

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ -ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΚΑΙ  
ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ  
ΤΗΣ ΘΞΕΙΑΣ ΙΟΓΕΝΟΥΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΜΑΙΡΗ Ε. ΚΟΥΛΕΝΤΑΚΗ  
ΙΑΤΡΟΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002

ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ  
ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ  
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ  
ΤΗΣ ΟΞΕΙΑΣ ΙΟΓΕΝΟΥΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ

Μ. Κουλεντάκη  
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΗΛΙΑΣ ΚΟΥΡΟΥΜΑΛΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ ΜΠΟΥΡΟΣ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΟΥΖΑΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΗΛΙΑΣ ΚΟΥΡΟΥΜΑΛΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΗΛΙΑΣ ΚΑΣΤΑΝΑΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΝΔΡΟΝΙΚΗ ΤΟΣΚΑ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ ΜΠΟΥΡΟΣ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΟΥΖΑΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΛΙΟΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Στους γονείς μου

για την παιδεία και

την υποστήριξη που μου πρόσφεραν

Στον Διαμαντή και στα παιδιά μας  
για την αγάπη και την κατανόηση τους.

**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου στην Γαστρεντερολογική Κλινική με Διευθυντή αρχικά τον Καθηγητή κ. Ορέστη Μανούσο (1995-1996) και στην συνέχεια τον Καθηγητή κ. Ηλία Κουρούμαλη (1996-2001), στο Ηπατολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημίου Κρήτης, με Διευθυντή τον Καθηγητή κ. Ηλία Κουρούμαλη και στο Εργαστήριο Κλινικής Ανοσολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου με διευθυντή τον καθηγητή Ηλία Καστανά.

Στην πραγματοποίηση της παρούσης μελέτης βοήθησαν οι παρακάτω στους οποίους εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ τον Καθηγητή μου, κ Ηλία Κουρούμαλη, ο οποίος με την πολύχρονη πείρα του στην έρευνα με ενέπνευσε και με καθοδήγησε. Για την συνεχή του βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές του, τόσο κατά την διάρκεια της ειδικότητος μου όσο και κατά την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής βαθύτατα τον ευχαριστώ.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ τους Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημοσθένη Μπούρο και Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Μουζά, μέλη της τριμελούς επιτροπής για την συμβολή τους στην πραγματοποίηση και διόρθωση της παρούσης Διδακτορικής Διατριβής.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ την Λέκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Πετεινάκη Έφη, για την βοήθεια της στην εκπαίδευση μου στο εργαστήριο και την ουσιαστική της συνδρομή στην πραγματοποίηση της παρούσης μελέτης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ τον Καθηγητή κ Η. Καστανά διευθυντή του Εργαστηρίου Κλινικής Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και το προσωπικό του εργαστηρίου για την βοήθεια τους.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ τους ιατρού Βασίλη Βαλάτα, κ. Κώστα Ξυδάκη, ιατρό Γεώργιο Νότα και τον Ανδρέα Κουρούμαλη, για την συμβολή τους στην ολοκλήρωση και συμμετοχή τους στην συγγραφή των δημοσιεύσεων τμημάτων της διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Πανεπιστημιακό δάσκαλο, Καθηγητή κ Μανούσο Ορέστη, για την ανεκτίμητη προσφορά του στην επιστημονική μου κατάρτιση στα πρώτα χρόνια της ειδικότητος μου.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	7
---------------------	---

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ.....	29
Υποδοχείς Κυτταροκινών .....	29
Α. Ιντερλευκίνες	
IL-1.....	31
IL-2.....	36
IL-4.....	38
IL-6.....	39
IL-7.....	40
IL-10.....	41
IL-11.....	42
IL-12.....	42
IL-13.....	43
IL-15.....	43
IL-16.....	44
IL-17.....	44
IL-18.....	44
Β. Ιντερφερόνες	
INF-α.....	45
INF-β.....	45
INF-γ.....	45
Γ. Παράγοντες νέκρωσης των όγκων	

TNF- $\alpha$ .....	47
<b>Δ. Αυξητικοί παράγοντες</b>	
TGF- $\beta$ .....	53
E. Χημειοκίνες.....	55
<b>ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΝΕΣ.....</b>	<b>57</b>
Κυτταροκίνες Ρυθμιστές της Αρχέγονης Ανοσολογικής Απάντησης.....	58
Κυτταροκίνες Ρυθμιστές της Δευτερογενούς Ανοσολογικής Απάντησης.....	60
Κυτταροκίνες και Ήπαρ.....	63

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

<b>ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΟΞΕΙΑΣ ΦΑΣΕΩΣ.....</b>	<b>66</b>
Πρωτεΐνες Οξείας Φάσεως και Οξεία Ηπατίτιδα.....	68
<b>ΑΝΟΣΟΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΑ.....</b>	<b>69</b>
<b>ΤΟ ΝΟ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΦΛΕΓΜΟΝΗ.....</b>	<b>70</b>
ΝΟ στην Οξεία Ηπατίτιδα.....	71
<b>ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ.....</b>	<b>72</b>
Μεταλλοπρωτεάσες (MMPs).....	72
Αναστολείς των Μεταλλοπρωτεασών.....	76
MMPs και Αναστολείς στην Οξεία Ηπατίτιδα.....	78

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

<b>ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ HBV ΛΟΙΜΩΞΕΩΣ.....</b>	<b>81</b>
Αρχέγονη Ανοσολογική Απάντηση στην Οξεία Ηπατίτιδα.....	82
Δευτερογενής Ανοσολογική απάντηση στην Οξεία Ηπατίτιδα.....	83
<b>ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ HCV ΛΟΙΜΩΞΕΩΣ.....</b>	<b>87</b>
Χυμική Ανοσία.....	87

<b>Κυτταρική Ανοσία.....</b>	<b>88</b>
<b>Κυτταροκίνες .....</b>	<b>90</b>
<b>Άλλοι Παράγοντες.....</b>	<b>90</b>
<b>ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΗΑΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΣ.....</b>	<b>92</b>

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

<b>ΣΚΟΠΟΣ.....</b>	<b>95</b>
<b>ΑΣΘΕΝΕΙΣ.....</b>	<b>96</b>
<b>ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>98</b>
<b>ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....</b>	<b>100</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>100</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>106</b>
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>111</b>
<b>ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ.....</b>	<b>120</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>129</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>155</b>
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....</b>	<b>160</b>

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

<b>Γέννηση</b>	11-4- 1961: Ηράκλειο, Κρήτης
<b>Οικ. Κατάσταση</b>	Έγγαμος, μητέρα τριών παιδιών
<b>Προπτυχιακές σπουδές</b>	Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου G.D' Annunzio, Chieti Ιταλίας
<b>Αποφοίτηση</b>	3-1988: βαθμός Άριστα 110/110 και έπαινος
<b>Άδεια ασκήσεως</b>	-Ιταλία: Μάιος του 1988, Ελλάδα: Αύγουστος 1988
<b>Ειδικότητα</b>	7-1998: Τίτλος ειδικότητας Γαστρεντερολογίας
<b>Κλινική άσκηση- εκπαίδευση</b>	1985/88: Γηριατρική Κλ. Πανεπιστημίου G.D' Annunzio. Άμισθη εσωτερική βοηθός 10-1988/5-90: Υπηρεσία Υπαίθρου Κ.Υ. Καστελλίου. 8-1990/12-92: Γ' Παθ. Κλ. Β.Π.Γ.Ν. Ηρακλείου. Ειδικευόμενη Παθολογίας. 2-1993/6-98: Γαστρ/κή Κλ. ΠΕΠΑΓΝΗ. Ειδικευόμ. Γαστρ/γίας 7-1998/1-1999: Επιστημονικός συνεργάτης Γαστρ/κής Κλ. ΠΕΠΑΓΝΗ. 2-1999/2-2000: Honorary Registrar στο Dept. of Digestive Disease and Clinical Nutrition, Ninewells Hospital, Dundee Scotland. 3-2000/1-2002: Επιστημονικός συνεργάτης Γαστρ/κής Κλ. ΠΕΠΑΓΝΗ. 2-2001/1-2002: Ελεύθερο επάγγελμα
<b>Υποτροφία</b>	-Υπότροφος Εξωτερικού Ελληνικής Γαστρεντερολογικής Εταιρείας, έτος 1999
<b>Ξένες γλώσσες</b>	-Αγγλικά: "Proficiency in English, University of Michigan" -Γαλλικά: "Certificat de langue Francese, Institut France d'Atene" -Ιταλικά

<b>Διπλωματική Εργασία</b>	-Διαταραχές του Αυτόνομου Νευρικού Συστήματος στον Υπερτασικό Ενήλικα”
<b>Ερευνητικά ενδιαφέροντα</b>	-Ηπατίτιδα, Πρωτοπαθής Χολική Κίρρωση, Ηπάτωμα, Κλινική Θρέψη.
<b>Μέλος Εταιρειών</b>	Τακτικό μέλος Ελληνικής Γαστρεντερολογικής Εταιρείας Τακτικό μέλος Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης του Ήπατος Μέλος του British Medical Council Ιδρυτικό μέλος του Συλλόγου βοήθειας εξαρτημένων στο αλκοόλ ατόμων, «Επιστροφή»

## ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΡΓΟ

### ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1) Κ. Ζαμκοτζιάν, **Μ. Κουλεντάκη**, Ν. Ανδρουλάκης, Μ. Γωνιανάκης, Δ. Γκουζούλη, Γ. Αλδάκος: Υποτροπιάζουσα ορονοσία επί εδάφους Χρονίας Ενεργού Ηπατίτιδος Β. 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Γαστρεντερολογικό Συνέδριο Αθήνα 30 Οκτωβρίου- 2 Νοεμβρίου 1991. Περίληψη στην Ελληνική Γαστρεντερολογία 1991 ; 4: 60.
- 2) **Μ. Κουλεντάκη**, Β. Θεοδωράκη, Κ. Ζαμκοτζιάν, Μ. Γωνιανάκης, Μ. Αλεξανδράκης, Εμμ. Γανωτάκης, Σ. Κορτσιδάκης. Υποτροπιάζουσα αφθώδης στοματίτις-Είναι πάντοτε μια αθώα πάθηση; 6<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο 12-15 Νοεμβρίου 1992. Εργασία δημοσιευμένη στα Πρακτικά του Συνεδρίου Τόμος Β', σελ:580.
- 3) Κ. Ζαμκοτζιάν, Γ. Χαιρέτη, Φ. Αθανασάκη, Ν. Ανδρουλάκης, Μ. Αλεξανδράκης, **Μ. Κουλεντάκη**, Δ. Γκουζούλη: Συγκριτική μελέτη αντιμετώπισης της οξείας αιμορραγίας του ανωτέρου πεπτικού με Η2 Ανταγωνιστές και μικρές δόσεις αντιοξίνων έναντι μονοθεραπείας με υψηλές δόσεις αντιοξίνων. 6<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο 12-15 Νοεμβρίου 1992. Εργασία δημοσιευμένη στα Πρακτικά του Συνεδρίου Τόμος Β', σελ: 488.
- 4) Τμήμα Αιμοδοσίας ΓΝ Χανίων: Ν Τζαγκαράκης. Τμήμα Αιμοδοσίας ΓΝ Ρεθύμνης: Π Δρανδάκης. Εργαστήριο Ιολογίας ΠεΠαΓΝΗ: Ε Μπιζιάκος, Δ Σπαντίδος. Γαστρεντερολογική Κλινική ΠεΠαΓΝΗ: Η Κουρούμαλης Μ Ψιστάκης, **Μ Κουλεντάκη**, Σ Σπανουδάκης, Ο Μανούσος. Ο Επιπολασμός της Ηπατίτιδος C στην Κρήτη. 7<sup>ο</sup>

Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Ρέθυμνο 18-29 Νοεμβρίου 1994. Περίληψη στα Πρακτικά του Συνεδρίου σελ 15.

- 5) Ε Μπιζιάκος, Χ Λιονής, **Μ Κουλεντάκη**, Ε Λιουδάκη, Ο Μανούσος, Μ Φιορέτος, Η Κουρούμαλης, Δ Σπαντίδος. Επιπολασμός Δεικτών Ηπατίτιδας Α, Β, C σε μαθητές Γυμνασίων και Λυκείου σε μία Γεωγραφικά Προσδιορισμένη Περιοχή της Αγροτικής Κρήτης. 7<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Ρέθυμνο 18-29 Νοεμβρίου 1994. Περίληψη στα Πρακτικά του Συνεδρίου σελ 16.
- 6) Π Σκορδίλης, Μ Ψιστάκης, Α Καραχρήστος, **Μ Κουλεντάκη**, Ε Οικονομάκη, Γ Αλεξανδράκης, Η Κουρούμαλης, Ο Μανούσος. Φυσική Ιστορία μη Αντισταθμιζόμενης Κιρρώσεως. 7<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Ρέθυμνο 18-29 Νοεμβρίου 1994. Περίληψη στα Πρακτικά του Συνεδρίου σελ. 181.
- 7) Ν Τζαγκαράκης, Π Δρανδράκης, Μπιζιάκος Ε, Σπαντίδος Δ, Κουρούμαλης Η, Ψιστάκης Μ, **Κουλεντάκη Μ**, Σπανουδάκης Σ, Μανούσος ΟΝ. Ο επιπολασμός της ηπατίτιδος Β και δέλτα στα νοσοκομεία της Κρήτης. 7<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Ρέθυμνο 18-29 Νοεμβρίου 1994. Περίληψη στα Πρακτικά του Συνεδρίου σελ.14.
- 8) Ποταμιάνος Σ, Σκορδίλης Π, Αλεξανδράκης Γ, Ρουσομουστακάκη Μ, Μουζάς Ι, **Κουλεντάκη Μ**, Κουρούμαλης Η, Μανούσος ΟΝ. Σύγκριση αποτελεσματικότητας κηρίων Savary και μπαλονιών TTS δύσκολων στενώσεων οισοφάγου. 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας 22-25 Νοεμβρίου 1995 Περίληψη στην Ελληνική Γαστρεντερολογία 1995; 8: 18.

- 9) ΓΝ Χανίων: Ν Τζαγκαράκης, Χ Κουρούσης, Ε Σπηλιωτοπούλου. ΓΝ Ρεθύμνης: Π Δρανδάκης. ΠεΠαΓΝΗ:-Ιολογικό Εργαστ: Μ Εργαζάκη Ρ Λιουδάκη, Δ. Σπαντίδος - Τμήμα Αιμοδοσίας: Ε Καντιδάκη. -Γαστρ/κή Κλινική: Η Κουρούμαλης, **Μ Κουλεντάκη**, Σ Σπανουδάκης, Σ Μυγιάκης. Ο επιπολασμός των ηπατιτίδων Β, D, C στα νοσοκομεία της Κρήτης. 4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο. Θεσσαλονίκη, 13-15 Απριλίου 1995.
- 10) **Μ Κουλεντάκη**, Ε Ματρέλλα, Μ Τζαρδή, Μ Ραισάκη, Η Κουρούμαλης, Ο Μανούσος. Μεγάλη Αύξηση του δείκτη CA 19-9 σε ασθενή με Παρόξυνση Χρονίας Ενεργου Ηπατίτιδος Β. 4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο. Θεσσαλονίκη, 13-15 Απριλίου 1995
- 11) Κουκουράκη ΣΙ, Καψωριτάκης Α, Ξυλούρης Α, **Κουλεντάκη Μ**, Χαρουλάκης Ν, Πρασόπουλος Π, Κουρούμαλης Η, Καρκαβίτσας Ν. Η συμβολή της συνδιασμένης σπινθηρογραφικής μελέτης του ήπατος με 99mTc-Sc/67Ga στη διαγνωστική προσπέλαση του ηπατοκυτταρικού καρκίνου. 8<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 24-28 Οκτωβρίου 1996.
- 12) **Κουλεντάκη Μ**, Σκορδίλης Π, Μουζάς Γ, Αλεξανδράκης Γ, Σπανουδάκης Σ, Ποταμιάνος Σ, Ματρέλλα Ε, Κουρούμαλης Η, Μανούσος ΟΝ. Ενδοσκοπική αντιμετώπιση ξένων σωμάτων ανωτέρου πεπτικού. 8<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 24-28 Οκτωβρίου 1996.
- 13) **Κουλεντάκη Μ**, Κόμης Γ, Τζαρδή Μ, Κρητικός Η, Κρεμασμένου Ε, Αλεξανδράκης Γ, Κουρούμαλης Η, Μανούσος ΟΝ. Πρωτοπαθής χολική κίρρωση και Σ Sjogren στην Κρήτη. 8<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 24-28 Οκτωβρίου 1996.



- 14) **Κουλεντάκη Μ**, Ποταμιάνος Σ, Αλεξανδράκης Γ, Σκορδίλης Π, Μουζάς Ι, Κουρούμαλης Η, Μανούσος ΟΝ. Συνδιασμένη συντηρητική παρηγορητική θεραπεία ανεγχείρητων καρκίνων οισοφάγου. 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας 12-16 Οκτωβρίου 1996. Περίληψη στην Ελληνική Γαστρεντερολογία 1996; 9: 11.
- 15) Οικονομάκη Ε, Σκορδίλης Π, Αλεξανδράκης Γ, **Κουλεντάκη Μ**, Κουρούμαλης Η. Συσχέτιση των ιών HBV και HCV με κίρρωση ήπατος, ηπάτωμα (HCC). 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, 12-16 Οκτωβρίου 1996. Περίληψη στην Ελληνική Γαστρεντερολογία 1996; 9: 66.
- 16) Σκορδίλης Π., Οικονομάκη Ε, Ποταμιάνος Σ, Λεοντίδης Χ, Σπανουδάκης Σ, Μοσχανδρέα Ι, **Κουλεντάκη Μ**, Κουρούμαλης Η, Μανούσος ΟΝ. Σχέση μεγέθους ολισθαίνουσας διαφραγματοκίλης και βαθμού οισοφαγίτιδος. 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, 12-16 Οκτωβρίου 1996. Περίληψη στην Ελληνική Γαστρεντερολογία 1996; 9: 10.
- 17) **Κουλεντάκη Μ**, Σπανουδάκης Σ, Ματρέλλα Ε, Αλεξανδράκης Γ, Κουρούμαλης Η. Ηπατίτιδα C στην Κρήτη. Τέταρτη Ημερίδα για την ηπατίτιδα C, Αθήνα 1<sup>η</sup> Φεβρουαρίου 1997. Εργασία δημοσιευμένη στο βιβλίο “Ηπατίτιδα C” Στέφανος Χατζηγιάννης, 1997 σελ.177.
- 18) Α Καμφοριτάκης, Τζαρδή Μ, Αλεξανδράκης Γ, Οικονομάκη Ε, **Κουλεντάκη Μ**, Βαλάτας Β, Ματρέλλα Ε, Κουρούμαλης Η. Το φάσμα των ηπατοπαθειών στην Κρήτη. Ο ρόλος του HCV. 5<sup>ο</sup> Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 28-29 Μαρτίου 1997.

- 19) **Κουλεντάκη Μ**, Πεδιαδίτης Γ, Σπανουδάκης Σ, Εργαζάκη Μ, Σπαντίδος Δ, Τζαγκαράκης Ν, Δρανδράκης Π, Κουρούμαλης Η. Ο επιπολασμός των δεικτών ηπατίτιδος Β και C σε τρία νοσοκομεία της Κρήτης. Καταγραφή τεσσάρων ετών 5<sup>ο</sup> Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 28-29 Μαρτίου 1997
- 20) **Κουλεντάκη Μ**, Πεδιαδίτης Γ, Φουντούλη Κ, Σπανουδάκης Σ, Δ, Τζαγκαράκης Ν, Δρανδράκης Π, Κουρούμαλης Η. Ο επιπολασμός των δεικτών ηπατίτιδος Β και C σε αιμοδότες.. Καταγραφή τεσσάρων ετών. 5<sup>ο</sup> Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 28-29 Μαρτίου 1997.
- 21) Οικονομάκη Ε, Αλεξανδράκης Γ, **Κουλεντάκη Μ**, Σπανουδάκης Σ, Κουρούμαλης Η. Η χορήγηση D Penicillamine (D PEN) βελτιώνει την ανταπόκριση στην ιντερφερόνη (IFN) στις χρόνιες ηπατίτιδες. 5<sup>ο</sup> Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 28-29 Μαρτίου 1997.
- 22) **Κουλεντάκη Μ**, Πετεινάκη Ε, Κρητικός Η, κόμης Γ, Αλεξανδράκης Γ, Αλεξάκη Π, Κουρούμαλης Η. Αυτοαντισώματα στην Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση στην Κρήτη. 5<sup>ο</sup> Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 28-29 Μαρτίου 1997.
- 23) Καψωριτάκης Α, Κουκουράκη Σ, Τζαρδή Μ, **Κουλεντάκη Μ**, Γιατρομανωλάκη Α, Χαρουλάκης Ν, Καρκαβίτσας Ν, Κουρούμαλης Η. Συνδιασμένη σπινθηρογραφική μελέτη του ήπατος με 99mTc-Sc/67Ga. Η συμβολή της στην διαφορική διάγνωση του καρκίνου του ήπατος. 5<sup>ο</sup> Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 28-29 Μαρτίου 1997.
- 24) Αλεξανδράκης Γ, Σκορδίλης Π, **Κουλεντάκη Μ**, Μοσχανδρέα Ι, Χαρουλάκης Ν, Τζαρδή Μ, Κουρούμαλης Η. Φυσική πορεία του προχωρημένου ηπατοκυτταρικού καρκίνου. 5<sup>ο</sup> Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 28-29 Μαρτίου 1997.

