treg κυττάρων, δεδομένου ότι δυνητικά θα μπορούσε να επηρεάζεται από τα επίπεδα των ισομορφών του TGFβ.

**γ)** Σε άλλη ομάδα ασθενών μελετήθηκε η πρωτεΐνη Ακτιβίνη Α (ELISA), πού επίσης σχετίζεται με την ίνωση αλλά και την αναγέννηση των ηπατοκυττάρων και η επίδραση της Οκτρεοτίδης στα επίπεδα της. Στο μέρος αυτό μελετήθηκε και η εντόπιση της πρωτεΐνης δεδομένου ότι υπάρχουν λίγες πληροφορίες σχετικά με αυτό. Απομονώθηκαν κύτταρα Kupffer και αστεροειδή κύτταρα ήπατος αρουραίου και μελετήθηκε η έκφραση της Ακτιβίνης Α και η επίδραση της Οκτρεοτίδης με ημιποσοτική PCR.

**δ)** Τέλος μελετήθηκαν τα επίπεδα των μεταλλοπρωτεασών του οργού και ο αναστολέας αυτών TIMP1 (ELISA), όπως και η επίδραση της Οκτρεοτίδης σε αυτούς.

#### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:**

**α)** Οι πρωτεΐνες λεπτίνη, λαμινίνη, κολλαγόνο IV και το υαλουρονικό οξύ μετρήθηκαν στο περιφερικό αίμα 62 ασθενών με πρωτογενή χολική κίρρωση (ΠΧΚ) (27, στάδιο IV κατά Ludwig και 35 πρώιμα στάδια I-II), 44 ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C 38 ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα πριν και 6 μήνες μετά τη χορήγηση Οκτρεοτίδης, 34 ασθενών με ιογενή κίρρωση και συγκρίθηκαν με 60 υγιείς μάρτυρες. Μετρήθηκαν επίσης σε αίμα από την ηπατική αρτηρία 15 κίρρωτικών ασθενών με ΠΧΚ και 17 ασθενών με ιογενή κίρρωση πριν και 6 μήνες μετά τη χορήγηση Οκτρεοτίδης.

Όλες οι ομάδες των ασθενών είχαν σημαντικώς αυξημένα επίπεδα υαλουρονικού και κολλαγόνου IV ενώ η λαμινίνη ήταν σημαντικώς αυξημένη μόνον στην ιογενή κίρρωση. Τα επίπεδα της λεπτίνης δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ομάδων. Ειδικά στην ΠΧΚ τα επίπεδα του υαλουρονικού διέφεραν σημαντικά μεταξύ πρώιμης (54.6ng/ml, 95%CI 27.3-426.7) και κίρρωτικής ΠΧΚ (154.5ng/ml 95% CI 55.3-764.4,  $p < 0.05$ ). Οι AUC ήταν 0.74 για το υαλουρονικό, 0.63 για την λεπτίνη, 0.59 για την λαμινίνη και 0.70 για το κολλαγόνο IV. Επιπρόσθετα, το υαλουρονικό είχε υψηλή ευαισθησία και αρνητική προγνωστική αξία (NPV) για την ανίχνευση τού κίρρωτικού σταδίου ΠΧΚ (96% και 90% αντίστοιχα).

Καμία μεμονωμένη μέτρηση δεν ήταν ικανή να διαφορίσει μεταξύ προ κίρρωτικού και κίρρωτικού σταδίου, αλλά το υαλουρονικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της εξέλιξης της ίνωσης συναρτήσει του χρόνου, σε ασθενείς με ΠΧΚ. Η χρήση Οκτρεοτίδης δεν επηρέασε τις τιμές των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν ή του υαλουρονικού στους ασθενείς όπου χορηγήθηκε.

**β)** Οι ισομορφές του TGFβ μελετήθηκαν στους ίδιους ασθενείς όπως και προηγουμένως.

Ο TGFβ1 ήταν σημαντικά μειωμένος σε όλες τις ομάδες των κίρρωτικών ασθενών (ΠΧΚ 13.4ng/ml, διακύμανση 7.4-26.2, HCV κίρρωση 11.6,ng/ml,5.0-33.8) σε σχέση με τους μάρτυρες (30.9ng/ml, 20.9-37.8).

Ο TGFβ2 ήταν αυξημένος σε ιογενή κίρρωση αλλά όχι σε ΠΧΚ και χρόνια ηπατίτιδα.

Ο TGFβ3 (τιμές μαρτύρων 47.2pg/ml, διακύμανση 27.0-79.7) ήταν αυξημένος τόσο σε πρώιμη ΠΧΚ (94.3pg/ml,41.5-358.6) όσο και σε κίρρωτική νόσο (152.8pg/ml,60.4-361.2).  $P < 0.001$  και για τις δύο ομάδες.