- 25) ΠΑ Θεοδωρόπουλος, Χ Πολιουδάκη, Ο Κωστάκης, **Μ Κουλεντάκη**, Η Κουρούμαλης, ΣΔ Γεωργάτος. PBC68: Μία πρωτεΐνη των πυρηνικών πόρων που συνδέεται με την μιτωτική άτρακτο κατά την κυτταρική διαίρεση. 49<sup>η</sup> συνεδρία της Ελληνικής Βιοχημικής και Βιοφυσικής Εταιρίας Ηράκλειο 22-23 Μαΐου 1998. Έλαβε πρώτο βραβείο αναρτημένης ανακοίνωσης.
- 26) Σ. Σπανουδάκης, Π. Σκορδίλης, Σ. Σιαφίκος, Ι. Μουζάς, Ε. Οικονομάκη, **Μ. Κουλεντάκη**, Ε. Χατζάκη, Σ. Ντόνα-Γανωτάκη, Η. Κουρούμαλης. Συσχέτιση ανοχής και χορήγησης καταστολής στην ενδοσκόπηση κατωτέρου πεπτικού. 9<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 5-8 Νοεμβρίου 1998. Περίληψη 283 στα Πρακτικά του Συνεδρίου σελ.74.
- 27) **Μ. Κουλεντάκη**, Ε Πετεινάκη, Γ. Αλεξανδράκης, Μ. Τζαρδή, Η. Καστανάς, Η. Κουρούμαλης. Πρωτοπαθής Χολική Κίρρωση και Αυτοάνοση Χολαγγειίτις στην Κρήτη. 9<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 5-8 Νοεμβρίου 1998. Περίληψη 290 στα Πρακτικά του Συνεδρίου σελ.76.
- 28) Ε. Πετεινάκη, Η. Κρητικός, **Μ. Κουλεντάκη**, Ι Κουτρομπάκης, Η. Κουρούμαλης, Η. Καστανάς. Μελέτη λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών του περιφερικού αίματος στον αστικό πληθυσμό της Κρήτης. 9<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 5-8 Νοεμβρίου 1998. Περίληψη P49 στα Πρακτικά του Συνεδρίου σελ.101.
- 29) Σ. Σπανουδάκης, **Μ. Κουλεντάκη**, Σ. Σιαφίκος, Ε. Οικονομάκη, Μ. Ψιστάκης, Χ. Λεοντίδης, Γ. Αλεξανδράκης, Η. Κουρούμαλης. Προοδευτική αύξηση συμπτωματικής οξείας ηπατίτιδος Α την τελευταία πενταετία στην Κρήτη. 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο

Γαστρεντερολογίας, Αθήνα 25-28 Νοεμβρίου 1998. Περίληψη (ΠΑ032) στην Ελληνική Γαστρεντερολογία 1998; S11: p11.

30) Σ. Σπανουδάκης, Σ. Σιαφίκος, Ι. Μουζάς, Π. Σκορδίλης, Ε. Οικονομάκη, , **Μ. Κουλεντάκη**, Γ. Αλεξανδράκης, Η. Κουρούμαλης. Ανοχή και αποτελεσματικότητα προετοιμασίας με διάλυμα πολυαιθυλενγλυκόλης για κολονοσκόπηση (προοπτική συγκριτική μελέτη). 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα 25-28 Νοεμβρίου 1998. Περίληψη (ΑΑ194) στην Ελληνική Γαστρεντερολογία 1998; S11: p52.

31) **Μ. Κουλεντάκη**, Ε. Πετεινάκη, Ι. Κουτρομπάκης, Μ. Τζαρδή, Ε. Αναγνωστοπούλου, Ι. Μουζάς, Η. Κουρούμαλης. Συσχέτιση Πρωτοπαθούς Χολικής Κιρρώσεως και ελκώδους κολίτιδος. 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα 25-28 Νοεμβρίου 1998. Περίληψη (ΑΑ 241) στην Ελληνική Γαστρεντερολογία 1998; S11: p64.

32) Ε. Πετεινάκη, **Μ. Κουλεντάκη**, Μ. Τζαρδή, Η. Καστανάς, Η. Κουρούμαλης. Ανοσολογικοί δείκτες σε ασθενείς με Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση. 4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ανοσολογικό Συνέδριο. Θεσσαλονίκη 1-12-1998.

33) Γ. Νότας, **Μ. Κουλεντάκη**, Κ. Ξυδάκης, Β. Βαλάτας, Η. Κουρούμαλης. Επίπεδα νιτρικού οξειδίου ορού (NO) σε οξεία ιογενή ηπατίτιδα. 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, 1999.

34) Γ. Νότας, Α. Κουρούμαλης, Β. Βαλάτας, Κ. Ξυδάκης, **Μ. Κουλεντάκη**, Η. Κουρούμαλης. Επίπεδα ενδοθηλίνης και νιτρικού οξειδίου σε Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση. 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, 1999.

35) Β Βαλάτας, Κ Ξυδάκης, Α Κουρούμαλης, **Μ Κουλεντάκη**, Ε Ματρέλλα, Π Παπακυριάκου, Η Κουρούμαλης. Μεταλλοπρωτεάσες (MMPS) και αναστολείς τους στην πρωτογενή χολική κίρρωση (PBC) 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, 1999.

36) **Μ Κουλεντάκη**, Β Βαλάτας, Ε Πετεινάκη, Ε Κολυβάκη, Ε Οικονομάκη, Ι Μουζάς, Η Καστανάς, Η Κουρούμαλης. Πρωτείνες οξείας φάσεως στην ιογενή ηπατίτιδα. 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο 2001.

37) **Μ Κουλεντάκη**, Ε Πετεινάκη, Κ Ξυδάκης, Σ Ευφραιμίδου, Α Μανιάτης, Η Κουρούμαλης. IL-2, IL-12, TGF- β στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση και αυτοάνοση χολαγγειίτιδα. 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο 2001.

38) **Μ Κουλεντάκη**, Ε Πετεινάκη, Β Βαλάτας, Ι Μουζάς, Η Καστανάς, Η Κουρούμαλης. Κυτταροκίνες στην οξεία ιογενή ηπατίτιδα. 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο 2001.

39) **Μ Κουλεντάκη**, Ε Πετεινάκη, Β Βαλάτας, Η Καστανάς, Η Κουρούμαλης. Ανοσοφαινότυποι στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση και αυτοάνοση χολαγγειίτιδα. 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο 2001.

40) **Μ Κουλεντάκη**, Ι Μοσχανδρέα, Κ Χατζηκόστας, Φ Δημουλιός, Μ Τζαρδή, Γ Κόμης, Η Κουρούμαλης. Η χορήγηση ουρσοδεοξυχολικού οξέως (UDCA) αυξάνει την επιβίωση ασθενών με πρωτογενή χολική κίρρωση (ΠΧΚ) και αυτοάνοση χολαγγειίτιδα (ΑΧ). 21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας 2001.

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1) Gikas A, Kyriakakis E, Lydataki N, Bouros D, Babalis T, Saridaki M, Gigourtaki M, **Kouledaki M**, Metaxaris G, Froudarakis M, Kofteridis D, Tselentis I. Etude Multicentrique de l'infection aigue a Coxiella Burnetti en Crete (Grece). Aspects Clinique Bacteriologique et therapeutique. 13e Reunion Interdisciplinaire de Chimiotherapie anti-Infectieuse Paris, Δεκέμβριος 1993. Περίληψη στα Πρακτικά του Συνεδρίου.

2) Frangiadakis N, Mouzas IA, Skordilis P, Kouroumalis E, **Koulentaki M**, Manousos ON. Regression of radiologic abnormalities of primary sclerosing cholangitis in a young woman after ursodeoxycholic acid therapy. European Congress I.H.P.B.A. "Athens'95", Μάιος 1995. Περίληψη στο Surgery 1995;9(1):128.

3) Lionis C, **Koulentaki M**, Frangoulis E, Alexandrakis G, Kouroumalis E. Prevalence of hepatitis A,B,and C markers in school children in a high risk area of rural Crete. IX triennial international symposium on Viral hepatitis and liver disease, Rome Italy, Απρίλιος 1996. Περίληψη στα Πρακτικά του Συνεδρίου.

4) Lionis C, **Koulentaki M**, Alexandrakis G, Biziagos E, Kouroumalis E. Current prevalence of hepatitis A,B and C in a well-defined area in rural Crete, Greece. A seroepidemiological study. IX triennial international symposium on Viral hepatitis and liver disease, Rome Italy, Απρίλιος 1996 Περίληψη στα Πρακτικά του Συνεδρίου.

5) Kouroumalis E, Alexandrakis G, **Koulentaki M**, Economaki H, Tzardi M, Manousos ON. Comparison of four different treatment schedules of interferon for chronic hepatitis C. IX triennial international symposium on Viral hepatitis and liver disease, Rome Italy, Απρίλιος 1996. Περίληψη στα Πρακτικά του Συνεδρίου.

6) Lionis C, Frangoulis E, **Koulentaki M**, Kouroumalis E. Gender differences in hepatitis C infection: The Cretan paradox and female predominance. European General Practice Research Workshop. Vaxjo- Sweden, Μάιος 1996.

7) Diamantis I, Kouroumalis E, **Koulentaki M**, Fusler-Kan E, Bassetti S, Buhler H, Gyr K, Battegay M. Hepatitis G virus in chronic liver disease, blood donors with HCV and HbsAg positivity and drug users. Mediterranean Medical Congress. Limassol Κύπρος, Νοέμβριος 1996. Έλαβε το πρώτο βραβείο στην κατηγορία των ελεύθερων ανακοινώσεων.

8) **Koulentaki M**, Petinaki E, Kritikos H, Komis G, Alexandrakis G, Rakinzaki E, Kouroumalis E. An immunological study of primary biliary cirrhosis in Crete. Mediterranean Medical Congress. Limassol Κύπρος, Νοέμβριος 1996.

9) Diamantis ID, Kouroumalis E, **Koulentaki M**, Fasler E, Schmid P, Buler H, Gyr N, Battegay M. Influence of hepatitis G virus (HGV) on liver disease. 8<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and infectious diseases, Lausanne Switzerland .τον Μάιο 1997. Περίληψη στο Clinical Microbiology and Infection 1997; 3(2):246.

10) Tzanakis N, Samiou M, Bouros D, **Koulendaki M**, Kouroumalis E, Siafakas NM. Small airways in patients with primary biliary cirrhosis. ERS Annual Congress, Berlin Germany, Σεπτέμβριος 1997. Περίληψη στο The European Respiratory Journal 1997;10(25):298s.

11) Oekonomaki H, Alexandrakis G, **Koulentaki M**, Spanoudakis S, Skordilis P, Kouroumalis E. D-Penicillamine administration greatly improves response to interferon in chronic viral hepatitis. 6<sup>th</sup> United European Gastreterology week, Οκτώβριος 1997. Περίληψη στο Gut 1997;41(3):A131.

12) Notas G, Valatas V, Xidakis K, Kouroumalis A, **Koulentaki M**, Kouroumalis E. Circulating endothelin-1 and nitric oxide in Primary biliary cirrhosis. Annual meeting BSG, 23-25 March 1999. **Περίληψη δημοσιευμένη στο Gut** 1999 Suppl 1;vol 44:W242.

13) **M Koulentaki**, T Taylor, J Baxter, J Tait, C R Pennington. Radiological placement of gastrostomy tubes. Annual meeting British Society of Gastroenterology (BSG) 21-23 March 2000. **Περίληψη δημοσιευμένη στο Gut** 2000.

14) J Todd, AC Farquharson, **M Koulentaki**, CR Pennington. Prolongation of QT dispersion in malnourished patients and the effect of nutritional support. ESPEN, Madrid 2000.

15) E Kouroumalis, K Chatzikostas, M Roussomoustakaki, D Drygiannakis, M Niniraki, **M Koulentaki**, M Tzardi. Tissue transglutaminase antibodies and coeliac disease in patients with primary biliary cirrhosis and autoimmune cholangitis. Annual meeting British Society of Gastroenterology (BSG) 18-21 March 2001. **Περίληψη δημοσιευμένη στο Gut** 2001.

#### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΙΑΤΡΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Κ. Ζαμκοτζιάν, **M. Κουλεντάκη**, Ν. Ανδρουλάκης, Μ. Γωνιανάκης, Δ. Γκουζούλη, Γ. Αλδάκος: Υποτροπιάζουσα ορονοσία επί εδάφους Χρονίας Ενεργού Ηπατίτιδος Β. Ελληνική Γαστρεντερολογία 1991 ; 4: 60 (Περίληψη).
2. **M. Κουλεντάκη**, Β. Θεοδωράκη, Κ. Ζαμκοτζιάν, Μ. Γωνιανάκης, Μ. Αλεξανδράκης, Ε. Γανωτάκης, Σ. Κορτσιδάκης. Υποτροπιάζουσα αφθώδης στοματίτις-Είναι πάντοτε μια αθώα πάθηση; Εργασία δημοσιευμένη στα Πρακτικά του 6<sup>ο</sup> Παγκρήτιου Ιατρικού Συνεδρίου 1992, Τόμος Β', σελ:580.
3. Κ. Ζαμκοτζιάν, Γ. Χαιρέτη, Φ. Αθανασάκη, Ν. Ανδρουλάκης, Μ. Αλεξανδράκης, **M. Κουλεντάκη**, Δ. Γκουζούλη: Συγκριτική μελέτη αντιμετώπισης της οξείας αιμορραγίας του ανωτέρου πεπτικού με H<sub>2</sub> Ανταγωνιστές και μικρές δόσεις αντιοξίνων έναντι



μονοθεραπείας με υψηλές δόσεις αντιοξίνων. Εργασία δημοσιευμένη στα Πρακτικά του 6<sup>ο</sup> Παγκρήτιου Ιατρικού Συνεδρίου 1992, Τόμος Β', σελ: 488.

4. Ποταμιάνος Σ, Σκορδίλης Π, Αλεξανδράκης Γ, Ρουσομουστακάκη Μ, Μουζάς Ι, **Κουλεντάκη Μ**, Κουρούμαλης Η, Μανούσος ΟΝ. Σύγκριση αποτελεσματικότητας κηρίων Savary και μπαλονιών TTS δύσκολων στενώσεων οισοφάγου. Ελληνική Γαστρεντερολογία 1995; 8: 18 (Περίληψη).
5. **Κουλεντάκη Μ**, Ποταμιάνος Σ, Αλεξανδράκης Γ, Σκορδίλης Π, Μουζάς Ι, Κουρούμαλης Η, Μανούσος ΟΝ. Συνδιασμένη συντηρητική παρηγορητική θεραπεία ανεγχείρητων καρκίνων οισοφάγου. Ελληνική Γαστρεντερολογία 1996; 9: 11 (Περίληψη).
6. Οικονομάκη Ε, Σκορδίλης Π, Αλεξανδράκης Γ, **Κουλεντάκη Μ**, Κουρούμαλης Η. Συσχέτιση των ιών HBV και HCV με κίρρωση ήπατος, ηπάτωμα (HCC). Ελληνική Γαστρεντερολογία 1996; 9: 66 (Περίληψη).
7. Σκορδίλης Π., Οικονομάκη Ε, Ποταμιάνος Σ, Λεοντίδης Χ, Σπανουδάκης Σ, Μοσχανδρέα Ι, **Κουλεντάκη Μ**, Κουρούμαλης Η, Μανούσος ΟΝ. Σχέση μεγέθους ολισθαίνουσας διαφραγματοκήλης και βαθμού οισοφαγίτιδος. Ελληνική Γαστρεντερολογία 1996; 9: 10 (Περίληψη).
8. **Κουλεντάκη Μ**, Σπανουδάκης Σ, Ματρέλλα Ε, Αλεξανδράκης Γ, Κουρούμαλης Η. Ηπατίτιδα C στην Κρήτη. Τέταρτη Ημερίδα για την ηπατίτιδα C, Αθήνα 1<sup>η</sup> Φεβρουαρίου 1997. Εργασία δημοσιευμένη στο βιβλίο “Ηπατίτιδα C” Στέφανος Χατζηγιάννης, 1997 σελ.177-182.

9. Σ. Σπανουδάκης, **Μ. Κουλεντάκη**, Σ. Σιαφίκος, Ε. Οικονομάκη, Μ. Ψιστάκης, Χ. Λεοντίδης, Γ. Αλεξανδράκης, Η. Κουρούμαλης. Προοδευτική αύξηση συμπτωματικής οξείας ηπατίτιδος Α την τελευταία πενταετία στην Κρήτη. Ελληνική Γαστρεντερολογία 1998; S11: p11 (Περίληψη).
10. Σ. Σπανουδάκης, Σ. Σιαφίκος, Ι. Μουζάς, Π. Σκορδίλης, Ε. Οικονομάκη, **Μ. Κουλεντάκη**, Γ. Αλεξανδράκης, Η. Κουρούμαλης. Ανοχή και αποτελεσματικότητα προετοιμασίας με διάλυμα πολυαιθυλενγλυκόλης για κολονοσκόπηση (προοπτική συγκριτική μελέτη). Ελληνική Γαστρεντερολογία 1998; S11: p52 (Περίληψη).
11. **Μ. Κουλεντάκη**, Ε. Πετεινάκη, Ι. Κουτρομπάκης, Μ. Τζαρδή, Ε. Αναγνωστοπούλου, Ι. Μουζάς, Η. Κουρούμαλης. Συσχέτιση Πρωτοπαθούς Χολικής Κιρρώσεως και ελκώδους κολίτιδος. Ελληνική Γαστρεντερολογία 1998; S11: p64 (Περίληψη).
12. **Μ. Κουλεντάκη**, Ι. Μοσχανδρέα, Κ. Χατζηκώστας, Φ. Δημουλιός, Μ. Τζαρδή, Γ. Κόμης, Η. Κουρούμαλης. Η χορήγηση ουρσοδεοξυχολικού οξέως (UDCA) αυξάνει την επιβίωση ασθενών με πρωτογενή χολική κίρρωση (ΠΧΚ) και αυτοάνοση χολαγγειίτιδα (ΑΧ). Ελληνική Γαστρεντερολογία 2001; S : p (Περίληψη) .
13. **Μ. Κουλεντάκη**. Διάγνωση και θεραπεία του Ηπατονεφρικού Συνδρόμου. Γαστρεντερολογικά Χρονικά. Υπό δημοσίευση

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Lionis C, **Koulentaki M**, Biziagos E, Kouroumalis E. Current prevalence of hepatitis A, B, and C in a well-defined area in rural Crete, Greece. *Journal of Viral Hepatitis* 1997; 4: 55-61.
2. Lionis C, Frangoulis E, **Koulentakis M**, Biziagos E, Kouroumalis E. Prevalence of hepatitis A,B, and C markers in school children of a rural area of Crete, Greece. *European Journal of Epidemiology* 1997; 13: 417-420.
3. Diamantis ID, Kouroumalis E, **Koulentaki M**, Fasler-Kan E, Schmid PA, Hirsch HH, Buhler H, Gyr K, Battegay M. Influence of hepatitis G virus Infection on Liver Disease. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1997; 16: 916-919.
4. M. **Koulentaki** , S. Spanoudakis, E. Kantidaki, P. Drandakis, N. Tzagarakis, E. Biziagos, J. Moschandrea , E.A. Kouroumalis. Prevalence of hepatitis B and C markers in volunteer blood donors in Crete. A five-year study. *Journal of Viral Hepatitis* 1999; 6 (3): 243-48.
5. P.A. Theodoropoulos, H. Polioudaki, **M Koulentaki**, E Kouroumalis, S.D. Georgatos. PBC68: a nuclear pore complex protein that associates reversibly with the mitotic spindle. *Journal of Cell Science* 1999; 112(18): 3049-3059.
6. **Koulentaki M**, Koutroubakis IE, Petinaki E, Tzardi M, Oekonomaki H, Mouzas I, Kouroumalis EA. Ulcerative colitis associated with primary biliary cirrhosis. *Digestive Disease and Science* 1999 Oct; 44(10): 1953-6.

7. IA Mouzas, P Anezinis, S Karampekios, E Matrella, **M Koulentaki**, EA Kouroumalis. Retroperitoneal fibrosis during the course of ulcerative colitis. A simple coincidence? Digest Liver Dis 2001;33:
8. **M Koulentaki**, M Ergazaki, I Moschandrea, S Spanoudakis, N Tzagarakis, P Drandakis, D Spandidos, E A Kouroumalis. Prevalence of hepatitis B and C markers in hospitalized patients in Crete. A five-year study. BMC Public Health, 2001, 1: 17.
9. Samonakis D, Matrella E, **Koulentaki M**, Hatzidakis A, Kouroumalis E. Autoimmune cholangitis progressing to hepatocellular carcinoma, in twin sisters. Digestive Disease and Science 2001, in press.
10. **M Koulentaki**, V Valatas, K Xidakis, A Kouroumalis, E Petinaki, E Castanas<sup>3</sup>, E Kouroumalis. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors in acute viral hepatitis. Journal of Viral Hepatitis 2001, in press.
11. JA Todd, **M Koulentaki**, CAJ Farquharson, CR Pennington. Prolongation of QT dispersion in malnourished patients and the effect of nutritional support. "Nutrition" 2001, in press.
12. **M Koulentaki**, N Reynolds, D Steinke, J Tait, J Baxter, K Vaidya, A Jaysekara, C R Pennington. 8 years experience of endoscopic Gastrostomy in Dundee: Resource allocation and setting benchmarks. Submitted in Endoscopy. February 2001.

## ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΤΡΟΓΓΥΛΕΣ ΤΡΑΠΕΖΕΣ

1. Επιστημονική Εκδήλωση : Παθήσεις πεπτικού σωλήνα –Ήπατος. Νεώτερα δεδομένα.  
Χανιά 20-21 Απριλίου 1996 Θέμα: “Παθήσεις του ήπατος στην Κρήτη”. Συντονιστής:  
Ηλίας Κουρούμαλης. Ομιλία: **Αλκοολική ηπατοπάθεια** .
2. Ιατρική Εταιρία Ρεθύμνου. Πανεπιστήμιο Κρήτης: Ιατρικό Σεμινάριο  
Ρέθυμνο 25 Μαΐου 1996. Θέμα: “Ηπατίτιδες”.  
Συντονιστής: Ορέστης Μανούσος.  
Ομιλία: **Διάγνωση Ηπατιτίδων**
3. Ημερίδα: Ιογενής ηπατίτιδα στο Ανατολικό Αιγαίο. Επιδημιολογία, μέτρα προφύλαξης.  
Σάμος 10-5-1997 Θέμα: “Επιδημιολογία, Μέγεθος του προβλήματος”  
Προεδρείο: Στέφανος Χατζηγιάννης- Εμμανουήλ Κάρλας .  
Ομιλία: **Η ιογενής ηπατίτιδα στην Κρήτη.**
4. 17<sup>0</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Ηράκλειο 29 Οκτωβρίου-2 Νοεμβρίου  
1997. Θέμα: “Το εργαστήριο στην Γαστρεντερολογία. Από την την έρευνα στην κλινική  
πράξη”. Συντονιστής: Ηλίας Κουρούμαλης.  
Ομιλία: **Κλινικά διδάγματα από την μοριακή βιολογία του ιού C.**
5. 4<sup>η</sup> Συνάντηση ΟΜΙΦΕΚ. Ηράκλειο Νοέμβριος 2000.  
Συντονιστής: Η Μπουζάκης. Ομιλία: **ΙΦΕΝ- Θρέψη -Διατροφή**
6. Επιστημονική εκδήλωση «Ηπατίτιδα Β Zeffix». Ηράκλειο 15 Νοεμβρίου 2000.  
Συντονιστής: Η Κουρούμαλης. Ομιλία: **Διαγνωστική προσέγγιση Ηπατίτιδας Β**

7. Στρογγυλή Τράπεζα με Θέμα "Αλκοολισμός. Ένα πρόβλημα σε έξαρση και τρόποι για την πρόληψη του". Διοργάνωση Γραφείο Κοινωνικής Πολιτικής Δήμου Χερσονήσου.  
Ομιλία: **Επιπτώσεις της κατάχρησης του αλκοόλ.**
  
8. Επιστημονική ημερίδα Ιατρικού Συλλόγου Χανίων. Χανιά 23 Ιουνίου 2001. Συντονιστής:  
Η Κουρούμαλης  
Ομιλία: **Νεώτερα Δεδομένα στην θεραπεία των ηπατιτίδων**
  
9. Ημερίδα Γαστρεντερολογικής Κλινικής ΠΕΠΑΓΝΗ. Ιατρικό τμήμα  
Πανεπιστημίου Κρήτης. «Μακροχρόνιος θεραπεία νοσημάτων Πεπτικού. Πότε σταματάμε?» Συντονιστής: Η Κουρούμαλης. Ομιλία: **Χρειάζεται μακροχρόνιος γαστροπροστασία στους λαμβάνοντες αντιφλεγμονώδη?**

#### **ΜΕΛΟΣ ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ**

4<sup>ο</sup> Σεμινάριο Κλινικής Ιατρικής. Θεματικός Κύκλος: «Ιατρική βασιζόμενη στις ενδείξεις».  
Αμφιθέατρο Ιατρικής Σχολής Δημήτρης Εμμανουήλ. Σάββατο 17 Μαρτίου 2001.

**Από την διδακτορική διατριβή ανακοινώθηκαν σε συνέδρια ή δημοσιεύτηκαν σε ιατρικά περιοδικά οι παρακάτω εργασίες:**

1) Γ. Νότας, **Μ. Κουλεντάκη**, Κ. Ξυδάκης, Β. Βαλάτας, Η. Κουρούμαλης. Επίπεδα νιτρικού οξειδίου ορού (NO) σε οξεία ιογενή ηπατίτιδα.

Ανακοίνωση στο 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, 1999.

2) **Μ Κουλεντάκη**, Ε Πετεινάκη, Β Βαλάτας, Ι Μουζάς, Η Καστανάς, Η Κουρούμαλης. Κυτταροκίνες στην οξεία ιογενή ηπατίτιδα.

Ανακοίνωση στο 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο 2001.

3) **Μ Κουλεντάκη**, Β Βαλάτας, Ε Πετεινάκη, Ε Κολυβάκη, Ε Οικονομάκη, Ι Μουζάς, Η Καστανάς, Η Κουρούμαλης. Πρωτείνες οξείας φάσεως στην ιογενή ηπατίτιδα.

Ανακοίνωση στο 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο 2001.

4) Β Βαλάτας, **Μ Κουλεντάκη**, Ι Μουζάς, Η Κουρούμαλης . Μεταλλοπρωτεάσες (MMPs) στην οξεία ιογενή ηπατίτιδα.

Ανακοίνωση στο 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο 2001.

5) **Μ Koulentaki**, V Valatas, K Xidakis, A Kouroumalis, E Petinaki, E Castanas<sup>3</sup>, E Kouroumalis. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors in acute viral hepatitis. Journal of Viral Hepatitis 2001, υπό δημοσίευση.

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## **ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ**

Τα τελευταία χρόνια με την βοήθεια της Ανοσοβιολογίας έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί μία ομάδα διαμεσολαβητικών ουσιών, που συνεργάζονται σε ένα πολύπλοκο δίκτυο συντονισμού διαφόρων κυττάρων και ιστών, με σκοπό την διατήρηση ή την αποκατάσταση της φυσιολογικής ομοιόστασης. Αποτελούν πρωτεϊνικούς αγγελιοφόρους που οργανώνουν την ένταση, το είδος και την διάρκεια της φλεγμονώδους ανοσολογικής απάντησης, μεταφέροντας πληροφορίες διαμέσου και εντός των κυττάρων, συνδεδεμένες με ειδικούς μοριακούς υποδοχείς. Πρόκειται στην πλειονότητα για γλυκοπρωτεΐνες με μοριακό βάρος 5-50 KDa., που ονομάζονται κυτταροκίνες.

Οι κυτταροκίνες με δράση κυρίως αυτοκρινή (στα ίδια τα κύτταρα που τις παράγουν) και παρακρινή (στα γειτονικά τους κύτταρα), ενίοτε ανιχνεύονται και στην κυκλοφορία. Αυτό συμβαίνει είτε όταν η τοπική παραγωγή τους γίνει ενδαγγειακά, είτε όταν η ιστική παραγωγή τους είναι υπερβολική οπότε και διαφεύγουν στην συστηματική κυκλοφορία.

### **ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ**

Η βιολογική δράση των κυτταροκινών επιτυγχάνεται δια μέσου της σύνδεσης τους με ειδικούς υποδοχείς που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων στόχων. Ο αριθμός των υποδοχέων ποικίλει από 100 έως 1000 μόρια υποδοχέων ανά κύτταρο, και είναι αντιστρόφως ανάλογος της εκλεκτικής τους συγγένειας (affinity).

Οι υποδοχείς αποτελούνται από τρία ξεχωριστά δομικά και λειτουργικά τμήματα. Το εξωκυτταρικό τμήμα τους που περιέχει την ειδική περιοχή σύνδεσης για την κυτταροκίνη, το διαμεμβρανικό και το ενδοκυτταρικό τμήμα που βρίσκεται μέσα στο κυτταρόπλασμα (transducing domain). Μετά την σύνδεση της κυτταροκίνης με τον υποδοχέα της το ενδοκυτταρικό τμήμα μεταδίδει το σήμα, ενεργοποιεί γονιδιακούς μηχανισμούς που επάγουν ή αναστέλλουν την σύνθεση ενζύμων.

Όλοι οι υποδοχείς κυτταροκινών δεν αποτελούνται από τα τρία αυτά λειτουργικά τμήματα. Ορισμένοι μπορεί να αποτελούνται από ένα ετεροδιμερές ή ομοδιμερές εξωκυτταρικό τμήμα συνδεδεμένα με δύο διακυττάρια σε ένα ενδοκυτταρικό. Άλλοι αποτελούνται από ένα διαλυτό εξωκυτταρικό τμήμα συνδεδεμένο στο ενδοκυττάριο τμήμα τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι υποδοχείς συνδέονται με περισσότερες από μία κυτταροκίνη, κάτι που ισχύει κυρίως για τις χημειοκίνες. Πράγματι παρότι υπάρχουν περισσότερα από 40 είδη της οικογένειας των χημειοκινών, υπάρχουν μόνον περί τους 15 υποδοχείς, με διασταυρούμενη ειδικότητα (1).

Η παρουσία τους στην επιφάνεια των κυττάρων ρυθμίζεται και από προτεολυτική σχάση από την τάξη των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμελίου ουσίας (matrix metalloproteinases). Η σχάση και η αποβολή (shedding) των υποδοχέων μειώνει την κυτταρική απάντηση στις κυτταροκίνες (2). Ενίοτε το εξωκυτταρικό αποβαλλόμενο τμήμα των υποδοχέων δρα είτε ως αναστολέας είτε ως επαγωγέας της σύνδεσης. Παράδειγμα αναστολής είναι το αποβαλλόμενο εξωκυτταρικό τμήμα του IL-1RII υποδοχέως το οποίο ανταγωνίζεται την βιοενεργότητα της IL-1β συνδεδεμένο μαζί της και εμποδίζοντας την να συνδεθεί με τον υποδοχέα IL-1RI (3). Παράδειγμα επαγωγής είναι της IL-6 με τον διαλυτό της υποδοχέα. Η IL-6 για να μεταδώσει το μήνυμα πρέπει αφού συνδεθεί με τον υποδοχέα της να συνδεθεί και με την πρωτεΐνη gp130. Κύτταρα που δεν διαθέτουν IL-6R ή gp130 δεν απαντούν στην IL-6. Όμως το αποβαλλόμενο εξωκυτταρικό τμήμα του IL-6R συνδέεται με την IL-6 και το σύμπλεγμα τους μπορεί να συνδεθεί με τα κύτταρα που διαθέτουν μόνον gp130 (4). Στην περίπτωση του αποβαλλομένου TNF υποδοχέα συνδεδεμένου με τον TNF-α, το σύμπλεγμα μπορεί να δράσει είτε ως αναστολέας (όταν η συγκέντρωση του διαλυτού υποδοχέα είναι μεγάλη) είτε ως επαγωγέας (όταν η συγκέντρωση του TNF-α είναι χαμηλή) (5,6,7).

Οι κυτταροκίνες χωρίζονται σε πέντε ομάδες.

A. Ιντερλευκίνες (πχ IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12)

B. Ιντερφερόνες (INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , INF- $\gamma$ )

Γ. Παράγοντες νέκρωσης των όγκων (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ )

Δ. Αυξητικοί παράγοντες (πχ G-CSF, M-CSF, GM-CSF, TGF- $\beta$ ..)

E. Χημειοκίνες (πχ MCP-1, MIP-1, IL-8, PF-4...)

## **A. ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΕΣ**

### **ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-1 (IL-1)**

Αποτελεί μία οικογένεια, τα τρία γνωστά μέλη της οποίας είναι: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA (IL-1 receptor antagonist). Μεταξύ τους παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες. Οι IL-1 $\alpha$  και IL-1 $\beta$  αποτελούν ισχυρούς διεγέρτες, που επάγουν βιολογικές απαντήσεις σε έναν μεγάλο αριθμό κυττάρων. Η IL-1RA, αναστέλλει τις δράσεις των δύο διεγερτών ανταγωνιζόμενη τον κοινό τους υποδοχέα (IL-1RI) επί της κυτταρικής επιφάνειας έχοντας γι' αυτόν μεγαλύτερη συγγένεια από ότι οι IL-1 $\alpha$  και IL-1 $\beta$  (8). Συνδέονται με δύο υποδοχείς, τον υποδοχέα τύπου ένα (IL-1RI) και τον υποδοχέα τύπου 2 (IL-1RII). Ο IL-1RI συνδεόμενος με την IL-1 $\alpha$  και την IL-1 $\beta$  μεταδίδει το μήνυμα ενδοκυτταρίως (signal transduction). Ο IL-1RII συνδέεται με μεγαλύτερη συγγένεια με την IL-1 $\beta$  κατόπιν με την IL-1 $\alpha$  και τέλος με την IL-1Ra αλλά σε καμία περίπτωση δεν μεταδίδει το μήνυμα ενδοκυτταρίως. Η διαλυτή μορφή του υποδοχέα IL-1RII συνδεόμενη με την IL-1 $\beta$ , την εμποδίζει να συνδεθεί με τον υποδοχέα IL-1RI αναστέλλοντας έτσι την βιολογική της δράση. Η διαλυτή μορφή του υποδοχέα IL-1RI συνδέεται κυρίως με την IL-1Ra πριν προλάβει να συνδεθεί με την IL-1 $\alpha$  (9).

Η IL-1 $\alpha$  ανευρίσκεται συνδεδεμένη επάνω στην πλασματική μεμβράνη αλλά κυρίως μέσα στο κυτταρόπλασμα αρκετών κυττάρων, κυρίως μονοκυττάρων και B λεμφοκυττάρων (10).

Αντιθέτως η IL-1 $\beta$ , απελευθερώνεται από τα κύτταρα ανενεργός και ενεργοποιείται μετά από

πρωτεολυτική επεξεργασία (10,11). Τέλος η IL-1RA, παράγεται ως ενδοκυττάριος αλλά και ως εκκριτική μορφή (8).

Τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος είναι η κύρια πηγή παραγωγής της IL-1 και της IL-1β πρωτεάσης συνολικά. Κατά την διάρκεια της ωρίμανσης των μονοκυττάρων προς μακροφάγα προοδευτικά χάνεται η ικανότητα παραγωγής της. Τα εξειδικευμένα ιστικά μακροφάγα όπως κυψελιδικά μακροφάγα, τα μακροφάγα του περιτοναίου, τα κύτταρα του Kupffer και τα μακροφάγα του αρθρικού υμένα, όλα παράγουν IL-1, αλλά σε ποσότητα περίπου 10 φορές μικρότερη από ότι τα μονοκύτταρα (12,13). Τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα B, λεμφοκύτταρα T helper, τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK), πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα επίσης παράγουν IL-1 αλλά σε μικρότερο βαθμό και κυρίως IL-1α. Η παραγωγή της IL-1 ρυθμίζεται από μία πλειάδα ερεθισμάτων υπεύθυνων για την αύξηση ή μείωση της (13) όπως αναφέρονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1

Ερεθίσματα για την αύξηση και την μείωση της IL-1

Επαγωγικά ερεθίσματα	Ανασταλτικά ερεθίσματα
Επαφή μονοκυττάρων σε επιφάνεια	TGF-β
IL-1, TNF-α, TNF-β, INFγ, GM-CSF	IL-2, INF-γ
Ισχαιμία	Δεξαμεθαζόνη
Παράγων C5a του συμπληρώματος	Πρεδνιζολόνη
Θρομβίνη	Προσταγλανδίνη E2
Μιτογόνα (phorbol esters)	Ρετινοϊκό οξύ
Βραδυκίνη, Λευκοτριένια	
Particulates (urate crystals, silica, zymosan, caraageenan)	
Το τμήμα Fc των ανοσοσφαιρινών	
Ανοσοσυμπλέγματα	
Ιοί (κυτταρομεγαλοϊός, poxviruses)	
Βακτηριδιακές τοξίνες, λιπίδιο A,	

---

Λιποπολυσακχαρίτες της κάψας των Gram (-) βακτηριδίων

(LPS)

Χρυσίζων σταφυλόκοκκος

Υπεριώδης ακτινοβολία

Ιοντοφόρες

---

Η IL-1, θεωρείται ως ο σπουδαιότερος φλεγμονώδης διαμεσολαβητής. Η δράση των κυττάρων που λαμβάνουν μέρος στη μη ειδική αρχική αρχέγονη ανοσολογική απάντηση (innate immune response) ρυθμίζεται εν μέρει από την δράση της. Δρα τοπικά όσο και συστηματικά.

#### Τοπική Φλεγμονώδης Δράση

Η IL-1 προσκαλεί κύτταρα στην περιοχή της φλεγμονής και επάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών ουσιών. Αποτελεί συν-μιτογόνο των ενεργοποιημένων B και T λεμφοκυττάρων της ομάδος των TH2 (λεμφοκύτταρα T-helper που παράγουν κυρίως IL-4, IL-6, IL-10). Τα κύτταρα αυτά φέρουν στην επιφάνεια τους υποδοχείς για την IL-1 (IL-1R) και φαίνεται ότι πολλαπλασιάζονται και απαντούν στην IL-4 εντονότερα εάν συνυπάρχει IL-1 (14). Αντίθετα δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην λειτουργία των B λεμφοκυττάρων (15,16). Στα NK κύτταρα η IL-1 προκαλεί in vitro αύξηση της κυτταροκτόνου δράσης τους στα κύτταρα στόχο (κύτταρα με ιικά ή καρκινικά αντιγόνα) διαμέσου αύξησης της επίδρασης των κυτταροκινών IL-2 και INF-γ. Θεωρείται επίσης αυξητικός παράγων των λευκοκυττάρων λόγω της δράσης της στην παραγωγή ή/και επαγωγή παραγωγής των αυξητικών παραγόντων M-CSF, G-CSF, GM-CSF (13).

#### Συστηματική Φλεγμονώδης Δράση

Συστηματικά, σημαντική είναι η δράση της IL-1 επί:

- Του ήπατος
- Των αγγείων
- Του κεντρικού νευρικού συστήματος.

### *Ήπαρ*

Δρα στα ηπατοκύτταρα επάγοντας την παραγωγή των πρωτεϊνών της οξειάς φάσεως. Η δράση αυτή πραγματοποιείται εν μέρει από την ίδια και εν μέρει από την IL-6 που επίσης η ίδια επάγει (17). Σαν αποτέλεσμα :

Αυξάνεται η ηπατοκυτταρική παραγωγή σε: Αμυλοειδές Α, ινωδογόνο, παράγοντα Β, μεταλλοθειονίνες, παράγοντες πήξης, παράγοντες του συμπληρώματος, IL-6, επαγωγίμη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS)

Μειώνεται η παραγωγή αλβουμίνης, τρανσφαιρίνης, λιποπρωτεϊνικής λιπάσης.

### *Αγγεία*

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, παράγουν IL-1β μετά από επαγωγή από θρομβίνη, LPS, IL-1. Στην IL-1 τα ενδοθηλιακά κύτταρα απαντούν παράγοντας IL-6, IL-8, χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων (MCP), μόρια προσκολλησεως (ICAM-1) και E-σελεκτίνες (13) ουσίες υπεύθυνες αφ' ενός για την χημειοταξία και ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, Β και Τ λεμφοκύτταρα) αφ' ετέρου για την αύξηση της προσκόλλησης τους στο ενδοθήλιο. Επίσης δια μέσου της παραγωγής προσταγλανδινών (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) και παραγόντων ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) παρατηρείται αύξηση της πηκτικότητας (18). Ενδοφλέβια έγχυση IL-1 αναπαράγει την συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση που παρατηρείται στο σηπτικό σοκ: υπόταση, οξέωση, μειωμένη αιματική ροή, πολυοργανική ανεπάρκεια και θάνατος. Η απελευθέρωση NO και προσταγλανδινών, θεωρούνται υπεύθυνοι της παρατηρούμενης υπότασης. Η αντίδραση αυτή αυξάνεται από την ταυτόχρονη χορήγηση TNF (19).

Αγγειακές λείες μυϊκές ίνες, παράγουν και απαντούν στην IL-1 όπως και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σε απάντηση στην IL-1, παρατηρείται χάλαση των αγγειακών λείων μυϊκών ινών που δεν οφείλεται στην παραγωγή προσταγλανδινών (παρ' ότι παράγονται PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) αλλά σε επαγωγή της δράσης της iNOS με ταυτόχρονη αύξηση της παραγωγής του NO (20).

### *Κεντρικό Νευρικό Σύστημα*

Ανοσοιστοχημικές χρώσεις ανθρώπινου εγκεφαλικού ιστού ανέδειξαν ότι οι *νευρώνες του υποθαλάμου* παράγουν IL-1β (21). Γνωστή από νωρίς είναι η πυρετογόνος δράση της IL-1.

Η IL-1 διεγείρει επίσης τον *άξονα υποθάλαμο-υπόφυση-επινεφρίδια*, να παράγει βιοενεργά νευροπεπτίδια τοπικά και στην συστηματική κυκλοφορία (corticotrophin releasing factor CRF, adrenocorticotropin-releasing hormone ACTH, γλυκοκορτικοειδή, ενδορφίνες βασοπρεσσίνη, σωματοστατίνη), ενώ τα κορτικοστεροειδή αναστέλλουν την παραγωγή της IL-1. Είναι πιθανόν ο κύκλος αυτός να αποτελεί ένα σημαντικό αρνητικό μηχανισμό ανάδρασης (feed-back) μεταξύ του ανοσοποιητικού και του νευροενδοκρινικού συστήματος με σκοπό τον έλεγχο της παραγωγής της IL-1 (22,23).

### *Λοιπές Βιολογικές Δράσεις*

*-Η μικρογλοία και τα αστροκύτταρα* παράγουν IL-1 μετά από διέγερση με LPS ή INF-γ. Σε οξείες εγκεφαλικές βλάβες, τα πρώτα κύτταρα που φθάνουν στην περιοχή της βλάβης είναι τα μικρογλοιακά, που με την παραγωγή IL-1 διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των γειτονικών αστροκυττάρων. Αυτά με την σειρά τους παράγουν IL-1, που με αυτοκρινή μηχανισμό συμμετέχει στην ανάπτυξη τους και στην περαιτέρω παραγωγή κυτταροκινών (IL-6, TNF, GM-CSF, G-CSF), μορίων προσκολλητικότητας (ICAM-1) καθώς και φλεγμονωδών διαμεταβιβαστών (24).

*-Ινοβλάστες και χονδροκύτταρα:* Με πολύ ευαίσθητες τεχνικές (PCR) έχουν αναδειχθεί πολύ μικρές ποσότητες IL-1β στους ινοβλάστες, ενώ σημαντική πηγή παραγωγής IL-1 στους αρθρικούς χόνδρους είναι τα χονδροκύτταρα (13). Η IL-1 επάγει τον πολλαπλασιασμό των αρθρικών ινοβλαστών και των οστεοκλαστικών κυττάρων. Επάγει την παραγωγή φλεγμονωδών μεταβιβαστών (PGE2, ενεργοποιητή του πλασμινογόνου) και ειδικών πρωτεϊνών (κολλαγενάση, στρωμελυσίνη) από τα χονδροκύτταρα και τους αρθρικούς ινοβλάστες. Διαμέσου όλων αυτών των μεταβολικών διεργασιών διαδραματίζει σαφώς σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ακεραιότητας των οστών και χόνδρων. Πολλές μελέτες εμπλέκουν την IL-1 στην παθογένεια της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Είναι γνωστό ότι ασθενείς με Ρευματοειδή αρθρίτιδα έχουν αυξημένα επίπεδα IL-1 στον ορό (25).



Υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν ότι η ενδοφλέβια χορήγηση IL-1β-εξουδετερωτικών αντισωμάτων ή IL-1Ra, ουσίες με ισχυρή δράση αναστολής της IL-1, μειώνουν την ένταση και την καταστροφική φύση της ασθένειας σε πειραματόζωα (26).