Αντιθέτως, ήταν μειωμένος στην ιογενή κίρρωση (37.4pg/ml, 13.3-84.0,  $P < 0.05$ ).

Τα επίπεδα όλων των ισομορφών στις ηπατικές φλέβες ήταν ανάλογα με εκείνα του περιφερικού αίματος.

Η ανοσοιστοχημική μελέτη εντόπισε την παρουσία και των τριών ισομορφών σε λεμφοκύτταρα των πυλαίων διαστημάτων (πιθανόν Treg), σε κύτταρα των κολποειδών και σε χολαγγειοκύτταρα. Η τελευταία αυτή εντόπιση δεν έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία.

Η μελέτη της έκφρασης του FoxP3 στον ιστό με ημιποσοτική PCR, δεν έδειξε διαφορά στην έκφραση μεταξύ ΠΧΚ και ιογενούς κίρρωσης.

Οι καμπύλες ROC έδειξαν ότι μεταξύ των 3 ισομορφών μόνον ο TGFβ1 μπορεί να αξιολογηθεί σε προοπτική μελέτη για την διάκριση μεταξύ πρώιμης και τωτικής ΠΧΚ, ενώ οι άλλοι δεν ήταν κατάλληλοι για να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ίνωσης.

Τέλος η Οκτρεοτίδη δεν επηρέαζε τα επίπεδα και των τριών ισομορφών.

**γ)** Τα ευρήματα από την μελέτη της ακτιβίνης A ήταν τελείως διαφορετικά.

Τα επίπεδα της ακτιβίνης A ήταν σημαντικά αυξημένα ( $P < 0.001$ ) στον ορρό ασθενών με αλκοολική κίρρωση (διάμεση τιμή 673pg/ml, διακύμανση 449-3279), σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες (149pg/ml 91-193) ή τους ασθενείς με ιογενή κίρρωση (189pg/ml, 81-480), χρόνια ηπατίτιδα C (142

pg/ml, 65-559) ΠΧΚ στάδιο I-II (100 pg/ml 59-597) και ΠΧΚ στάδιο IV (104 pg/ml, 81-579). Ασθενείς με ηπάτωμα σε έδαφος ιογενούς κίρρωσως είχαν επίπεδα όμοια με τους μάρτυρες, αλλά ασθενείς με ηπάτωμα σε έδαφος αλκοολικής κίρρωσως, είχαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα. (131 pg/ml, 42-773 vs 2403 pg/ml, 1561-7220pg/ml αντίστοιχα  $p < 0.001$ ). Τα επίπεδα στην ηπατική φλέβα ήταν παρόμοια με το περιφερικό αίμα.

Η ακτιβίνη A εκφραζόταν τόσο στα αστεροειδή κύτταρα, όσο και στα κύτταρα του Kupffer, πράγμα που δεν έχει περιγραφεί στην βιβλιογραφία.

Η οκτρεοτίδη, είτε χορηγουμένη στους ασθενείς, είτε κατά την *in vitro* επώαση των κολποειδικών κυττάρων δεν είχε καμία επίδραση στην ακτιβίνη A.

**δ)** Τα επίπεδα των ολικών μεταλλοπρωτεϊνών και του αναστολέα των TIMP1, ήταν όμοια μεταξύ όλων των ομάδων χρόνιων ηπατοπαθειών και των φυσιολογικών μαρτύρων, είτε στο περιφερικό, είτε στο αίμα των ηπατικών φλεβών. Η θεραπεία με Οκτρεοτίδη δεν επηρέαζε τις τιμές.

Αντιθέτως, τα επίπεδα του TIMP1 ήταν σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια. Ασθενείς με ιογενή κίρρωση με ή χωρίς ηπατοκυτταρικό καρκίνο είχαν αυξημένα επίπεδα αλλά χωρίς στατιστική σημαντικότητα. Αντιθέτως, ασθενείς με ΠΧΚ είχαν επίπεδα παρόμοια με τους μάρτυρες. Η Οκτρεοτίδη δεν επηρέαζε τις τιμές του TIMP1.

### **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:**

**1)** Κανένας από τους βιοχημικούς δείκτες που μελετήθηκαν δεν μπορεί με ακρίβεια να διαχωρίσει την πρώιμη από την προχωρημένη ίνωση του ήπατος. Εν τούτοις, το υαλουρονικό οξύ και ο TGF b1 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μακροχρόνια παρακολούθηση ασθενών με ΠΧΚ. Χρειάζεται όμως προοπτική αξιολόγηση και των δύο.

**2)** Η οκτρεοτίδη δεν επηρεάζει τα επίπεδα των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ίνωση και άρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς πρόβλημα στις χρόνιες ηπατοπάθειες.