-Τα κερατινοκύτταρα και οι δερματικοί ινοβλάστες παράγουν αλλά δεν εκκρίνουν συστηματικά IL-1β. Πιθανώς ως πρώτη γραμμή άμυνας μετά από τραυματική βλάβη του δέρματος ή μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, η τοπική παραγωγή IL-1 έχει σκοπό την κλήση ουδετερόφιλων στην περιοχή (13,14).

Η IL-1 διαδραματίζει επίσης ρόλο στην φυσιολογική εγκυμοσύνη και στον πρόωρο τοκετό (13). Συστηματική χορήγηση IL-1 στο άνθρωπο προκαλεί απελευθέρωση IL-6, νευροπεπτιδίων και εμφάνιση πυρετού, υπνηλίας, ανορεξίας, κακουχίας, υπότασης, μυαλγίας, κεφαλαλγίας (10, 27).

## **ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-2 (IL-2)**

Η IL-2 θεωρείται ο σημαντικότερος αυξητικός παράγων των T λεμφοκυττάρων καθώς και ο σπουδαιότερος τροποποιητής της δράσης τους, με ως εκ τούτου, πρωταγωνιστικό ρόλο στην δευτερογενή κυτταρική ανοσία. Παράγεται από ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα (CD4+ και CD8+) και ενεργοποιημένα μεγάλα κοκκιοκύτταρα (NK, LAK) 4-12 ώρες μετά την ενεργοποίησή τους. Γνωστά in vitro και in vivo ερεθίσματα για την αύξηση ή μείωση της IL-2 περιγράφονται στον πίνακα 2 (28).

Πίνακας 2

Ερεθίσματα για την αύξηση και την μείωση της IL-2

ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΑ		ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΑ	
In vitro	In vivo	In vitro	In vivo
Μιτογόνα (phorbol esters)	Μονοκλωνική γαμμοπάθεια	Anti-CD2 Ab	AIDS
Ag από APC	Εγκυμοσύνη	Υδροκορτιζόνη	Γήρας

Ca ιοντοφόρηση	Πρεεκλαμψία	Προσταγλανδίνες	Σ. Sjogren
Ab CD28, Ab CD2	Συστηματική σκλήρυνση	FK-506	Ρευματοειδής Αρθρίτις
IL-1, IL-2, IL-7	Σκληροδερμία	Κυκλοσπορίνη	Σχιζοφρένια
A,B εντεροτοξίνες	Συστηματικός ερυθματώδης λύκος	c-AMP	Συστηματικός ερυθματώδης λύκος
Σταφυλοκόκκου	Σαρκοείδωση	1,26 OH D3	
Diacyl glycerol	Πολλαπλούν μύελωμα		
Ινδομεθακίνη, Σιμετιδίνη, Σιπροφλοξασίνη			

Η δράση της IL-2 γίνεται με την σύνδεση της επί του υποδοχέα της IL-2R, στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων.

Η IL-2 επάγει την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου των *T- λεμφοκυττάρων* (βοηθητικών και κυτταροτοξικών), ενεργοποιεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους, διεγείρει την κυτταροτοξική τους δράση και την παραγωγή κυτταροκινών όπως IL-2 και INF- $\gamma$ .

Στα *μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα* (NK και LAK) έχει παρόμοια δράση, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό, διεγείροντας την δράση τους ως φυσικούς φονείς επί των καρκινικών και των ιικά μολυσμένων κυττάρων (29). Επίσης αυξάνει την παραγωγή τους σε κυτταροκίνες (INF- $\gamma$ ) σε συνεργασία με τον TNF- $\alpha$ . Η δραστηριότητα της IL-2 επί των μεγάλων λεμφοκυττάρων επηρεάζεται από την IL-4.

Τα *μονοκύτταρα* έχουν υποδοχείς για την IL-2, με αποτέλεσμα την μετατροπή τους σε μακροφάγα και την αύξηση της φαγοκυτταρικής τους δράσης και την παραγωγή IL-1 και TNF- $\alpha$  (30).

Διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των *ενεργοποιημένων B-λεμφοκυττάρων* και την σύνθεση αντισωμάτων (31).

Τέλος επάγει τον πολλαπλασιασμό των *γλοιικών κυττάρων* και την παραγωγή μυελινικής κατιονικής πρωτεΐνης.

Για τις δράσεις της επί των μεγάλων κοκκιωδών λεμφοκυττάρων έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες ανθρωπίνων καρκίνων όπως το μεταστατικό μελάνωμα. Ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και στο AIDS για την αύξηση των CD4+ T λεμφοκυττάρων.

#### **ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-4 (IL-4)**

Αρχικά αναγνωρίστηκε σαν παράγων ανάπτυξης των B λεμφοκυττάρων, σήμερα γνωστή σαν η κυτταροκίνη της απάντησης  $T_H2$ . Παράγεται κυρίως από T κύτταρα (CD4+, CD8+), λιγότερο από μαστοκύτταρα και βασεόφιλα. Ομοιάζει κατά 40% σε μία άλλη αντιφλεγμονώδη κυτταροκίνη την IL-13. Γνωστά *in vitro* και *in vivo* ερεθίσματα για την αύξηση ή μείωση της IL-4 περιγράφονται στον πίνακα 3 (32).

Πίνακας 3

Ερεθίσματα για την αύξηση και την μείωση της IL-4

Επαγωγικά Ερεθίσματα	Ανασταλτικά Ερεθίσματα
Αντιγόνα που παρουσιάζονται από τα APC	TGF-β
Μιτογόνες λεκτίνες (PHA, Con A, PWM)	Κυκλοσπορίνη A
IL-2, IL-4	
PAF	

Η IL-4 είναι μία αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη που:

- Καταστέλλει την οδό ενεργοποίησης της IL-2 σε επίπεδο της μετάδοσης του μηνύματος ενδοκυττάρια
- μειώνει την γονιδιακή έκφραση και παραγωγή της IL-1, IL-6, TNF-α και INF-γ από τα μονοκύτταρα και
- μειώνει την παραγωγή των TNF-α και TNF-β από τα T λεμφοκύτταρα (33)
- επικουρικά αυξάνει την έκφραση της IL-1Rα (34).

Έχει συνδεθεί η αυξημένη παραγωγή της με αυξημένα επίπεδα IgE. Παρά τις σημαντικές αντιφλεγμονώδεις βιολογικές της δράσεις in vivo, η συστηματική χορήγηση της σε ανθρώπους προκάλεσε ανεξήγητη εμφάνιση κεφαλαλγίας, γριπώδους συνδρομής, πυρετού, αύξησης κρεατινίνης ορού και καρδιαγγειακών συμπτωμάτων.

### **INTEΡΛΕΥΚΙΝΗ-6 (IL-6)**

Παλαιές ονομασίες της είναι BSF-2, INF-b2, 26-kDa, hepatocyte stimulating factor, macrophage granulocyte-inducing protein-2, cytotoxic T-cell differentiation factor, thrombopoietin, hybridoma/plasmocytoma growth factor.

Παράγεται από πλειάδα κυττάρων. Τα T και B λεμφοκύτταρα την παράγουν μετά από συγκεκριμένα ερεθίσματα. Μονοκύτταρα, ινοβλάστες, στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών, μεσαγγειακά κύτταρα, κερατινοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα την παράγουν σε in vitro κυτταρικές καλλιέργειες χωρίς κανένα ερέθισμα. Παράγεται επίσης από καρκινικά κύτταρα (καρδιακού μυξώματος, καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, κύτταρα μυελώματος...), καθώς και κυτταρικές σειρές (TCL-Na1, CeSS, U937...). Επαγωγικά και ανασταλτικά ερεθίσματα για την παραγωγή της IL-6 περιγράφονται στον πίνακα 4 (35).

Πίνακας 4

#### Ερεθίσματα για την αύξηση και την μείωση της IL-6

Επαγωγικά ερεθίσματα	Ανασταλτικά ερεθίσματα
IL-1, TNF-α, INF-β*	Δεξαμεθαζόνη*#
Κυκλοεξιμίδη*	
LPS*#	
Ιοί*#	
PHA \$	

(\*παραγωγή από ινοβλάστες, #παραγωγή από μονοκύτταρα, \$παραγωγή από T-λεμφοκύτταρα)

Δρα συνδεδεμένη με τον κυτταρικό της υποδοχέα IL-6R και την πρωτεΐνη gp130 είτε με τον διαλυτό της υποδοχέα sIL-6R και την πρωτεΐνη gp130 σε ιστούς που δεν εκφράζουν τον κυτταρικό της υποδοχέα. Διαθέτει πολλαπλές βιολογικές ιδιότητες που χωρίζονται σε δύο κυρίως ομάδες: αυτές που εμπλέκονται στην ρύθμιση του αιμοποιητικού συστήματος και αυτές που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της αρχέγονης ανοσολογικής απάντησης (36).

Στην πρώτη κατηγορία αναφέρονται:

- επαγωγή της παραγωγής ανοσοσφαιρινών από τα Β-λεμφοκύτταρα
- πολλαπλασιασμός των αιμοποιητικών και μεγακαρυοκυτταρικών προγεννητόρων
- πολλαπλασιασμός των Τ-λεμφοκυττάρων και διαφοροποίηση τους σε Τ κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα
- πολλαπλασιασμός των κυττάρων πλασματοκυττώματος και μυελώματος.

Στην δεύτερη κατηγορία ανήκει κυρίως η επαγωγή της ηπατικής παραγωγής πρωτεϊνών οξείας φάσεως και η απάντηση καχεξίας σε οξέα φλεγμονώδη ερεθίσματα (37).

Απελευθερώνεται ταχέως στην κυκλοφορία σε περιπτώσεις φλεγμονής (38), εγκαυμάτων (39,40), βακτηριακής λοίμωξης (41). Επίσης δρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα αυξάνοντας την παραγωγή corticotropin releasing factor, και είναι πυρετογόνος (42,43). Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η δράση της καταστολής (negative feed back) της έκφρασης των IL-1 και TNF- $\alpha$  που από την πλευρά τους είναι ισχυροί επαγωγείς της έκφρασης της IL-6. Όντως χορήγηση σε ποντίκια IL-6 εξασφαλίζει την επιβίωσή τους από θανατηφόρο ενδοτοξιναιμία και μειώνει την συστηματική απάντηση στον TNF- $\alpha$  (44,45). Κατέχει δηλαδή η IL-6 χαρακτηριστικά προ- και αντι-φλεγμονώδους κυτταροκίνης.

### **ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-7 (IL-7)**

Η IL-7 θεωρείται παράγων ανάπτυξης των λεμφοκυττάρων και κυρίως των  $\gamma$ - $\delta$  θετικών. Μελέτες στους ποντικούς στους οποίους αφαιρέθηκαν τα γονίδια για τις κυτταροκίνες IL-2, IL-4, και IL-10 απέδειξαν ότι αυτές δεν είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των Β και Τ λεμφοκυττάρων. Αντίθετα σε ποντίκια με έλλειψη της IL-7, η ανάπτυξη των Β και Τ

λεμφοκυττάρων είναι σοβαρά επηρεασμένη. Πάντως αγγελιοφόρο RNA για την μεταγραφή και μετάφραση (m-RNA) της IL-7 έχει βρεθεί σε πολλούς ιστούς, σε όλα τα ανοσολογικά κύτταρα, στα επιθηλιακά κύτταρα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στους ινοβλάστες, στα ηπατοκύτταρα και στους νευρώνες του εγκεφάλου (46).

### **INTEΡΛΕΥΚΙΝΗ-10 (IL-10)**

Αρχική της ονομασία ήταν «ανασταλτικός παράγων παραγωγής κυτταροκινών». Παράγεται από τα T<sub>H2</sub> τύπου λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα. Η κυκλοσπορίνη αναστέλλει την παραγωγή της από τα T-λεμφοκύτταρα αλλά όχι από τα μονοκύτταρα. Αποτελεί αντιφλεγμονώδη κυτταροκίνη. Ο υποδοχέας της IL-10R ανήκει στην οικογένεια υποδοχέων της ιντερφερόνης.

Η ιική IL-10 και των θηλαστικών αναστέλλει την γονιδιακή έκφραση και σύνθεση (47):

- των κυτταροκινών από τα T<sub>H1</sub> τύπου λεμφοκύτταρα (INF- $\gamma$  , IL-2, GM-CSF, TNF- $\alpha$ )
- των προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μακροφάγα (IL-1, TNF- $\alpha$  , IL-6, IL-8, IL-12)
- των αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων GM-CSF, G-CSF, M-CSF
- των χημειοκινών (chemokines) MIP-1 , RANTES
- την ίδια την IL-10
- την σύνθεση NO, γελλατινάσης και κολλαγενάσης
- καταστέλλει την λειτουργία των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APC).

Ποντίκια που δεν παράγουν IL-10 αυτόματα παρουσιάζουν αναιμία, νεκρωτική εντεροκολίτιδα, απώλεια βάρους και πεθαίνουν. Η εξέλιξη αυτή αναχαιτίζεται με αγωγή με εξουδετερωτικά αντισώματα για τις INF- $\gamma$  και TNF- $\alpha$  (47). Απόδειξη ότι η IL-10 είναι καθοριστική κυτταροκίνη στην ισορροπία των προφλεγμονωδών κυτταροκινών που παράγονται από την επίδραση της εντερικής χλωρίδας στα εντερικά μονοκύτταρα.

### **INTEΡΛΕΥΚΙΝΗ-11 (IL-11)**

Η IL-11 αποτελεί ένα αυξητικό παράγοντα για την αύξηση των αιμοπεταλίων καθώς και μία αντι-φλεγμονώδη κυτταροκίνη. Η αντι-φλεγμονώδης δράση της έχει αναφερθεί στην ρευματοειδή αρθρίτιδα (48). Η παρουσία της στο αρθρικό υγρό ασθενών με ενεργή ρευματοειδή αρθρίτιδα θεωρείται ότι καταστέλλει την παραγωγή TNF- $\alpha$  (49).

Σύγκριση της IL-11 με την IL-6 αποκαλύπτει ότι παρά το ότι οι δύο κυτταροκίνες μοιράζονται τους ενδοκυτταρικούς οδούς μετάδοσης του σήματος, η IL-11 δεν προκαλεί πυρετό, ενώ η IL-6 είναι έντονα πυρετογόνος (48). Και οι δύο πάντως καταστέλλουν την γονιδιακή έκφραση του TNF- $\alpha$  και της IL-1 $\beta$  και την *in vitro* και *in vivo* σύνθεση τους (50,51).

Η αναστολή του παράγοντα NF-kB έχει αποδειχθεί ως μηχανισμός της αντι-φλεγμονώδους δράσεως της IL-11. Σε ασθενείς με καρκίνο, ή στοματίτιδα μετά από χημειοθεραπεία η/και ακτινοθεραπεία θεωρείται ως αποτέλεσμα της δράσης των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών με τα κύτταρα του στοματικού βλεννογόνου. Η IL-11 φαίνεται ότι μειώνει τη στοματίτιδα, πιθανόν διαμέσου της καταστολής παραγωγής των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (51,52). Σε μοντέλα ιδιοπαθούς φλεγμονώδους εντερικής νόσου έχει επίσης αποδειχθεί ότι η IL-11 μειώνει την βαρύτητα της νόσου, εν μέρει λόγω της αντι-φλεγμονώδους της δράσης και εν μέρει λόγω της επίδρασης της στη διατήρηση των επιθηλιακών κυττάρων (51).

## **ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-12 (IL-12)**

Παράγεται από διεγερμένα μονοκύτταρα και μακροφάγα και είναι ισχυρός επαγωγέας των T-λεμφοκυττάρων. Αποτελεί την κλασική T<sub>H</sub>1 κυτταροκίνη. Ο υποδοχέας της IL-12R είναι ένα διμερές σύμπλεγμα συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη gp130 της οικογένειας της IL-6.

Φλεγμονώδης κυτταροκίνη, ισχυρός επαγωγέας της TNF- $\alpha$  και της INF- $\gamma$ . Για την επαγωγή της δεύτερης είναι απαραίτητη η IL-18, η οποία εκφράζεται ανενεργός σε πολλά κύτταρα αλλά ειδικά στα μακροφάγα και στα μονοκύτταρα (53).

### **INTEΡΛΕΥΚΙΝΗ-13 (IL-13)**

Η IL-13 έχει στενές ομοιότητες με την IL-4 όσον αφορά την βιολογία και τους υποδοχείς της. Μετά την σύνδεση της με τον υποδοχέα της προκαλεί καταστολή διαφόρων επαγωγίμων γονιδίων (inducible genes) που κωδικοποιούν ουσίες όπως οι προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και η iNOS. Μοναδικό εύρημα για την IL-13 είναι ότι ο υποδοχέας της εκφράζεται μόνον στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων, μονοκυττάρων και μακροφάγων αλλά όχι στην επιφάνεια των Τ λεμφοκυττάρων (54).

### **INTEΡΛΕΥΚΙΝΗ-15 (IL-15)**

Η IL-15 ομοιάζει με την IL-2 κυρίως ως προς την τρισδιάστατη στερεοδομή τους. Σε αντίθεση όμως με την IL-2 η IL-15 παράγεται και από μια πλειάδα μη-Τ λεμφοκυττάρων , όπως: μονοκύτταρα, ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα (55).

Η IL-15 μπορεί να αντικαταστήσει την IL-2 στην δράση της για την δημιουργία των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων, ενεργοποίηση των μονοκυττάρων, πολλαπλασιασμό των LAK κυττάρων, Τ λεμφοκυττάρων, και NK κυττάρων. Η IL-15 συνεργάζεται με την IL-2 για την επαγωγή παραγωγής IFN-γ και TNF-α. Όντως αρκετές από τις βιολογικές δράσεις της IL-15 στα Τ λεμφοκύτταρα οφείλονται στην επαγωγή της IFN-γ. Όπως και η IL-2, η IL-15 αναστέλλει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) . Τα CD34+ αιμοποιητικά προγεννητικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται με την παρουσία IL-15 (55).

Άλλες δράσεις της IL-15 που δεν μοιράζονται με την IL-2 είναι:

Ενεργοποίηση ουδετεροφίλων

Αυξημένο πολλαπλασιασμό μαστοκυττάρων και

Αυξημένη σύνθεση βαρέων αλύσεων μυοσίνης τόσο σε καλλιέργειες όσο και σε μονήρεις μυοινοβλαστες.



### **INTEΡΛΕΥΚΙΝΗ-16 (IL-16)**

Η IL-16 αποτελεί χημειοτακτικό παράγοντα για τα CD4 + T λεμφοκύτταρα, για ηωσινόφιλα και μονοκύτταρα. Αρχικά περιγράφηκε ως παράγωγο των CD8+ T λεμφοκυττάρων, παράγεται όμως και από ηωσινόφιλα και βρογχικό επιθήλιο (56).

### **INTEΡΛΕΥΚΙΝΗ-17 (IL-17)**

Παραγόμενη από T-λεμφοκύτταρα έχει ως κύτταρα στόχο μία πλειάδα κυττάρων και θεωρείται προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη. Από 34 T-λεμφοκυτταρικούς κλώνους που απομονώθηκαν από αρθρικούς υμένες ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα σχεδόν όλοι οι T<sub>H</sub>1 και T<sub>H</sub>0 κλώνοι παρήγαγαν IL-17, ενώ κανείς από τους T<sub>H</sub>2 κλώνους δεν την παρήγαγε (57). Το mRNA της IL-17R είναι παρόν σε σχεδόν όλα τα κύτταρα. Η IL-17 επάγει την σύνθεση PGE<sub>2</sub>, iNOS, και χημειοκινών. Σε επώαση με προγεννήτορες των οστεοκλαστών και οστεοβλαστών η IL-17 επάγει οστεοκλαστογένεση (58). Η IL-17 επάγει την παραγωγή χημειοκινών από διάφορα κύτταρα. Δρα σε συνέργεια με την IL-1β για την ενεργοποίηση του NF-κB (59).

### **INTEΡΛΕΥΚΙΝΗ-18 (IL-18)**

Η IL-18 περιγράφηκε αρχικά ως παράγων που επάγει την IFN-γ (60). Το 1995 απομονώθηκε από ομογενοποίημα ήπατος ποντικού, δημοσιεύτηκε η αμινοξική του ακολουθία και κλωνοποιήθηκε (61). Παράγεται από μονοκύτταρα/μακροφάγα. Η IL-18 δεν επάγει απευθείας αλλά ως συν-επαγωγό με την IL-12 ή/και την IL-2 την παραγωγή IFN-γ σε ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα (62) και την επαγωγή των T<sub>H</sub>1 κυτταροκινών (63). Η IL-18 επάγει επίσης την παραγωγή TNF-α και Fas ligand (64).

## **B. ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΕΣ**

### **ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗ-α (INF-α)**

Παράγεται από λευκοκύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιούς. Κωδικοποιείται από περίπου 20 γονίδια που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 9. Μετά την απελευθέρωση της από τα μολυσμένα κύτταρα ενεργοποιεί στα γειτονικά κύτταρα αντι-ϊικούς μηχανισμούς αυξάνοντας έτσι την αντίσταση τους στην ιική μόλυνση. Η αντι-ϊική της δράση επιτυγχάνεται διαμέσου της ενεργοποίησης δύο γονιδιακών μηχανισμών που επάγουν την σύνθεση ενζύμων με αποτέλεσμα αφ' ενός την καταστροφή του ιικού m-RNA (2,5 ολιγοαδενιλική συνθετάση), αφ' ετέρου την αναστολή της ιικής πρωτεϊνικής σύνθεσης (πρωτεϊνική κινάση). Επίσης έχει αντι-νεοπλασματική δράση την οποία ασκεί διαμέσου κυτταρόστασης και αύξησης της έκφρασης των MHC I στα νεοπλασματικά κύτταρα. Χρησιμοποιείται με επιτυχία στις ηπατίτιδες HBV και HCV Έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην λευχαιμία εκ τριχωτών κυττάρων (65).

### **ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗ-β (INF-β)**

Παράγεται από τους ινοβλάστες μετά από ιικές λοιμώξεις. Κωδικοποιείται από ένα γονίδιο του χρωμοσώματος 9. Η αντι-ϊική της δράση είναι μικρότερη από εκείνη της INF-α.