**3)** Το προφίλ του ορρού ως προς τις ισομορφές του TGFβ είναι διαφορετικό αναλόγως του αιτίου της νόσου. Η αύξηση του TGFβ3 φαίνεται ότι χαρακτηρίζει την ΠΧΚ, παρατηρείται ήδη από τα πρώτα στάδια της νόσου και επομένως μπορεί να σχετίζεται παθογενετικά με αυτήν.

**4)** Οι ισομορφές του TGFβ εκτός από τις ήδη βιβλιογραφικά περιγραφόμενες εντοπίσεις στο ήπαρ (λεμφοκύτταρα και κύτταρα κολποειδών) εντοπίζονται και στα κύτταρα των μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων.

**5)** Η ακτιβίνη A είναι χαρακτηριστικά αυξημένη στην αλκοολική κίρρωση με ή χωρίς ηπατοκυτταρικό καρκίνο και μπορεί να διαφορίσει την αλκοολική από την ιογενή και την πρωτογενή χολική κίρρωση. Η προέλευση της στο περιφερικό αίμα προέρχεται σχεδόν αποκλειστικά από το ήπαρ όπου εκτός των ήδη περιγραφόμενων εντοπίσεων (ηπατοκύτταρα και αστεροειδή κύτταρα), βρέθηκε να εκφράζεται και από τα κύτταρα του Kupffer.

## 6. SUMMARY & CONCLUSIONS

### **INTRODUCTION:**

Liver fibrosis is a dynamic phenomenon, the progression of which depends upon the activation of hepatic stellate cells. The production of extracellular matrix protein is regulated by many cytokines while clinical evaluation of patients with chronic liver disease demands a regular evaluation of the fibrotic process. Until now liver biopsy remains the gold standard, but it is an invasive procedure with some degree of morbidity.

Moreover, therapeutic substances might negatively influence the development of fibrosis with detrimental results.

Octreotide, a synthetic somatostatin, is widely used for the control of variceal bleeding and the therapy of HCC. The effect of Octreotide in the process of fibrosis has not been studied.

### **AIM:**

To study the effect of Octreotide on serum parameters related to fibrosis of patients with chronic liver disease.

### **METHODS:**

Serum proteins that have been shown to be associated with the fibrotic process were chosen. Four groups of proteins were studied:

**a)** Leptin, Laminin, Collagen-IV and Hyaluronan were measured in the peripheral blood of patients with chronic liver disease as well as in the hepatic vein blood after catheterization of cirrhotic patients. Areas Under the Curve (AUC) were created to investigate the possibility of discrimination between patients with chronic viral hepatitis and viral cirrhosis, as well as the possibility of discrimination between patients with early PBC and advanced PBC. The effect of Octreotide on serum levels of these factors was also studied. Measurements were done with commercially available ELISAs.

**b)** In the same patients, the group of TGF $\beta$  proteins (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3) and the effect of Octreotide in their levels were also biochemically studied (ELISA). Moreover, in this part we used histochemistry (methods of alkaline phosphatase and immunofluorescence) to localize these proteins in the hepatic tissue. Also, in a limited number of hepatic tissues the mRNA



expression of the protein FoxP3, a protein characteristic of Treg cells was studied, since it could potentially be influenced by the TGF $\beta$  isoform levels.

**c)** In another group of patients the protein Activin A (ELISA), which has also been associated with either fibrosis or with regeneration of hepatocytes was evaluated. The effect of Octreotide in the levels of Activin A was also studied. Since few information exist about the origin of Activin A, in this part we studied the localization of the protein in non-parenchymal cells of the rat liver. Kupffer cells and hepatic stellate cells from were isolated and the expression of Activin A and the effect of Octreotide were evaluated using a semiquantitative PCR.

**d)** Finally, serum levels and the effect of Octreotide on metalloproteases (MMPs) and the metalloprotease inhibitor TIMP1 was also evaluated by ELISA.

## **RESULTS:**

**a)** Leptin, Laminin, Collagen-IV and Hyaluronan were measured in the peripheral blood of 62 PBC patients (27 stage III- IV and 35 stage I-II according to Ludwig), 44 chronic hepatitis C patients, 38 HCC patients before and after 6 months of Octreotide treatment, 34 viral cirrhosis patients and compared to 60 normal controls. They were also measured in the hepatic vein blood of 15 cirrhotic PBC patients and 17 patients with viral cirrhosis before and after 6 months of Octreotide treatment.