### **ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗ-γ (INF-γ)**

Γνωστή και με τα ονόματα, ιντερφερόνη τύπου II, MAF, TRF. Παράγεται από τα T-λεμφοκύτταρα του τύπου T<sub>H</sub>1 και τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK). Η παραγωγή της επάγεται από: αντιγόνα, μιτογόνα, σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη B, άλλες κυτταροκίνες κυρίως IL-2 και IL-18. Αναστέλλεται από: 1<sup>α</sup>, 25 διυδροξύβιταμίνη D3, δεξαμεθαζόνη, κυκλοσπορίνη.

#### In Vitro Βιολογικές Δράσεις (66)

- Αντι-ϊική δράση
- Καταστολή του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων

- Επαγωγή των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξεως I (MHC I)
- Επαγωγή των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξεως II (MHC II)
- Ενεργοποίηση των μακροφάγων για να φονεύουν ενδοκυττάρια παράσιτα και κύτταρα όγκων
- Επαγωγή της φονικής δράσης των NK κυττάρων
- Επαγωγή του πολλαπλασιασμού και της ωρίμανσης των B κυττάρων και της έκκρισης ανοσοσφαιρινών
- Αναστολή της δράσης των οστεοκλαστών
- Επαγωγή της αντι-ικικής δράσης των INF-α και INF-β
- Επαγωγή της δράσης του TNF-α και της σύνθεσης της IL-1
- Αναστολή της δράσης των B λεμφοκυττάρων που επάγει η IL-4

#### In Vivo Βιολογικές Δράσεις (66)

- Αντι-ικική
- Αντινεοπλασματική
- Αντιπαρασιτική

## **Δ. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ**

### **TUMOR NECROSIS FACTOR- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

Αποτελεί μέλος μίας διαρκώς αυξανόμενης οικογένειας κυτταροκινών: TNF- $\beta$  , Fas ligand, NGF, CD40 ligand, APRIL, TRAIL, TRANCE, TWEAK and RANKL. Η λειτουργία ορισμένων μελών της οικογένειας είναι ακόμα υπό διερεύνηση, όλες όμως εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική απόπτωση, ενώ αρκετές έχουν προφλεγμονώδεις ιδιότητες. Η βιοσύνθεση του TNF- $\alpha$  ελέγχεται στενά και αναστέλλεται από μηχανισμούς ελέγχου για να επιτυγχάνεται η σιγή του TNF- $\alpha$  γονιδίου υπό φυσιολογικές συνθήκες. Έτσι ο TNF- $\alpha$  παράγεται σε ελάχιστες και μόλις ανιχνεύσιμες ποσότητες από τα κύτταρα σε ηρεμία, αλλά μετά από ερέθισμα, επίπεδα ανιχνεύσιμα TNF- $\alpha$  mRNA, παρουσιάζονται εντός 15-30 λεπτών (67,68,69).

Παράγεται από πλειάδα κυττάρων (70):

- Μακροφάγα
- Κύτταρα Kupffer
- NK-κύτταρα
- T-λεμφοκύτταρα
- B-λεμφοβλαστοειδή κύτταρα
- Μαστοκύτταρα
- Ινοβλάστες
- Κερατινοκύτταρα
- Αστροκύτταρα
- Λείες μυϊκές ίνες
- Καρκινικά κύτταρα μαστού
- Καρκινικά κύτταρα ωοθηκών

- Κύτταρα L-929

Ερεθίσματα για την αύξηση και την μείωση του TNF- $\alpha$  περιγράφονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5

Ερεθίσματα για την αύξηση και την μείωση του TNF- $\alpha$  (70)

Επαγωγικά ερεθίσματα	Ανασταλτικά ερεθίσματα
Βακτηρίδια (λίστέρια, pseudomonas aeruginosa, corynebacterium parvum, mycobacterium leprae murium, propionibacterium acnes, streptococcus pyogenes)	Δεξαμεθαζόνη
Ιοί (νόσος ιού Newcastle, Sendai ιός)	Προσταγλανδίνη E <sub>2</sub>
Πρωτόζωα (τροπανόσωμα)	PAF-R ανταγωνιστές
Ανοσοσυμπλέγματα	Βιταμίνη D <sub>3</sub>
INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, GM-CSF, M-CSF	Anti-HLA τάξεως II αντίσωμα
PAF	Κυκλοσπορίνη A
Βραδυκινίνη	Αναστολείς της λιποοξυγενάσης
Ρίζες ενεργού οξυγόνου	IL-6, IL-10, TGF- $\beta$
Αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης	
Λιποπολισακχαρίδια της κάψας των Gram (-) βακτηριδίων (LPS)	
Τοξίνη-1, συνδρόμου τοξικού σοκ (χρυσίζων σταφυλόκοκκος)	
Συμπλήρωμα C5a	
Ισχαμία	
Τραύμα	
Ακτινοβολία	

Η δράση του επιτυγχάνεται με την σύνδεση του σε δύο υποδοχείς TNF-RI, TNF-RII που ανευρίσκονται συνδεδεμένοι στην επιφάνεια όλων των κυττάρων πλην των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Στην διαλυτή τους μορφή, μετά από σχάση από τις μεταλλοπρωτεάσες της θεμελίου ουσίας, διατηρούν την ικανότητα τους να συνδέονται με τον TNF- $\alpha$ , εμποδίζοντας

όμως έτσι την βιολογική του δράση. Μεταξύ τους διαφέρουν στην κινητική της σύνδεσης, με τον TNF-RI να συνδέεται σχεδόν μη αντιστρέψιμα με τον TNF-α, ενώ η σύνδεση του με τον TNF-RII είναι ταχεία και υπάρχει η υπόθεση ότι αυτός είναι ένας τρόπος να συνδέεται ο TNF-α όταν είναι σε χαμηλή συγκέντρωση και να μεταφέρεται μετά στον TNF-RI (71).

Η πραγματοποίηση της βιολογικής δράσης του TNF-α ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα:

- Από την γονιδιακή έκφραση της παραγωγής του σε ανενεργό μορφή ως προ-TNF-α συνδεδεμένο στην κυτταρική μεμβράνη.
- Από την ενζυματική δράση των πρωτεασών (TACE) που τον μετατρέπουν στην ενεργό του μορφή.
- Από την σύνδεση του με τον ένα ή άλλο υποδοχέα.
- Από την παρουσία του διαλυτού υποδοχέα που ανταγωνίζεται την δράση του.
- Από την κατανομή των υποδοχέων στα κύτταρα στόχο.

Οι βασικές ιδιότητες του TNF-α είναι (72,73):

- Αντικαρκινική δράση λόγω της πρόκλησης αιμορραγικής νέκρωσης σε συμπαγείς όγκους και πρόκληση απόπτωσης σε ορισμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές.
- Αλλοίωση του ενεργειακού μεταβολισμού και πρόκληση καχεξίας και αναιμίας.
- Ιδιότητα διαμεσολαβητή στο σοκ από ενδοτοξιναιμία.
- Επούλωση των τραυμάτων λόγω της ικανότητας του να προάγει την αγγειογένεση, και του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών που επάγει.
- Αντιβακτηριακή δράση εξ αιτίας της ενεργοποίησης ουδετεροφίλων, μακροφάγων, ηωσινοφίλων.
- Έχει επίσης ρόλο κλειδί στην δημιουργία βακτηριδιοκτόνων κοκκιωμάτων.

Λόγω της θέσης του TNF γονιδίου στην περιοχή των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας MHC, θεωρείται πιθανό ότι «ανώμαλο» TNF γονίδιο εμπλέκεται στην εμφάνιση αυτοανόσων νοσημάτων. Όντως ο ρόλος του TNF έχει αποδειχθεί στην παθογένεια της νεφρίτιδας του λύκου. Παρ' ότι ο TNF-α έχει σημαντική προ-φλεγμονώδη δράση in vivo, δεν έχει μετρηθεί στην κυκλοφορία κατά την διάρκεια άσηπτης φλεγμονής. Γενικά ο TNF-α παίζει σημαντικό

ρόλο στην ενεργοποίηση της πρωτογενούς ανοσολογικής απάντησης. Απρόσφορη παραγωγή του οδηγεί σε φλεγμονή, ιστική καταστροφή και οργανική βλάβη (71,74,75). Επίσης σημαντικό ρόλο κατέχει στην ρύθμιση της T<sub>H</sub>1 ανοσολογικής απάντησης. Επάγει την σύνθεση IL-12 και IL-18 που με την σειρά τους επάγουν την INF- $\gamma$ , κύριο διαμεσολαβητή της T<sub>H</sub>1 ανοσολογικής απάντησης.

Αναλυτικότερα περιγράφονται οι βιολογικές δράσεις του TNF- $\alpha$  στον πίνακα 6 (76) :

Πίνακας 6

Βιολογικές δράσεις TNF- $\alpha$

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	ΜΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	IN VIVO
<b>Μονοκύτταρα-μακροφάγα</b>	<b>Ενδοθηλιακά κύτταρα</b>	<b>ΚΝΣ</b>
Ενεργοποιεί τον μεταβολισμό	Επηρεάζει την αγγειογένεση	Πυρετό
↑ κυτταροκίνες (IL-1, IL-6, M-CSF, GM-CSF) και PG	Αντιανοδολυστική /↑ την πηκτικότητα	Επηρεάζει την έκκριση των ορμονών της υπόφυσης
Προκαλεί χημειοταξία	↑ την διαπερατότητα	Ανορεξία
↓ τον πολλαπλασιασμό	↓ τον πολλαπλασιασμό	<b>Καρδιαγγειακό Σύστημα</b>
Ενεργοποιεί / αυτοεπάγει τον TNF- $\alpha$	↑ E-σελεκτίνες, ICAM, VCAM	Καταπληξία
↓ την διαφοροποίηση	↑ τις προστακυκλίνες	Εξαγγείωση
<b>Πολυμορφοπύρρηνα</b>	↑ την σύνθεση NO	<b>Γαστρεντερικό Σύστημα</b>
↑ προσκόλληση στην εξωκυττάρια θεμέλιο ουσία	↑ τις IL-1, IL-3, G-CSF, GM-CSF	Ισχαιμία
↑ την φαγοκυττάρωση	<b>Ινοβλάστες</b>	Κολίτιδα
↑ παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου	↓ την αναπνοή	<b>Ήπαρ</b>
<b>Λεμφοκύτταρα</b>	↑ IL-1, IL-6, LIF, GM-CSF	↓ την ηπατική καταλάση
↑ τους IL-2R και την παραγωγή INF- $\gamma$	↓ την σύνθεση του κολλαγόνου	Εμποδίζει την έκφραση της αλβουμίνης

↑ την δημιουργία T-κυτταρικών σειρών	↑ τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs)	Ηπατική νέκρωση
↑ τα ανιόντα υπεροξειδίου στα B- κύτταρα	↑ την κολλαγενάση και την σύνθεση PGE <sub>2</sub>	↓ την σύνθεση του κυττοχρώματος P-450
↑ την απόπτωση στα ώριμα T- κύτταρα	<b>Λιποκύτταρα</b>	<b>Ενδοκρινικό Σύστημα</b>
Ενεργοποιεί την επιθετικότητα των T-κυττάρων	↑ την απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων	↓ την έκκριση TSH, FSH, GH
<b>Φλεγμονή</b>	↓ την λιποπρωτεϊνική λιπάση	↑ την έκκριση ACTH, προλακτίνης
↑ την κυτταροτοξικότητα	<b>Χονδροκύτταρα</b>	↑ την στεροειδογένεση IL-1 εξαρτώμενη
↑ την δράση των NK-κυττάρων	↑ την απορρόφηση του οστού ↓ σύνθεσης προτεογλυκανών	<b>Μεταβολισμός</b> Απελευθερώνει τις ορμόνες του stress
	<b>Οστεοβλάστες</b>	↑ τον καταβολισμό των λιπιδίων
	↓ σύνθεση κολλαγόνου Απελευθέρωση Ca <sup>++</sup>	Αντίσταση στην ινσουλίνη ↑ τον καταβολισμό των πρωτεϊνών
	↓ ALP	
	<b>Ερυθρά αιμοσφαίρια</b>	
	↓ την επιβίωση	
	↓ την σύνθεση	

Η χορήγηση ανασυνδυασμένου ανθρώπινου TNF-α σε εθελοντές στη μικρή δόση των 50μg/m<sup>2</sup> προκάλεσε: πυρετό, πονοκέφαλο, μυαλγίες, ναυτία. Αιματολογικά παρουσίασαν ταχέως ουδετεροπενία με ακόλουθη ουδετεροφιλία, ενώ η λεμφοπενία και η μονοκυτταροπενία παρέμειναν επί μακρόν. Δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Τα επίπεδα της IL-6 αυξήθηκαν 40 φορές και παρουσιάστηκε αύξηση των



πρωτεϊνών οξείας φάσεως. Παρατηρήθηκε επίσης αυξημένη λιπόλυση και αυξημένο ρυθμό διακύκλισης (turn-over) γλυκόζης. Σε μία ώρα ενεργοποιήθηκε το ινοδολυτικό σύστημα, ενώ ακολούθησε ενεργοποίηση της πήξης και αιμοδυναμικές διαταραχές (77,78,79,80).

## Δ. ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

### Transforming Growth Factor-β (TGF-β)

Παράγεται από αρκετά καρκινικά κύτταρα ενώ ανευρίσκεται στους περισσότερους φυσιολογικούς ιστούς (κυρίως αιμοπετάλια, οστά και σπλήνα). Σχεδόν όλα τα κύτταρα του οργανισμού είναι ικανά να παράγουν και αντιδρούν στον TGF-β. Επαγωγικά και ανασταλτικά ερεθίσματα στην παραγωγή του TGF-β περιγράφονται στον πίνακα 7 (81).

Πίνακας 7

Ερεθίσματα για την αύξηση και την μείωση του TGF-β

Επαγωγικά ερεθίσματα	Ανασταλτικά ερεθίσματα
Οιστρογόνα, ταμοξιφένη	Δεξαμεθαζόνη
Επιδερμικός αυξητικός παράγων (↑ τον TGF-β1)	Επιδερμικός αυξητικός παράγων (↓ τον TGF-β2)
Αυξητικός παράγων των νεύρων (NGF)	Αυξητικός παράγων των ινοβλαστών ( FGF)
IL-1	FSH
Ca (↑ τον TGF-β2)	Ca (↓ τον TGF-β1)
Παραθορμόνη	
1,25 δυ-υδροξυβιταμίνη D3	
Παράγοντες ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων (Con-A, PHA )	

Λόγω της αμινοξικής ομοιότητας μεταξύ των ειδών, ο TGF-β είναι εξίσου δραστήσιος μεταξύ των διαφόρων ειδών. Η δράση του στα κύτταρα στόχο εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένης της διαφοροποίησης τους και την παρουσία άλλων κυτταροκινών.

Οι κυριότερες δράσεις του ασκούνται στην εξωκυττάριο θεμέλιο ουσία, βασικές στην εμβρυογένεση, επούλωση ιστών, στην καρκινογένεση καθώς και στην ίνωση νοσημάτων των πνευμόνων, νεφρών, οφθαλμών και ήπατος είναι (82):

- Αύξηση της σύνθεσης των πρωτεϊνών της θεμελίου ουσίας.

- Μείωση της σύνθεσης των πρωτεολυτικών ενζύμων που αποδομούν την θεμέλιο ουσία.
- Αύξηση της σύνθεσης των αναστολέων των πρωτεολυτικών ενζύμων.
- Αύξηση της κυτταρικής έκφρασης των ιντεγκρινών υποδοχέων που ρυθμίζουν την αλληλεπίδραση των κυττάρων με τη θεμέλιο ουσία.

Οι κυριότερες δράσεις του στην ιστική επούλωση, οφείλονται στην απελευθέρωση του από τα αιμοπετάλια στην περιοχή της βλάβης (83). Εκεί προκαλούν:

- Χημειοταξία και ενεργοποίηση των μονοκυττάρων για την έκκριση άλλων βιοενεργών αυξητικών παραγόντων.
- Καταστολή των φλεγμονωδών απαντήσεων.
- Άμεση και έμμεση επίδραση επί του ενδοθηλίου με τελική κατάληξη την αγγειογένεση.
- Χημειοταξία και ενεργοποίηση των ινοβλαστών για την σύνθεση της θεμέλιου ουσίας.

Από όλα τα συμμετέχοντα κύτταρα εκκρίνεται επιπλέον TGF-β που ενδυναμώνει την διαδικασία της επούλωσης. Ο TGF-β αποτελεί επίσης ισχυρό αντι-φλεγμονώδη παράγοντα. Έχει κατασταλτική δράση σε όλες της λεμφοκυτταρικές σειρές.

Στο ήπαρ παράγεται κυρίως από τα μη παρεγχυματικά κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών. Εκτός από τον ρόλο του στην ίνωση καταστέλλει και την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων. In vitro ο TGF-β καταστέλλει την DNA σύνθεση και επάγει τον κυτταρικό θάνατο από απόπτωση σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την δράση του αποτελεί η πρωτεολυτική του επεξεργασία από την ανενεργό στην ενεργό του μορφή (84,85,86,87)

## E. ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ

Ο όρος χημειοκίνη προέρχεται από τον συμψηφισμό των λέξεων «χημειο-τακτικές κυτταροκίνες». Αποτελούν μία οικογένεια περίπου 40 πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους (6-14 kD).

Έχουν διάφορα κύτταρα στόχους και τις κάτωθι βιολογικές δράσεις (88,89):

- Χημειοτακτικοί παράγοντες για ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα/μακροφάγα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα.
- Μιτογόνα για τα κερατινοκύτταρα και ορισμένα καρκινικά κύτταρα (μόνον ορισμένα μέλη της οικογένειας).
- Επάγουν ή / και αναστέλλουν την αγγειογένεση
- Διαθέτουν προ-φλεγμονώδεις δραστηριότητες μέσω επαγωγής παραγωγής υπεροξειδίων, απελευθέρωσης πρωτεασών, δημιουργίας (generation) δραστικών παραγώγων λιπιδίων, αλλαγής του κυτταροσκελετού ή και φαινοτυπικής αλλαγής κυττάρων, δημιουργίας θεμελίου ουσίας για κυτταρικούς πληθυσμούς στόχους.

Οι πρώτοι επαγωγείς της σύνθεσης των χημειοκινών είναι οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, IL-1 και TNF- $\alpha$  (90).

Χωρίζονται σε 4 οικογένειες που χαρακτηρίζονται αναλόγως της κατανομής του αμινοξέος κυστεΐνη στην περιοχή του άζωτο-τελικού τμήματος της πρωτεΐνης:

1. Η οικογένεια CC ( 2 κυστεΐνες κοντά στο άζωτο-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης)
2. Η οικογένεια CXC (ένα μη κυστεϊνικό αμινοξύ ανάμεσα σε δύο κυστεΐνες κοντά στο άζωτο-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης)
3. Η οικογένεια C (μία άζωτο-τελική κυστεΐνη)
4. Η οικογένεια CX3C (τρία μη κυστεϊνικά αμινοξέα ανάμεσα σε δύο κυστεΐνες κοντά στο άζωτο-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης)

### CC χημειοκίνες

*Μονοκυτταρική χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 (MCP-1):* Χημειοτακτικός παράγοντας για μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, ενεργοποιεί βασεόφιλα, επάγει απελευθέρωση ισταμίνης.

*Μονοκυτταρική χημειοτακτική πρωτεΐνη-2 (MCP-2):* Χημειοτακτικός παράγων για μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα

*Μονοκυτταρική χημειοτακτική πρωτεΐνη-3 (MCP-3):* Χημειοτακτικός παράγων για μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα, ενεργοποιεί βασεόφιλα και ηωσινόφιλα.

*Φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων-1α (MIP-1α):* Χημειοτακτικός παράγων για λεμφοκύτταρα και ηωσινόφιλα, πυρετογόνος.

*Φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων -1β:* Χημειοτακτικός παράγων για λεμφοκύτταρα, πυρετογόνος.

*RANTES:* Χημειοτακτικός παράγων για μονοκύτταρα, T κύτταρα μνήμης (memory cells), βασεόφιλα, ηωσινόφιλα, επάγει απελευθέρωση ισταμίνης.

### **CXC χημειοκίνες**

*IL-8:* Ενεργοποιεί ουδετερόφιλα, χημειοτακτικός παράγων για ουδετερόφιλα και T λεμφοκύτταρα, μιτογόνος για κερατινοκύτταρα, προκαλεί αγγειογένεση.

*ENA-78:* χημειοτακτικός παράγων για ουδετερόφιλα, προκαλεί αγγειογένεση.

*Πολυμορφοπυρηνική χημειοτακτική πρωτεΐνη-2 (GCP-2):* χημειοτακτικός παράγων για ουδετερόφιλα

*GR0 α,β,γ:* χημειοτακτικός παράγων για ουδετερόφιλα, μιτογόνος για κακοήθη μελανοκύτταρα, προκαλεί αγγειογένεση.

*MIG:* αναστέλλει την αγγειογένεση.

*Αιμοπεταλιακός παράγων 4 (PF-4):* Χημειοτακτικός παράγων για μονοκύτταρα και λευκοκύτταρα, αναστέλλει την αγγειογένεση.

*IP-10:* Χημειοτακτικός παράγων για μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα, αναστέλλει την αγγειογένεση.

### **C χημειοκίνες**

*Lymphotactin:* Χημειοτακτικός παράγων για λεμφοκύτταρα

*SCM-1:* Άγνωστη δράση.

### **CX3C χημειοκίνες**

*Fractalkine (neurotactin)*: Χημειοτακτικός παράγων για λεμφοειδή κύτταρα και μονοκύτταρα, λειτουργεί ως μόριο προσκολλητικότητας.

## **ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΝΕΣ**

Κυτταροτοξίνες είναι οι περφορίνες και οι γκρανζύμες. Πρόκειται για δραστικά μόρια που παράγονται από τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα. Οι γκρανζύμες είναι πρωτεϊνικές σερίνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). Η γκρανζύμη Α μετατρέπει την ανενεργό IL-1β σε ενεργό μόριο. Οι περφορίνες είναι πρωτεΐνες που δημιουργούν πόρους στις κυτταρικές μεμβράνες των κυττάρων στόχων.

## ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΑΡΧΕΓΟΝΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ

### ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ

Η πρωτογενής ανοσολογική απάντηση (innate immunity) γρήγορη αλλά αρχέγονη, αποτελεί μία αποτελεσματική πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον των παθογόνων μηχανισμών. Μη ειδική και λειτουργούσα ανεξάρτητα από το είδος του αντιγόνου, αποτελεί μια ολοκληρωμένη πολυ-συστηματική προσπάθεια του ξενιστή να καταπολεμήσει την μικροβιακή εισβολή, να μειώσει την ιστική καταστροφή και τον κυτταρικό θάνατο, να προάγει την ίαση και να μειώσει την πιθανότητα επι-λοιμώξεων ή ευκαιριακών λοιμώξεων. Επίσης δια μέσου της απελευθέρωσης των κυτταροκινών, ορίζει την πορεία και την φύση της δευτερογενής ανοσολογικής απάντησης (T<sub>H</sub>1 ή T<sub>H</sub>2).

Κυρίως οι προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1β, IL-6 και TNF-α, παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή και ρύθμιση της αρχέγονης ανοσολογικής απάντησης ενώ αποτελούν κλειδί στην εξέλιξη του μεγέθους και του είδους της δευτερογενούς ανοσολογικής απάντησης. Παραγόμενες από μια πλειάδα κυττάρων της λεμφικής και μυελοειδούς σειράς καθώς επίσης και από σωματικά κύτταρα, παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ των δύο τύπων της ανοσιακής απάντησης. (διάγραμμα 1) (91).

Η δράση των κυτταροκινών IL-1, IL-6, TNF-α, στα μη ανοσολογικά κύτταρα γίνεται διαμέσου (92):

- Άμεσης δράσης τους στα όργανα στόχους όπως σκελετικούς μύς, ήπαρ, υποθάλαμο, επινεφρίδια, θυρεοειδή, και κύτταρα παγκρεατικών νησιδίων.
- Επαγωγής νευροενδοκρινικής απάντησης δια μέσου του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων με απελευθέρωση γλυκοκορτικοειδών ορμονών και κατεχολαμινών.
- Επίδρασης στην απελευθέρωση θυρεοειδικών και παγκρεατικών ορμονών.

Η αρχέγονος ανοσολογική απάντηση του ξενιστή που επάγεται από τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1, IL-6, TNF-α, συνοψίζεται στον πίνακα 8 (92, 93).

---

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΡΧΕΓΟΝΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ

---

**Νευροενδοκρινικές αλλαγές**

Πυρετός και υπνηλία	Αυξημένη έκκριση γλυκαγόνης
Ανορεξία	Αντίσταση στην ινσουλίνη
Αυξημένη επινεφριδιακή έκκριση κορτικοειδών και κατεχολαμινών	Αλλαγή στην περιοδικότητα της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης
Μειωμένη libido	Αυξημένη έκκριση βασοπρεσίνης

**Αιμοποιητικές αλλαγές**

Ουδετεροφιλία, απελευθέρωση στην κυκλοφορία ανώριμων ουδετεροφίλων	Αυξημένη κάθαρση μη γερασμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων
Θρομβοκυττάρωση	Αναιμία χρόνιας νόσου
Καθυστερημένη απόπτωση ουδετεροφίλων	Αυξημένη απόπτωση λεμφοκυττάρων

**Μεταβολικές αλλαγές**

Απώλεια σκελετικών μυικών πρωτεϊνών και καθαρής μυικής μάζας	Επανακατανομή μετάλλων και ιχνοστοιχείων, χαμηλός σίδηρος και ψευδάργυρος, υψηλός χαλκός
Αυξημένη απελευθέρωση αμινοξέων	Απώλεια του εντερικού βλεννογόνιου φραγμού
Αυξημένη γλυκονεογένεση	Μειωμένη δράση λιποπρωτεϊνικής λιπάσης
Αυξημένη ηπατική λιπογένεση	Καχεξία
Αυξημένη λιπόλυση λιπώδους ιστού	

**Ηπατικές αλλαγές**

Υποαλβουμιναιμία, με αυξημένο καταβολισμό αλβουμίνης, και εξαγγείωσης	Αυξημένη σύνθεση inducible NO
Αυξημένη σύνθεση πρωτεϊνών οξείας φάσεως	Αύξηση της μαγγανίου υπερόξειδιο-βισμούτάσης
Μείωση της phosphoenolpyruvate carboxykinase	Αυξημένη σύνθεση αίμο-οξυγενάσης
Αυξημένη σύνθεση TIMP	

---



Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες επάγουν την σύνθεση από το ήπαρ μίας ομάδας γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών, των πρωτεϊνών οξείας φάσεως. Η βιολογική δράση των πρωτεϊνών οξείας φάσεως είναι πολύπλευρη κυρίως όμως αποτελούν αναγνωριστικά μόρια της αρχέγονη ανοσολογικής απάντησης.

Το αρχέγονο ανοσολογικό σύστημα σύμφωνα με τον άκαμπτο τρόπο λειτουργίας του , αναγνωρίζει τον άκακο «εαυτό» (self) από το βλαβερό «ξένο» (non-self) (93). Ενεργοποίηση της αρχέγονης ανοσολογικής απάντησης λόγω εσφαλμένης αναγνώρισης του self ως βλαβερού μπορεί να προκαλέσει καταστροφικές παθολογικές συνέπειες. Η υπερβολική ενεργοποίηση της σε μία κατακλυσμιαία βακτηριαίμια ή ενδοτοξιναιμία, έχει ως αποτέλεσμα υπερβολική παραγωγή TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  και IL-6 με ταχεία εμφάνιση σημείων σοκ (94,95,96,97). Είναι δηλαδή σαφές ότι η απρόσκοπτη ενεργοποίηση της αρχέγονης ανοσολογικής απάντησης μπορεί να αποβεί μοιραία.

## **ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ**

Η ισορροπία μεταξύ των διαφόρων κυτταροκινών καθορίζει την μορφή της δευτερογενούς ανοσολογικής απάντησης. Η ιδιαιτερότητα, διαφοροποίηση, ενεργοποίηση, επέκταση των δραστικών κυττάρων (effector cells) της δευτερογενούς ανοσολογικής απάντησης επιτυγχάνονται με την ρύθμιση των κυτταροκινών. Ο μεγάλος αριθμός των κυτταροκινών που εμπλέκονται στην ρύθμιση της δευτερογενούς ανοσολογικής απάντησης είναι απαραίτητος για να εξασφαλιστεί το υψηλό επίπεδο ελέγχου ανοσολογικών απαντήσεων του ξενιστή σε μία πλειάδα εξωτερικών παθογόνων.

Τα T4 βοηθητικά λεμφοκύτταρα ενορχηστρώνουν την δευτερογενή ανοσολογική απάντηση με την μικροβιακή καταστροφή από τα μακροφάγα και τα NK κύτταρα, την παραγωγή ανοσοσφαιρινών από τα B λεμφοκύτταρα, και την κλωνική επέκταση των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων. Τα αρχέγονα χωρίς μνήμη T κύτταρα (naive, T<sub>H</sub>0) συνήθως επιζούν για

αρκετό καιρό σε ηρεμία. Με την ενεργοποίηση τους αυτά τα κύτταρα εκκρίνουν IL-2 που με αυτοκρινή δράση τα οδηγεί σε πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση προς δραστικά T κύτταρα (effector T cells). Ο τύπος του αντιγονικού ερεθίσματος συχνά κατευθύνει το προφίλ των κυτταροκινών που επικρατούν που με τη σειρά τους καθορίζουν την διαφοροποίηση των naïve CD4 T κυττάρων σε CD4 T κύτταρα απάντησης τύπου 1 (T<sub>H</sub>1) ή σε CD4 T κύτταρα απάντησης τύπου 2 (T<sub>H</sub>2). Αυτό το στάδιο κλειδί καθορίζει κατά πόσον η δευτερογενής ανοσολογική απάντηση κυριαρχείται από κυτταρική ανοσία με ενεργοποιημένα μακροφάγα, NK κύτταρα (απάντηση T<sub>H</sub>1), ή από χυμική ανοσία (απάντηση T<sub>H</sub>2).

Τα T κύτταρα με τύπου T<sub>H</sub>1 απάντηση επάγονται με την παρουσία και παραγωγή IL-2, IL-12 και INF- $\gamma$  που ελέγχονται με τη σειρά τους από τις TNF- $\alpha$  και IL-18 (ο πρώην ονομαζόμενος παράγων επαγωγής της INF- $\gamma$ ) που παράγονται από βοηθητικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Η INF- $\gamma$  μετέχει στην διαδικασία εμποδίζοντας την παραγωγή T<sub>H</sub>2 κυττάρων.

Τα T κύτταρα με τύπου T<sub>H</sub>2 απάντηση επάγονται με την παρουσία και παραγωγή IL-4, IL-6, IL-10, IL-5, IL-13. Η IL-6 παίζει τον κύριο ρόλο (όπως και η IL-11) άμεσα προκαλώντας την διαφοροποίηση των naïve T κυττάρων σε πλασματοκύτταρα, ενώ οι κυτταροκίνες IL-4 και IL-10 εμποδίζουν την παραγωγή T<sub>H</sub>1 κυττάρων.

Οι δύο τύποι ανοσολογικών απαντήσεων συνήθως ισορροπούν σε υγιή άτομα.

Διαταραχές στην ισορροπία και στην ένταση των τύπων της ανοσολογικής απάντησης έχουν σαν αποτέλεσμα:

- μαζική ηπατοκυτταρική νέκρωση και κεραυνοβόλο ηπατίτιδα (υπερβολική παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών πρωτογενούς ανοσολογικής απάντησης )
- λύση της ιικής λοίμωξης αλλά μετά από έντονη νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα (υπερβολική ανοσολογική απάντηση τύπου 1)
- ελλιπή ίαση και χρονιότητα (επικράτηση ανοσολογικής απάντησης τύπου 2).

Συνοψίζονται στον πίνακα 9 οι κύριες δράσεις των κυτταροκινών στην ανοσολογική απάντηση κατά την διάρκεια συστηματικής φλεγμονή.

Πίνακας 9

<b>ΔΡΑΣΕΙΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ</b>	
IL-1	Προφλεγμονώδης
IL-2	Αυξητικός παράγων Τ-λεμφοκυττάρων
IL-4	Αυξητικός παράγων Β-λεμφοκυττάρων / Αντιφλεγμονώδης
IL-6	Αντιφλεγμονώδης / Προφλεγμονώδης
IL-7	Αυξητικός παράγων Τ και Β λεμφοκυττάρων
IL-10	Αντιφλεγμονώδης
IL-11	Αντιφλεγμονώδης
IL-12	Προφλεγμονώδης
IL-13	Αντιφλεγμονώδης
IL-15	Αντιφλεγμονώδης
IL-16	Χημειοτακτικός παράγων Τ λεμφοκυττάρων και ηωσινοφίλων
IL-17	Προφλεγμονώδης
IL-18	Προφλεγμονώδης
TNF- $\alpha$	Προφλεγμονώδης
INF- $\gamma$	Προφλεγμονώδης
TGF- $\beta$	Αντιφλεγμονώδης /Παράγων ινώσεως

## **ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΗΠΑΡ**

Η σχέση των κυτταροκινών με το ήπαρ, πολυδιάστατη όσο και πολύπλοκη, θα μπορούσε να συνοψισθεί σε τρία επίπεδα:

### **1. ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΣΤΟΝ ΗΠΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ**

Οι κυτταροκίνες παράγονται από τα αιμοποιητικά κύτταρα (μονοπύρρηνα μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα, αιμοπετάλια) από ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και λείες μυϊκές ίνες σε εξωηπατικές περιοχές φλεγμονής, φθάνουν στο ήπαρ δια της πυλαίας ή της συστηματικής κυκλοφορίας και συνδεόμενες με υποδοχείς τους στην επιφάνεια του ηπατοκυττάρου, οδηγούν σε αλλαγές του ενδιάμεσου ηπατοκυτταρικού μεταβολισμού (αμινοξέων, πρωτεϊνών, λιπιδίων, υδατανθράκων) που έχει στόχο την συμμετοχή του ήπατος στην συστηματική αμυντική απάντηση.

### **2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΗΠΑΡ**

Το ήπαρ συμμετέχει στην συστηματική παραγωγή των κυτταροκινών, δια των ηπατοκυττάρων (60% του συνόλου των κυττάρων του ήπατος), των ενδοθηλιακών κυττάρων (30% του συνόλου των κυττάρων του ήπατος), των κυττάρων του Kupffer (πέραν του 80% των μονοπύρηνων μακροφάγων του οργανισμού, 10% των κυττάρων του ήπατος), και των λιποκυττάρων (κύτταρα του Ito, ρετινοειδή κύτταρα, <5% του συνόλου των κυττάρων του ήπατος). Στόχος η μεταφορά πληροφοριών στα εξωηπατικά όργανα. Σημαντικός είναι και ο ρόλος του ήπατος στην απομάκρυνση των κυτταροκινών από την κυκλοφορία.

### **3. ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ.**

Κυτταροκίνες παράγονται ενδοηπατικά κατά την διάρκεια ηπατοκυτταρικών νοσημάτων και που με δράση παρακρινή ή αυτοκρινή επιδρούν στα ηπατικά κύτταρα. Η ερμηνεία για τον

ρόλο τους στην παθογένεια της ηπατικής βλάβης και αναγέννησης, εξ αιτίας της πολύπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ τους αλλά και της ανεπαρκούς γνώσης της φυσιολογικής τους δράσης, είναι ελλιπής. Παρ' ότι κυτταροκίνες ήδη χρησιμοποιούνται για την θεραπεία ηπατικών νοσημάτων (Ιντερφερόνη-α στην Χρόνια Ηπατίτιδα Β και C) μελέτες που στοχεύουν στην πληρέστερη κατανόηση της δράσης και επίδρασης των κυτταροκινών στην παθογένεια των ηπατικών νοσημάτων θα προσθέσουν στην θεραπευτική στρατηγική νέα σημαντικά όπλα.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

## ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΟΞΕΙΑΣ ΦΑΣΕΩΣ

Αποτελούν μία ομάδα γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών που η συγκέντρωσή τους στον ορό αυξάνει (θετικές πρωτεΐνες οξείας φάσεως) ή μειώνεται (αρνητικές πρωτεΐνες οξείας φάσεως) τουλάχιστον κατά 25% κατά την διάρκεια φλεγμονής. Η αλλαγές αυτές οφείλονται κατά κύριο λόγο στην σύνθεση από τα ηπατοκύτταρα, υπό την επίδραση των κυτταροκινών IL-1β, TNF-α και IL-6 (92,93). Η βιολογική δράση των πρωτεϊνών οξείας φάσεως είναι πολύπλευρη κυρίως όμως αποτελούν αναγνωριστικά μόρια της αρχέγονης ανοσολογικής απάντησης (93). Αναλυτικά περιγράφονται στον πίνακα 10.

Πίνακας 10

Ανθρώπιες πρωτεΐνες οξείας φάσεως

<b>ΘΕΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΟΞΕΙΑΣ ΦΑΣΕΩΣ</b>	<b>ΑΡΝΗΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΟΞΕΙΑΣ ΦΑΣΕΩΣ</b>
<b>Σύστημα Συμπληρώματος</b>	Αλβουμίνη
C3, C4, C9	Τρανσφαιρίνη
C1 αναστολέας	A2-HS γλυκοπρωτεΐνη
Mannose binding protein (MBP)	α-εμβρυϊκή σφαιρίνη
Παράγων B	Πρωτεΐνη δεσμεύουσα την θυροξίνη (TBP)
C4b-δεσμεύουσα πρωτεΐνη	Αυξητικός παράγων της ινσουλίνης (IGF-I)
<b>Πήξη και Ινωδολυτικό Σύστημα</b>	Παράγων XII
Ινωδογόνο	
Πλασμινογόνο	
Ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου	
Ουροκινάση	
Πρωτεΐνη S	
Αναστολέας I του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου	
<b>Αντιπρωτεάσες</b>	
α2-αναστολείς των πρωτεασών (AMG)	

---

α1- αντιχυμοθρυψίνη (AAT)

Αναστολέας της παγκρεατικής εκκριτικής θρυψίνης

#### **Πρωτεΐνες Μεταφοράς**

Σερουλοπλασμίνη

Απτοσφαιρίνη

Αιμοπηξίνη

#### **Συμμετέχοντες στην Φλεγμονώδη Απάντηση**

Εκκριτική A2 φωσφολιπάση

Πρωτεΐνη δεσμεύουσα τους λιποπολυσακχαρίτες

IL1-RA

Άλλες

CRP

Serum amyloid A

α1-acid glycoprotein

Ινωδονεκτίνη

Φερριτίνη

Αγγειοτενσινογόνο

---

Ορισμένες όπως οι: CRP, MBP, LBP, αμυλοειδές A, αμυλοειδές P (επίσης σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες της εξωκυτταρίου θεμελίου ουσίας), συνδεόμενες με μικροβιακούς πολυσακχαρίτες ή λιποπολυσακχαρίτες ή με φωσφολιπίδια από μεμβράνες κατεστραμμένων κυττάρων, ενεργοποιούν το συμπλήρωμα ή επάγουν την φαγοκυττάρωση. Η CRP επίσης επάγει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα. Άλλες όπως οι: α1 αντιχυμοθρυψίνη (AAT), και α2 μακροσφαιρίνη (AMG) αποτελούν αναστολείς των πρωτεασών. Η σερούλοπλασμίνη είναι πρωτεϊνικός μεταφορέας. Οι απτοσφαιρίνη, και αιμοπηξίνη είναι αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες (η πρώτη και με αγγειογενετική δράση) που όπως και η προηγούμενη ομάδα σκοπό έχουν την μείωση της τοπικής ιστικής βλάβης που επέρχεται λόγω της ενεργοποίησης της αρχέγονης ανοσολογικής απάντησης και την ιστική αποκατάσταση. Ο C3 αποτελεί υποδοχέα για τα αντιγόνα CD21 and CD35 (93).



## **ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΟΞΕΙΑΣ ΦΑΣΕΩΣ ΚΑΙ ΟΞΕΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΣ**

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες οξείας φάσεως υπάρχουν μελέτες που τις εμφανίζουν αυξημένες κατά την διάρκεια οξείας ηπατίτιδας. Η ικανότητα του ήπατος να παράγει ικανά επίπεδα πρωτεϊνών οξείας φάσεως έχει συσχετιστεί θετικά με καλή έκβαση της νόσου ακόμα και στην κεραινοβόλο ηπατίτιδα. (98). Δεν υπάρχουν μελέτες που να αφορούν αναλυτικά τον ρόλο της κάθε μίας των πρωτεϊνών στην πορεία και έκβαση της νόσου. Ενδιαφέρουσα είναι μελέτη των Thomas HC et al. που βρήκαν ότι μεταλλαγή της MBP στους Καυκασίους συνδυάζεται με χρονιότητα της HBV λοιμώξεως (99).

## **ΑΝΟΣΟΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΑ**

Κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα (CIC) δημιουργούνται κάθε φορά που ένα αντίσωμα συναντά ένα αντιγόνο, αλλά απομακρύνονται ταχέως από την κυκλοφορία. Μετά από ενεργοποίηση του συμπληρώματος συνδέονται σε ερυθρά αιμοσφαίρια, μεταφέρονται στο ήπαρ ή στον σπλήνα και εκεί φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα. Το συμπλήρωμα βοηθάει επίσης στο να εμποδίζει τους δεσμούς ανάμεσα σε αντιγόνο και αντίσωμα και να διατηρεί τα ανοσοσυμπλέγματα διαλυτά. Τα ανοσοσυμπλέγματα δημιουργούνται στην κυκλοφορία ή στην επιφάνεια ανοσολογικών κυττάρων και είναι ιδιαίτερα συχνά κατά την διάρκεια χρόνιων λοιμώξεων. Σε πειραματικές μελέτες έχει βρεθεί ότι τα ανοσοσυμπλέγματα αποτελούν επαγωγικά ερεθίσματα για την παραγωγή IL-1 β (13), TNF-α (70). Όταν τα αντιγόνα βρίσκονται σε περίσσεια, τα αντισώματα δεν είναι εξουδετερωτικά. Επίσης μπορούν να παρατηρηθούν κατά την διάρκεια αυτοανόσων νοσημάτων ή μετά από εισπνοή στον πνεύμονα. Η περίσσεια ενός αντιγόνου ή η παραμονή του επί μακρόν λόγω χρόνιας λοιμώξεως οδηγεί στην δημιουργία κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων. Παρά την παρουσία τους στην κυκλοφορία δεν δημιουργούν κλινικό πρόβλημα. Η νόσος ανοσοσυμπλεγμάτων οφείλεται στην εναπόθεση των ανοσοσυμπλεγμάτων στα νεφρά ή στα αγγεία, με βλάβες στο δέρμα και στα νεφρά (100). Νόσος ανοσοσυμπλεγμάτων έχει περιγραφεί κατά την διάρκεια οξείας ηπατίτιδας A, B και C (101).

## ΤΟ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (NO) ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΗΝ

### ΦΛΕΓΜΟΝΗ.

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι ένα ιδιαίτερα δραστικό μόριο που συντίθεται από το αμινοξύ L-arginine με την NO συνθετάση (NOS). Έχουν βρεθεί τριών ειδών NO συνθετάσες. Δύο ισομερή NOS που εκφράζονται σε βασικό επίπεδο και βρίσκονται κυρίως στους νευρώνες και στα ενδοθηλιακά κύτταρα (cNOS) και η επαγωγίμη NO συνθετάση (iNOS) η οποία κωδικοποιείται μετά από παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών ως ένα δραστικό μόριο κατά την διάρκεια φλεγμονής (102). Η iNOS εκφράζεται σε πολλά κύτταρα αλλά κυρίως στα μακροφάγα, στα ουδετερόφιλα, λείες μυϊκές ίνες των αγγείων και στα ηπατοκύτταρα (103). Και οι τρεις μορφές των ενζύμων χρειάζονται διάφορους συν-παράγοντες για να δράσουν. Οι γνωστοί είναι: καλμοδουλίνη, φλαβίν-μονονουκλεοτίδη, φλαβίν-αδενοσίνη, δινουκλεοτίδιο, αίμη, τετραϋδροβιοπτερίνη. Οι δύο cNOS χρειάζονται και  $Ca^{++}$ , ενώ η iNOS όχι (104,105). Η έκφραση της iNOS αναστέλλεται από τα γλυκοκορτικοειδή σε αντίθεση από εκείνη των cNOS (106).