All disease groups had significantly increased levels of Hyaluronan and Collagen IV, while Laminin was significantly increased only in viral cirrhosis. Levels of Leptin were not significantly different among groups. Hyaluronan levels were significantly different between early (54.6ng/ml, 95%CI 27.3-426.7) and late PBC (154.5ng/ml 95% CI 55.3-764.4,  $p < 0.05$ ). AUC was 0.74 for Hyaluronan, 0.63 for Leptin, 0.59 for Laminin and 0.70 for collagen IV. Hyaluronan had high Sensitivity and Negative Prognostic Value (NPV) in identifying late stages of PBC (96% and 90% respectively).

No single measurement was able to differentiate between early and advanced stage liver fibrosis, but Hyaluronan can be used for longitudinal studies of fibrosis progression, in PBC patients. Administration of Octreotide did not influence the values of the fibrosis markers studied..

**$\beta$ )** Isoforms of TGF $\beta$  were studied in the same group of patients.

TGFβ1 was significantly decreased in all cirrhotic patients (PBC 13.4ng/ml, range 7.4-26.2, HCV cirrhosis 11.6 ng/ml, 5.0-33.8) compared to controls (30.9ng/ml, 20.9-37.8).

TGFβ2 was increased in viral cirrhosis but not in PBC and chronic HCV hepatitis.

TGFβ3 (controls values 47.2pg/ml, range 27.0-79.7) was increased in both early and late PBC (94.3pg/ml, 41.5-358.6 and 152.8pg/ml,60.4-361.2 respectively, P<0.001 for both groups).

By contrast, TGFβ3 was decreased in viral cirrhosis (37.4pg/ml, 13.3-84.0, P<0.05).

The levels of all isoforms in hepatic veins were analogous to the peripheral blood.

Immunohistochemistry identified the presence of all 3 isoforms in portal tract lymphocytes (probably Tregs), sinusoidal cells and cholangiocytes. This last localization has not been previously reported in bibliography.

The study of FoxP3 expression in the liver tissue with the semiquantitative PCR, did not show any difference in the expression between PBC and viral cirrhosis.

ROC curves showed that among the 3 isoforms only TGFβ1 deserves a prospective evaluation as a serum fibrosis marker potentially capable to differentiate between early and late PBC but not between chronic viral hepatitis and viral cirrhosis. The other two isoforms were not suitable for use as indicators of fibrosis.

Finally, Octreotide did not influence the levels of all 3 isoforms.

**y)** The results from the Activin A study were totally different.

Activin levels were significantly increased (P<0.001) in serum of patients with alcoholic cirrhosis (median 673pg/ml, range 449-3279), compared to either controls (149pg/ml,91-193) or patients with viral cirrhosis (189pg/ml, 81-480), Chronic Hepatitis C (142 pg/ml, 65-559) PBC stage I-II (100 pg/ml 59-597) and PBC stage IV (104 pg/ml, 81-579). Patients with HCC associated with viral cirrhosis had levels similar to controls, but patients with HCC associated with alcoholic cirrhosis had significantly increased levels (131 pg/ml, 42-773 vs 2403 pg/ml,1561-7220pg/ml, respectively p<0.001). Levels in the hepatic vein were similar to the peripheral blood.

The Activin A was expressed in the stellate and Kupffer cells, a fact that has not been previously described..

Octreotide either used therapeutically in patients or during in vitro incubation of sinusoidal cells did not have any significant effect in either Activin serum levels or in mRNA expression in sinusoidal cells.

**d)** The levels of total MMPs were similar among all groups of patients with chronic liver diseases and normal controls, either in the peripheral blood or in the hepatic vein blood. By contrast TIMP1 was increased in patients with alcoholic liver disease. Treatment with Octreotide did not influence serum values.

### **CONCLUSIONS:**

**1)** None of the biochemical markers that were studied can separate with precision early from advanced liver fibrosis. However, hyaluronan and TGF $\beta$ 1 might be used for longitudinal studies of PBC patients. A prospective evaluation is required.

**2)** Octreotide does not influence the levels of proteins related to fibrosis and hence can be used without problems in chronic liver diseases.

**3)** Serum profile of TGF $\beta$  isoforms is different depending on the cause of liver disease. Increased TGF $\beta$ 3 is a characteristic of PBC already observed in early disease. It is possible therefore that it might be related to the pathogenesis of the disease.

**4)** The isoforms of TGF $\beta$  apart from the already described localizations in the liver (lymphocytes and sinusoidal cells) are also localized in the cells of the small intrahepatic bile ducts.

**5)** Serum levels of Activin A are characteristically increased in patients with alcoholic cirrhosis with or without HCC and allowed discrimination of alcoholic from either viral cirrhosis or PBC. The origin of Activin A in the peripheral blood seems to be derived almost exclusively from the liver where apart from the already described localizations (hepatocytes and stellate cells), in the present study was found to be also expressed in the Kupffer cells.