NO παράγεται από την cNOS σε συγκεντρώσεις πικο-γραμμομορίων (pico-moles), δευτερόλεπτα μετά το ερέθισμα. Επιδρά στην διατήρηση της φυσιολογικής ομοιόστασης της πίεσεως της κυκλοφορίας του αίματος, του ελέγχου της σχέσης ενδοθηλίου-λευκοκυττάρων, και των σημάτων μεταξύ νευρώνων (107). Αντίθετα το NO που παράγεται από την iNOS ρυθμίζεται σε επίπεδο μεταγραφής (transcription) του ενζύμου. Τα ενεργοποιημένα κύτταρα χρειάζονται λεπτά έως ώρες για να παράγουν το NO, η συγκέντρωση του είναι σε μικρο-γραμμομόρια (micro-moles) και παραμένει για ώρες έτσι (108). Αντιδρώντας με υπεροξειδία μπορεί να παράγει περόξυ-νιτρικά και υδρόξυ-ρίζες ουσίες λίαν βλαβερές για τους ιστούς (109). Φαίνεται λοιπόν ότι ενώ η cNOS δρα στην φυσιολογική ομοιόσταση, η iNOS αποτελεί ένα δραστικό μόριο κατά την διάρκεια της φλεγμονής ενίοτε υπεύθυνο και για παθολογικές επιπτώσεις. Η συγκέντρωση του NO είναι ανάλογος με τις κυτταροκίνες που παράγονται κατά την διάρκεια φλεγμονώδους διεργασίας και προκαλούν είτε επαγωγή είτε αναστολή της iNOS (110). Οι λείες μυϊκές ίνες παράγουν NO κάτω από την επίδραση IL-1 και η απάντηση αυτή ενισχύεται με TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$  (111). Η ενδοθηλιακή iNOS και εκείνη

των μακροφάγων ενεργοποιείται από LPS και IFN- $\gamma$  (112). Τα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα παράγουν NO κάτω από την επίδραση ενός κοκτεϊλ κυτταροκινών (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) και LPS (106). Η αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη IL-10 παραγόμενη από ενεργοποιημένα μακροφάγα αναστέλλει την έκφραση της iNOS μπλοκάροντας την TNF- $\alpha$  ενεργοποίηση (113). Η κατάλληλη παραγωγή του NO συνεπάγεται σημαντικές ανοσο-ρυθμιστικές λειτουργίες για τον ξενιστή (114). Το NO εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό και προκαλεί τον θάνατο αρκετών παθογόνων μικροοργανισμών αναστέλλοντας ορισμένα ενζυμικά συστήματά τους (115). Κατά την διάρκεια ενδοτοξιναιμίας το NO μειώνει την ηπατική πρωτεϊνική σύνθεση και την μιτοχονδριακή αναπνοή. Προστατευτικό ρόλο στην φλεγμονή επίσης διαδραματίζει:

- δια της αναστολής του λευκοκυτταρικής άθροισης που εμποδίζει την εξαγγείωση λευκοκυττάρων προς τους φλεγμαίνοντες βλεννογόνους,
- δια της τοπικής αγγειοδιαστολής και
- δια της διατήρησης επαρκούς ηπατικής αιματικής ροής (116, 117, 118).

Μία υπερβολική παραγωγή βεβαίως διαμέσου των ίδιων φαινομένων αλλά και της δημιουργίας των δραστικών ριζών μπορεί να αποβεί καταστροφική για τους γειτονικούς ιστούς και τα κύτταρα που το παράγουν (119).

Τέλος in vitro μελέτες με κλώνους T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 κυττάρων που εξετέθησαν σε NO απέδειξαν ότι η παραγωγή IFN- $\gamma$  και IL-2 από τους T<sub>H</sub>1 κλώνους αναστάλη ενώ η παραγωγή της IL-4 από τους T<sub>H</sub>2 κλώνους παρέμεινε ανέπαφη (120).

Στον ορό το NO μετράται με την μέτρηση της συνολικής συγκέντρωσης nitrites (NO<sub>2</sub>) και nitrates (NO<sub>3</sub>) με την μέθοδο που περιέγραψε ο Grisham (121).

## **ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ**

Δεν υπάρχουν μελέτες στην βιβλιογραφία που να αφορούν το θέμα NO και οξεία ηπατίτιδα.

## ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΕΩΣ (MMPs)

Στο ήπαρ η εξωκυττάριος θεμέλια ουσία του χώρου του Disse αποτελεί απαραίτητο υπόστρωμα για την διατήρηση του φαινοτύπου των ηπατοκυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων και κυττάρων του Ito. Αλλοιώσεις της θεμελίου ουσίας προκαλούν βλάβες στην λειτουργία των ηπατοκυττάρων και μεταμόρφωση των κυττάρων του Ito σε μυοινοβλάστες που εναποθέτουν ίνες κολλαγόνου I, III, IV και άλλες πρωτεΐνες που διαταράσσουν την αρχιτεκτονική του ήπατος. Διαταραχές στην εξωκυττάριο θεμέλιο ουσία προκαλούνται όχι μόνον από ανωμαλίες στην εναπόθεση αλλά και στην αποδόμηση των συστατικών της.

Οι MMPs αποτελούν ένζυμα που εμπλέκονται σε φυσιολογικές διεργασίες όπως στην αναγέννηση και διαμόρφωση των ιστών κατά την επούλωση τραυμάτων, την οργανογένεση και την μορφογένεση. Στο ήπαρ διασπούν το κολλαγόνο της εξωκυτταρίου ουσίας. Διαταραχή στην παραγωγή ή την λειτουργία τους μετέχει στην εμφάνιση παθολογικών φαινομένων όπως στην καταστροφή του συνδετικού ιστού κατά την εμφάνιση νεοπλασίας, καρκινικής διήθησης ή μετάστασης και στην ίνωση. Η εξωκυττάριος ουσία αποτελεί και χώρο δέσμευσης άλλων ουσιών και κυτταροκινών και μπορεί να αυξάνει ή να μειώνει την τοπική δράση των MMPs μειώνοντας την κάθαρση τους από τους ιστούς, την ενεργοποίηση ή την δέσμευσή τους. Οι περισσότερες MMPs είναι εκκρινόμενες, όμως τα τελευταία έτη έχουν περιγραφεί και οι μεμβρανικές MMPs (MT- MMPs) που βρίσκονται αγκιστρωμένες στην κυτταρική μεμβράνη με ένα διαμεμβρανικό και ένα ενδοκυτταροπλασματικό μόριο (122).

Υπάρχουν τρεις ομάδες εκκριτικών μεταλλοπρωτεασών (123):

1. οι κολλαγενάσες διαμέσου τύπου (πχ MMP-1, MMP-8),
2. οι στρομελίσίνες (πχ MMP-3, MMP-10) και
3. οι κολλαγενάσες IV ή γελατινάσες (MMP-2, MMP-9).

Στο φυσιολογικό ήπαρ οι MMP-2, MMP-9 και MMP-3 επεξεργάζονται την βασική μεμβράνη, κολλαγόνο IV, λαμινίνη, πρωτεογλυκάνη της εξωκυτταρίου θεμελίου ουσίας του

χώρου του Disse. Υπό φυσιολογικές συνθήκες εκφράζονται ελάχιστα. Η έκφραση τους αυξάνει σε περίπτωση χρόνιας ηπατικής βλάβης, αναγέννησης και πρόιμης ηπατικής ίνωσης με αποτέλεσμα διαταραχή της εξωκυτταρίου θεμελίου ουσίας και των ηπατοκυττάρων, ενεργοποίηση των κυττάρων Ito σε μιοινοβλάστες και εναπόθεση ινώδους τύπου εξωκυτταρίου ουσίας (123).

Μετρήσεις των MMP και TIMP γίνονται με:

- Ανοσοπροσρόφηση στερεάς φάσεως (ELISA) σε ορό ή πλάσμα.
- Zymography: Ευαίσθητη μέθοδος για την εκτίμηση των MMP-2 και MMP-9 στα βιολογικά υγρά. Χρησιμοποιείται ένα gel (SDS-polyacrylamide gel) που περιέχει το πρωτεϊνικό υπόστρωμα (ζελατίνη). Μετά από ηλεκτροφόρηση το SDS που ανοίγει τις αλυσίδες του ενζύμου απομακρύνεται επιτρέποντας την αυτο-ενεργοποίηση του ενζύμου. Η δραστηριότητα του τελευταίου εκτιμάται από την περιοχή γελατινολύσεως στην περιοχή πέψεως του πρωτεϊνικού υποστρώματος. Διακρίνει δηλαδή την αδρανή από την ενεργοποιημένη μορφή των ενζύμων.
- Reverse zymography: Είναι μέθοδος που επιτρέπει την ανίχνευση των αναστολέων των ενζύμων (TIMPs).
- Western immunoblotting: χρησιμοποιώντας αντισώματα εναντίον των ενζύμων και των αναστολέων τους μετά από ηλεκτροφόρηση δύναται να διακρίνει τόσο τις ενεργές όσο και τις ανενεργές μορφές τους.
- In situ υβριδισμός: Επιτρέπει την εξέταση της παρουσίας ή της κατανομής ενός συγκεκριμένου mRNA σε τομές ιστών ή κύτταρα.

Με μελέτες ανοσοϊστοχημείας βρέθηκαν TIMPs σε ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, αγγεία, χοληφόρα και κύτταρα Kupffer. Έντονη θετικότητα βρήκε στα ινώδη διαφραγμάτια των πυλαίων διαστημάτων ασθενών με κίρρωση και χρόνια ενεργό ηπατίτιδα. Πολύ έντονη θετικότητα παρατηρήθη στην κάψα των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων και σε ενδοθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται σε επαφή με νεοπλασματικά κύτταρα (124). Σε φυσιολογικό ιστό παρ' ότι ο εντοπισμός των επαγωγίμων

ενζύμων αυτών είναι δύσκολος, βρέθηκαν: MMP-9 στα ηπατοκύτταρα δίπλα στα πυλαία διαστήματα. TIMP-1 με την μορφή σικτικών ενδοκυτταρίων εναποθέσεων σε κύτταρα του συνδετικού ιστού των πυλαίων διαστημάτων που ομοιάζουν με ινοβλάστες (κύτταρα Ito?). MMP-2 στα ηπατοκύτταρα κοντά στα πυλαία διαστήματα και μεταξύ των ηπατοκυττάρων στην περιοχή των κολποειδών στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων Ito και των λείων μυϊκών ινών (125).

#### **A. Κολλαγενάσες**

**MMP-1 κολλαγενάση τύπου 1 ή διάμεση κολλαγενάση 1** (interstitial collagenase): Παράγεται κυρίως από ινοβλάστες αλλά και μονοκύτταρα και μακροφάγα. Στο ήπαρ παράγεται από τα κύτταρα του Ito (126,127,128). Διασπά κυρίως τα κολλαγόνα III, I και II, την καζεΐνη, ζελατίνη, την α1 αντι-θρυψίνη, την βασική πρωτεΐνη της μυελίνης, την L-σελεκτίνη τον προ-TNF, IL-1β, MMP-2 και MMP-9.

**MMP-8 κολλαγενάση διάμεσου τύπου ουδετερόφιλων:** Παράγεται κυρίως από τα ουδετερόφιλα. Διασπά τα κολλαγόνα τύπου I, II,III.

#### **B. Στρομελίσινες**

**Στρομελίσινη-1 ή MMP-3:** Παράγεται από ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, χονδροκύτταρα. Τα κύτταρα παραγωγής της στο ήπαρ είναι μάλλον τα Ito (126). Διασπά προτεογλυκάνες, φιβρονεκτίνη, λαμινίνη και τύπου IV κολλαγόνο. Μπορεί και να διασπάσει την IL-1β. Η παραγωγή της επάγεται από τις προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1, TNF-α) και από παράγοντες ανάπτυξης (EGF, PDGF, basic bFGF, ECDGF).

**Στρομελίσινη-2 ή MMP-10:** Διασπά το κολλαγόνο τύπου III, IV, V, φιβρονεκτίνη, ζελατίνη.

#### **Γ. Γελατινάσες**

**Γελατινάση A ή MMP-2** (collagenase IV): Πρωτεΐνη υψηλής περιεκτικότητας σε ψευδάργυρο, 72kDa. Στο ήπαρ παράγεται από τα ενεργοποιημένα κύτταρα του Ito (128,126).

Διασπά το κολλαγόνο τύπου IV, τύπου V και τα μετουσιωμένα ινίδια κολλαγόνου (gelatin). Μπορεί να ενεργοποιήσει τις MMP-1, MMP-9 και MMP-13 και να διασπάσει την IL-1β. Η παραγωγή της επάγεται από τις προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1, TNF-α), από παράγοντες ανάπτυξης (EGF, PDGF, bFGF). Η MMP-2 στον ορό είναι κατά 95% συνδεδεμένη με αναστολείς και 5% σε ελεύθερη μορφή.

**Γελατινάση B ή MMP-9 (collagenase IV).** Πρωτεΐνη υψηλής περιεκτικότητας σε ψευδάργυρο, 92 kDa. Παράγεται από ουδετερόφιλα και μακροφάγα. Στο ήπαρ παράγεται από τα κύτταρα του Kupffer (126). Διασπά το κολλαγόνο τύπου IV, τύπου V και τα μετουσιωμένα ινίδια κολλαγόνου (gelatin). Μπορεί και να διασπάσει την IL-1β. Η μεταγραφή της ρυθμίζεται από κυτταροκίνες (IL-1, TNF-α) και παράγοντες ανάπτυξης (EGF, PDGF, bFGF) (129, 130).

Οι δύο γελατινάσες (MMP-2, MMP-9), είναι υπεύθυνες για την διάσπαση της βασικής μεμβράνης που κυρίως αποτελείται από τύπου IV κολλαγόνο. Εμπλέκονται με αυτόν τον τρόπο στα αρχικά στάδια της ηπατικής αναδιοργάνωσης μετά από βλάβη (131,132).

Όλες οι μεταλλοπρωτεάσες παράγονται και εκκρίνονται ως ανενεργά ζυμογόνα στην προ-ενζυμική τους μορφή. Ενεργοποιούνται όλες εκτός την MMP-2 από το σύστημα του ενεργοποιητή της ουροκινάσης-πλασμινογόνου (uPA) ή του ενεργοποιητή του ιστικού πλασμινογόνου (tPA), μέσω πρωτεόλυσης του πλασμινογόνου σε πλασμίνη που με την σειρά της μετατρέπει τις προ-κολλαγενάσες και τις προ-στρομελίσινες εν μέρει σε ενεργές μορφές. Η ενεργός στρομελίσίνη κατόπιν ενεργοποιεί πλήρως τις κολλαγενάσες διάμεσου τύπου. Άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα που ενέχονται στην ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών είναι η τρυπτάση των μαστοκυττάρων, η ελαστάση των ουδετεροφίλων και η καθεψίνη G. Η MMP-2 ενεργοποιείται στην επιφάνεια των κυττάρων από την σύνδεση της με μία μεμβρανική μεταλλοπρωτεάση (128).

Πολλοί είναι οι παράγοντες που ρυθμίζουν την δράση των μεταλλοπρωτεασών. Η παραγωγή και έκκριση τους ως προ-ένζυμα, η ενεργοποίηση των προ-ενζύμων και η επίδραση των ειδικών αναστολέων με τις ενεργές μορφές των ενζύμων. Ο TGF-β επάγει την σύνθεση της κολλαγενάσης IV, MMP-2, ενώ αναστέλλει εκείνη της στρομελίσινης και της διαμέσου



κολλαγενάσης από τους ινοβλάστες ιδιαιτέρως αυτήν που επάγουν οι παράγοντες ανάπτυξης EGFb και FGF (133). Η δεξαμεθαζόνη αναστέλλει την βιοσύνθεση της κολλαγενάσης IV των μακροφάγων (MMP-9). Γι' αυτό και η MMP-9 δεν θεωρείται πρωτεΐνη οξείας φάσεως (134). Στην προοδευτική ηπατική ίνωση φαίνεται ότι σημαντικό ρόλο παίζει η ανεπαρκής διάσπαση των ινών του κολλαγόνου από την κολλαγενάση διάμεσου τύπου MMP-1 αφ' ενός εξ' αιτίας της μειωμένης παραγωγής της, αφ' ετέρου της αυξημένης παραγωγής των ανασταλτών της (TIMP-1, TIMP-2, AMG) (123,128,132,135,136). Στις χρόνιες ηπατοπάθειες φαίνεται ότι μία αύξηση στις κυκλοφορούσες MMPs και TIMPs συνδέεται με ίνωση και εμφάνιση κίρρωσης διαμέσου διαταραχής στην παραγωγή και διάσπαση της θεμελίου ουσίας (137,129,131,132).

#### **ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΩΝ** (α2 μακροσφαιρίνη AMG, TIMPs, α1 αντιθρυψίνη AAT)

**α2 μακροσφαιρίνη (AMG):** Μεγάλου μοριακού βάρους γλυκοπρωτεΐνη που αναστέλλει διάφορες πρωτεΐνάσες, συμπεριλαμβανομένων και των μεταλλοπρωτεασών. Ο τρόπος δράσης της γίνεται με τον εγκλωβισμό των MMPs στην περιοχή παγίδα του μορίου τους και κάθαρση του συμπλόκου από τα κύτταρα του Kupffer (138). Παράγεται στο ήπαρ από τα ηπατοκύτταρα και τα ενεργοποιημένα Ito (139). Σε ηπατικά κοκκιώματα ποντικών μολυσμένων με *schistosoma mansoni* βρέθηκαν συμπλέγματα από AMG και μεταλλοπρωτεάσες, κάτι που έκανε τους ερευνητές να υποθέσουν ότι με αυτόν τον μηχανισμό αναστολής της δράσης των MMPs προκαλείται η ηπατική ίνωση (135).

**TIMP-1.** Παράγεται από τα κύτταρα του Ito (128,126), του Kupffer και τα ηπατοκύτταρα τα οποία εκφράζουν χωρίς προηγούμενη ενεργοποίηση ή επαγωγή το mRNA του TIMP-1 σε χαμηλά επίπεδα. Ο TIMP-1 αναστέλλει τις ενεργές μορφές των MMP-1, MMP-3, προ-MMP-9, MMP-9. Επάγεται από τις ίδιες κυτταροκίνες IL-1β, TNF-α και τους ίδιους αυξητικούς

παράγοντες EGF, b-FGF που επάγουν τις κολλαγενάσες. Ο TGF-β αντιθέτως με τις MMPs επάγει τον TIMP-1, TIMP-2 MMP-2.

Αυξήσεις στον ορό και στο ήπαρ του TIMP-1 στην χρόνια ηπατίτιδα και στην κίρρωση έχουν επιβεβαιωθεί από πολλούς ερευνητές, θεωρείται δε ότι, στο ήπαρ η αύξηση των TIMP επάγει την εναπόθεση εξωκυτταρίου ουσίας επειδή αναστέλλοντας τις MMP, καθυστερεί την διάσπαση του κολλαγόνου (140,123,141,142). Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων του TIMP-1 με την πρόοδο της ηπατικής νόσου έχει να κάνει σύμφωνα με τον Lichtinghagen et al. περισσότερο με την ηπατική φλεγμονή παρά με την ίνωση (142). Η εξήγηση που δίδει είναι ότι κατά την διάρκεια ηπατικής φλεγμονής απελευθερώνονται προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1β, TNF-α) που προκαλούν και την διαφοροποίηση των αστεροειδών κυττάρων (κυττάρων του Ito) σε μυοινοβλάστες που παράγουν κολλαγόνο καθώς και όλα τα ένζυμα που επεξεργάζονται την εξωκυτταριο ουσία (MMPs και αναστολείς TIMPs). Οι ίδιες δε κυτταροκίνες επάγουν και τους TIMPs (143,126).

Σε πειραματικό μοντέλο οξείας ηπατικής βλάβης σε ποντικούς ο Greenwel χορήγησε σε μία ομάδα τετραχλωράνθρακα (CCL4) και σε μία CCL4 με κυτταροκίνες IL-1, IL-6, TNF-α. Παρατήρησε ότι στην δεύτερη ομάδα αυξήθηκε κατά πολύ η έκφραση του προκολλαγόνου και του TIMP-1 και οδηγήθηκε ταχύτερα στην ίνωση (144).

**TIMP-2.** Παράγεται από τα κύτταρα του Kupffer και του Ito (126). Σε πολύ χαμηλά επίπεδα και από τα ηπατοκύτταρα με αυξημένη έκφραση μετά από επαγωγή από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Έχει διπλή δράση αναστέλλοντας ασθενώς όλες τις ενεργείες μεταλλοπρωτεάσες αλλά και την ενεργοποίησή τους. Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ μεταλλοπρωτεασών και αναστολέων τους παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές παθοφυσιολογικές διεργασίες όπως η καρκινική διήθηση και η ίνωση. Η μεγάλη παραγωγή των TIMPs αναστέλλει τις MMPs και προκαλεί ίνωση λόγω αυξημένης παραγωγής και εναπόθεσης κολλαγόνου που δεν συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση της δραστηριότητας των MMPs και κυρίως της MMP-1 (145). Στην χρόνια ενεργό ιογενή ηπατίτιδα (223±/− 38 ng/ml), και στην χρόνια εμμένουσα (181±/−37ng/ml) σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς (164±/−20ng/ml) τα επίπεδα TIMP στον ορό είναι αυξημένα με μετρήσεις ELISA. Ο

συγγραφέας αποδίδει στα TIMP την μείωση της κολλαγενολυτικής και γελατινολυτικής δραστηριότητας του ομογενοποιημένου ηπατικού ιστού που έχουν βρεθεί στην κίρρωση σε προηγούμενες μελέτες. (146).

### **MMPs ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ**

Όσον αφορά στην οξεία ηπατική βλάβη υπάρχουν λιγότερες μελέτες. Ο Yata σε πειραματικές μελέτες οξείας ηπατικής βλάβης από τετραχλωράνθρακα, ισχυρίζεται ότι η MMP-13 (κολλαγενάση 3) αυξάνει πρόωρα (εντός 6 ωρών) κάτω από την επίδραση του TNF- $\alpha$ . Στις επόμενες ώρες η έκφραση ομαλοποιείται ενώ αυξάνει ο TIMP-1 που αρχίζει από το πρώτο ωρο και φθάνει το μέγιστο στις 2 ημέρες ακολουθώντας την έκφραση του TGF- $\beta$ . Υπάρχει λοιπόν μία πρόωμη αύξηση των MMPs που πιθανόν δεν αναγνωρίστηκε στην μελέτη, διότι τα πειράματα έγιναν σε μεταγενέστερο στάδιο (147).

Σε μελέτη του Knittel T ο TNF- $\alpha$  αυξάνει την παραγωγή MMPs (κυρίως MMP-3, MMP-10, MMP-13 και περιορισμένες ποσότητες MMP-9) και TIMP-1 σε πρώιμες κυτταρικές καλλιέργειες ενεργοποιημένων κυττάρων του Ito (χωρίς καμία επίδραση όμως στους MMP-2, TIMP-2). Προσθήκη του TGF- $\beta$  στις καλλιέργειες προκάλεσε μείωση της έκφρασης των MMP-9, MMP-3, MMP-10, MMP-13 και επαγωγή της έκφρασης των TIMP-1 και TIMP-2 μετά την 6<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας. Η γελατινολυτική δράση της MMP-2 δεν επηρεάστηκε από τον TNF- $\alpha$  ή τον TGF- $\beta$ . Υπαινίσσεται δηλαδή ότι ο TNF- $\alpha$  διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της ηπατικής βλάβης απαντώντας στο βλαπτικό ερέθισμα με αύξηση των μεταλλοπρωτεασών, διάσπαση του κολλαγόνου IV του υπενδοθηλιακού χώρου του Disse και ενεργοποίηση των κυττάρων του Ito. Ενώ σε ένα επόμενο στάδιο της ο συνδυασμός της αύξησης του TGF- $\beta$  και της  $\alpha$ 2-μακροσφαιρίνης (επίσης αναστολέα των πρωτεολυτικών ενζύμων) συνοδεύεται από αύξηση των TIMPs με αναστολή της δράσης των μεταλλοπρωτεασών (126). Η θεωρεία των συγγραφέων είναι ότι κατά την οξεία ηπατική βλάβη η ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων σε μυοινοβλάστες προκαλεί αύξηση της

αποδόμησης της εξωκυτταρίου θεμελίου ουσίας για να επιτραπεί η στρατολόγηση φλεγμονωδών κυττάρων και η μετανάστευση των ηπατικών κυττάρων.

Επίσης σε πειραματικές μελέτες βρέθηκε ότι νωρίς (1-3 ώρες) στην οξεία ηπατική βλάβη από τετραχλωράνθρακα παράγεται TIMP-1. Η παραγωγή αυτή επάγεται κυρίως από την IL-6 σε 4-8 ώρες και λιγότερο από τις IL-1β και IL-11, ενώ αναστέλλεται από την δεξαμεθαζόνη (148).

Σε ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα τα επίπεδα της κυκλοφορούσης MMP-2 βρέθηκαν να είναι ίδια με των μαρτύρων, σε αντίθεση με εκείνα ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα και κίρρωση όπου βρέθηκαν στατιστικά αυξημένα (149).

Αντίθετα οι TIMP με ELISA έχουν βρεθεί αυξημένοι σε ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα, ενώ σχετίζονται με τα επίπεδα PIII, τα επίπεδα τύπου IV του κολλαγόνου και τις τρανσαμινάσες (150). Σε σύμφωνη μελέτη βρέθηκε ότι τα επίπεδα των TIMP επιστρέφουν στο φυσιολογικό 2-3 μήνες μετά το οξύ επεισόδιο και ο συγγραφέας συσχετίζει τις τιμές τους όχι μόνο με τον βαθμό ίνωσης αλλά και τον βαθμό ενεργού ινωτικής δραστηριότητας, ενεργού φλεγμονής και νέκρωσης (151). Ιδιαίτερα αυξημένοι βρέθηκαν οι ιστικοί αναστολείς και σε ασθενείς με οξεία κεραυνοβόλο ηπατίτιδα (152).

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

**ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ**

**ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΗΒV ΛΟΙΜΩΞΕΩΣ**

Η HBV λοίμωξη μπορεί να εκδηλωθεί είτε ως οξεία αυτοπεριοριζόμενη νόσος διαφόρου κλινικής βαρύτητας είτε ως χρόνια ηπατίτιδα. Η κλινική βαρύτητα και εκδηλώσεις της νόσου, οι ηπατικές βλάβες καθώς και η τελική έκβαση της, εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση παραγόντων του ιού με παράγοντες του ξενιστή. Σημαντικοί ανοσολογικοί παράγοντες που αφορούν τον ξενιστή είναι, η επάρκεια του ανοσολογικού συστήματος, η καλή λειτουργία κυτταρικής και χυμικής ανοσίας καθώς και η τοπική και συστηματική παραγωγή κυτταροκινών.

Σημαντικές δυσκολίες στην μελέτη των ανοσοπαθογενετικών μηχανισμών ξενιστή ενάντια στον ιό B, είναι η έλλειψη κατάλληλου μικρού πειραματόζωου για μοντέλο αναπαραγωγής της νόσου, καθώς και κυτταρικών καλλιέργειών. Αναλυτικότερα ο ιός B αναπαράγεται σε ένα είδος πάπιας, σε ένα είδος σκίουρου, σε woodchuck και στο χιμπατζή. Όμως το ανοσολογικό σύστημα των τριών πρώτων ζώων είναι αγνώστου λειτουργίας, ενώ οι δυσκολίες ανοσολογικής μελέτης της νόσου στο χιμπατζή (ο οποίος επιπλέον εκδηλώνει μία πολύ ήπια νόσο) είναι οικονομικοί αλλά και οικολογικοί. Όσον αφορά στις κυτταρικές καλλιέργειες, οι κατάλληλες είναι ανθρώπινα ηπατοκύτταρα, τα οποία πέραν της δυσκολίας ανεύρεσης τους δεν επιβιώνουν επί μακρό σε καλλιέργεια. Μελέτες του μηχανισμού της ηπατοκυτταρικής βλάβης έχουν προκύψει από ποντίκια που φέρουν στα ηπατοκύτταρα τους HBV αντιγόνα τα οποία με γενετικούς μηχανισμούς εκφράστηκαν εκεί κατά την νεογενική ανάπτυξη των ποντικών (transgenic mouse model) (153). Το μοντέλο αυτό όμως δεν είναι κατάλληλο για την μελέτη της εγκατάστασης της οξείας βλάβης ούτε επιτρέπει την μελέτη των όποιων μηχανισμών του ξενιστή συμμετέχουν στην εγκατάσταση χρόνιας ηπατίτιδας.

## ΑΡΧΕΓΟΝΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ

Αρχικά στην οποιαδήποτε ενδοκυττάρια ιική λοίμωξη, ενεργοποιείται η αρχέγονη, μη-ειδική, ανοσολογική απάντηση. Η μη αντιγονο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση των κυττάρων του Kupffer προκαλεί παραγωγή των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  και IL-6 οι οποίες:

- Επηρεάζουν τον μεταβολισμό των ηπατοκυττάρων και επάγουν την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσεως (92,93)
- Επάγουν την παραγωγή χημειοκινών. Πρωτεΐνες υπεύθυνες αφ' ενός για την χημειοταξία και ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, B και T λεμφοκύτταρα) αφ' ετέρου για την αύξηση της προσκόλλησης τους στο ενδοθήλιο (154).
- Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο (κυρίως ο TNF- $\alpha$ ) στην εμφάνιση της τύπου 1 ανοσολογικής απάντησης, προκαλώντας μετατροπή των T0 CD4+ λεμφοκυττάρων σε T<sub>H</sub>1 κύτταρα που παράγουν IL-2 και IFN- $\gamma$ , διευκολύνοντας την κυτταρική ανοσία που είναι η σημαντικότερη μορφή ανοσολογικής απάντησης στην καταπολέμηση και κάθαρση ενδοκυττάρων μικροβιακών και ιικών λοιμώξεων (155).
- Ενεργοποιούν τα NK κύτταρα, που επίσης με μή-αντιγονοεξαρτώμενο μηχανισμό οδηγούν σε λύση των μολυσμένων κυττάρων.

Ειδικά στην HBV λοίμωξη ο ρόλος της αρχέγονης ανοσολογικής απάντησης δεν είναι σε όλα ξεκαθαρισμένος. Γνωστό είναι ότι οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες είναι αυξημένες στην οξεία ηπατίτιδα στα πρώιμα στάδια της λοιμώξεως με σταδιακή μείωση κατά την εξέλιξη της νόσου και ότι συμμετέχουν στην τοπική ηπατική ανοσοπαθολογία και στις συστηματικές φλεγμονώδεις διεργασίες, ενώ έχουν συσχετιστεί και με την κλινική βαρύτητα και τον θάνατο (156,157,158,159). Ο TNF- $\alpha$  που παράγεται από τα κύτταρα Kupffer προκαλεί απόπτωση στα μολυσμένα

ηπατοκύτταρα (160) και ηπατοκυτταρική νέκρωση και ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων (161).

Οι ιντερφερόνες  $\alpha$  και  $\beta$  που παράγονται από τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα και τα CTL, καταστέλλουν αποτελεσματικά τον B ιικό πολλαπλασιασμό (162). Ο ρόλος των NK κυττάρων στην B ιική λοίμωξη δεν είναι σαφής μια που υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες που αναφέρονται σε είτε αυξημένη είτε μειωμένη δραστηριότητα των κυττάρων αυτών (163,164).

### **ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ**

Μετά την ενεργοποίηση της αρχέγονης ανοσολογικής απάντησης ενεργοποιείται η αντιγονο-εξαρτώμενη δευτερογενής ανοσολογική απάντηση, τα δύο σκέλη της οποίας είναι η χυμική και η κυτταρική ανοσία.

Κεντρικό ρόλο στην διεξαγωγή αυτών των μηχανισμών διαδραματίζουν τα CD4+ λεμφοκύτταρα. Αυτά έχουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα ιστοσυμβατότητας της τάξεως II (MHC II). Τα MHC II αναγνωρίζουν μόρια συνδεδεμένα μόνο σε αντίστοιχα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας. Τα ηπατοκύτταρα όμως διαθέτουν MHC I και όχι MHC II στην επιφάνειά τους. Τα MHC II των CD4+ λεμφοκυττάρων αναγνωρίζουν ιικά πρωτεϊνικά σωματίδια συνδεδεμένα στα αντιγονοπαρουσιαστικά μακροφάγα (antigen presenting cell, APC). Τα APC, που στην περίπτωση της λοίμωξης από ιούς ηπατίτιδος, είναι τα κύτταρα του Kupffer, αφού φαγοκυτταρώσουν διαλυτά αντιγόνα του ιού, μετά από πρωτεόλυση τα παρουσιάζουν στα CD4+ λεμφοκύτταρα (165). Αυτό και η παρουσία των προφλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF- $\alpha$ , IL12) που είχαν παραχθεί από τα κύτταρα Kupffer στο τοπικό μικροπεριβάλλον προκαλεί την μετατροπή των naïve CD4+ λεμφοκυττάρων, σε ενεργοποιημένα T<sub>H</sub>0 λεμφοκύτταρα τα οποία ακολούθως παράγουν άλλες κυτταροκίνες που τελικά ρυθμίζουν την μορφή και ένταση της δευτερογενούς ανοσολογικής απάντησης. Ανάλογα με το είδος των εκκριμένων κυτταροκινών που παράγονται από τους κλώνους T<sub>H</sub>1 και T<sub>H</sub>2, παρατηρείται



επικράτηση της κυτταρικής ανοσίας (παραγωγή IL-2, IFN- $\gamma$ , απάντηση T<sub>H</sub>1) ή της χυμικής ανοσίας (παραγωγή IL-4, IL-10 απάντηση T<sub>H</sub>2) (166).

Σήμερα έχουν επικρατήσει οι όροι ανοσολογική απάντηση τύπου 1 και τύπου 2 έναντι των προηγούμενων T<sub>H</sub>1 και T<sub>H</sub>2, διότι είναι πλέον γνωστή η συμμετοχή στην παραγωγή κυτταροκινών και άλλων ανοσοδραστικών κυττάρων.

Αρχικά τα CD4<sup>+</sup> λεμφοκύτταρα παράγουν κυτταροκίνες τύπου 1 (IL-2 και IFN- $\gamma$ ), που ενεργοποιούν τα CD8<sup>+</sup> σε κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CTL) επάγοντας την *κυτταρική ανοσία*. Αυτά κατευθύνονται προς τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα στον οποίων την επιφάνεια βρίσκονται συνδεδεμένα επί των MHC I ιικά αντιγόνα που προέρχονται από τους ενδοηπατοκυτταρικούς ιούς (HBcAg). Μετά την αναγνώριση τα CTL παράγουν χημειοκίνες (περφορίνες και γκρανζύμες) που κυρίως με τον μηχανισμό της απόπτωσης προκαλούν τον θάνατο των μολυσμένων ηπατοκυττάρων. Επίσης απόπτωση προκαλεί η σύνδεση των μορίων FasL των CD8<sup>+</sup> με τα Fas που πλεονάζουν στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων (167).

Παράλληλα η παραγωγή κυτταροκινών τύπου 2 (IL-4, IL-10) ενεργοποιεί τα B λεμφοκύτταρα να παράγουν διαφόρους τύπους αντισωμάτων, επάγοντας την *χυμική ανοσία*.

Τα αντισώματα που κατευθύνονται εναντίον του εξωτερικού περιβλήματος του ιού (HBsAg / anti HBsAb) είναι εξουδετερωτικά αντισώματα. Τα αντισώματα αυτά έχουν ιδιαίτερη σημασία και στην πρόληψη της λοίμωξης μια που δύνανται με την προσκόλληση τους στην εξωτερική επιφάνεια των ιών, να εμποδίσουν την διείσδυση τους στα κύτταρα στόχο. Αυτήν τους την ιδιότητα εκμεταλλεύεται επιτυχώς ο εμβολιασμός. Τα εξουδετερωτικά αντισώματα παρουσιάζουν ειδικότητα σε ορολογικούς τύπους του ιού, κάτι που στην πρόληψη της HBV λοίμωξης πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν. Τα αντισώματα επίσης δύνανται να ενδυναμώνουν την οψονοποίηση των ιικών σωματιδίων επάγοντας την φαγοκυττάρωση τους από μακροφάγα και ουδετερόφιλα. Κατά την διάρκεια HBV ιικής λοίμωξης συγχρόνως με την εμφάνιση της τρανσαμινασαιμίας, εμφανίζονται και τα πρώτα αντισώματα στον ορό (168).

Στην HBV λοίμωξη άγνωστο είναι το πότε αρχίζει η δευτερογενής κυτταρική ανοσία. Ειδικοί HBc CD4<sup>+</sup> κλώνοι, καθώς και ειδικοί HBV-CTL έχουν απομονωθεί, η κινητική των οποίων είναι παράλληλη με αυτή των CD4<sup>+</sup> (169,170,171).

Θεωρείται ότι ειδικά Β λεμφοκύτταρα που συνδέουν ιικά σωματίδια μέσω των εξουδετερωτικών HBsAb, ακολούθως επεξεργάζονται τα ιικά αντιγόνα και δρώντας σαν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα παρουσιάζουν τα HBcAg στα CD4+ (172). Ακόμα και η παραγωγή των anti-HBsAb είναι εξαρτώμενη από Τ λεμφοκύτταρα (173). Έντονη κυτταρική ανοσία στην αυτοπεριοριζόμενη οξεία ηπατίτιδα Β συνοδεύεται από τύπου 1 ανοσολογική απάντηση (174). Ενώ Τ-κλώνοι ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β παράγουν κυρίως απαντήσεις τύπου 2 (175). Σημαντική στην αυτοπεριοριζόμενη οξεία ηπατίτιδα Β είναι και η παρουσία πολυκλωνικών CTL απαντήσεων (176). Αυτές οι απαντήσεις παραμένουν ανιχνεύσιμες και μετά την κλινική ύφεση της οξείας νόσου (177) και κατά την διάρκεια υποτροπών στην χρόνια ηπατίτιδα που ακολουθούνται από κάθαρση του ιού (178). Απεδείχθη δε ότι ακόμα και στα άτομα που έχουν αναρρώσει από Β λοίμωξη, εξακολουθεί να υπάρχει μικρό ιικό φορτίο που εξασφαλίζει μία ικανοποιητική ανοσιακή μνήμη (177).

Όμως η δράση της κυτταρικής ανοσίας δεν μπορεί από μόνη της να εξηγήσει την καταστροφή όλων των μολυσμένων ηπατοκυττάρων και την ιική κάθαρση. Πρώτον εξ' αιτίας της μεγάλης αριθμητικής υπεροχής των ηπατοκυττάρων ( $10^{11}$ ) έναντι των HBV-CTL λεμφοκυττάρων ( $<10^8$ ) που σημαίνει ότι εάν η κυτταροτοξικότητα ήταν ο μόνος μηχανισμός καταστροφής των μολυσμένων ηπατοκυττάρων, ένα λεμφοκύτταρο θα έπρεπε να σκοτώνει περίπου 1000 μολυσμένα ηπατοκύτταρα (179). Κάτι που είναι αδύνατον και λόγω της αρχιτεκτονικής του ήπατος (180). Επιπλέον η ιική κάθαρση μέσω μόνον ενός μηχανισμού λύσης των μολυσμένων ηπατοκυττάρων θα σήμαινε την σχεδόν πλήρη ηπατοκυτταρική νέκρωση μια που σχεδόν όλα τα ηπατοκύτταρα πάσχουν. Άρα εξίσου σημαντικοί είναι και οι χυμικοί μηχανισμοί καθώς και η παραγωγή κυτταροκινών. Μελέτες δε των παραπάνω συγγραφέων απέδειξαν στα πειραματόζωα ότι παραγωγή κυτταροκινών IFN- $\gamma$  και TNF- $\alpha$  από τα CTL εμποδίζει αποτελεσματικά τον ιικό πολλαπλασιασμό ακόμα και χωρίς καμμία κυτταροτοξικότητα. Επίσης η επαγωγή της IFN- $\gamma$  από την IL-12 καταστέλλει τον

πολλαπλασιασμό του HBV (181). Η παραγωγή των κυτταροκινών αυτών προσκαλεί στην περιοχή και ενεργοποιεί μη ειδικά φλεγμονώδη κύτταρα όπως μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) και NK κύτταρα. Το γιατί στο 2-5% των ενηλίκων και στο 95% των νεογνών η οξεία HBV λοίμωξη εξελίσσεται σε χρονιότητα δεν έχει ακόμα επαρκώς διευκρινιστεί. Για τα νεογνά υπάρχουν η υπόθεση της υποδραστικότητας του ανώριμου ανοσολογικού συστήματος με πιθανή την ανάπτυξη ανοχής στο ιικό αντιγόνο HBeAg (182,183). Στους ενήλικες έχει βρεθεί ότι οι απαντήσεις των CD4+ λεμφοκυττάρων που απομονώθηκαν από τα περιφερικά λεμφοκύτταρα είναι λιγότερο έντονες από εκείνες ασθενών με αυτοπεριοριζόμενη νόσο (171,184). Το ίδιο συμβαίνει και με τις HBV-CTL απαντήσεις (185). Ενώ το προφίλ των παραγομένων κυτταροκινών είναι του τύπου 2 (175). Εκτός των ποσοτικών ανωμαλιών του ανοσολογικού συστήματος, είναι πιθανόν να αναπτύσσει και ο ιός κάποιους μηχανισμούς διαφυγής. Όντως υπάρχει μελέτη που αποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη HBx του ιού B μπορεί να επηρεάσει τον μηχανισμό που χρησιμοποιούν τα CTL για να αναγνωρίζουν τις ιικές πρωτεΐνες (64). Ενώ οι μεταλλαγές του ιού κυρίως της υπερμεταβλητής περιοχής του HBsAg δημιουργούν στελέχη του ιού ικανά να διαφεύγουν των εξουδετερωτικών αντισωμάτων κάτι που επιβεβαιώθηκε σε περιπτώσεις χορήγησης υπεράνοσου-γ-σφαιρίνης σε ασθενείς με μεταμόσχευση ήπατος για προφύλαξη από τον ιό B (186,187).

## ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ HCV ΛΟΙΜΩΞΕΩΣ

Διαφορετικά και λιγότερο διευκρινισμένα είναι τα γεγονότα που αφορούν τον ιό C (188). Αρχικά και για τον ιό αυτό διαφαίνεται να ενεργοποιείται η μη ειδική ανοσολογική απάντηση με παραγωγή ιντερφερόνης α και β από τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα και ενεργοποίηση των NK κυττάρων. Ακολουθεί η συμμετοχή της χυμικής και κυτταρικής ανοσίας που συνοδεύει όλες της ενδοκυττάριας ιικές λοιμώξεις. Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών όμως (>75%) αυτές οι ανοσολογικές απαντήσεις δεν είναι ικανές να εκριζώσουν τον ιό. Σε αυτούς τους ασθενείς η λοίμωξη προκαλεί προοδευτικά ηπατοκυτταρική καταστροφή.

## ΧΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

Αναλυτικότερα μετά την ιική λοίμωξη, ιαμμία εμφανίζεται εντός μίας εβδομάδος. Στον ανοσοεπαρκή ασθενή αυτό συνοδεύεται για αρκετές εβδομάδες από υψηλές τρανσαμινάσες στον ορό ενώ ακολουθεί η εμφάνιση διαφόρων anti-HCV αντισωμάτων εναντίον διαφόρων ικών αντιγόνων από δομικές και μη-δομικές περιοχές του ιού. Η κλινική σημασία αυτών των αντιγόνων και αντισωμάτων ως προς τον έλεγχο της λοίμωξης ή την ενδεχόμενη συμμετοχή τους στην ηπατική βλάβη είναι άγνωστη. Έχει αποδειχθεί από ορισμένους ερευνητές η ταχεία επιδείνωση της HCV λοίμωξης σε ασθενείς με διαταραχές της Β-κυτταρικής ανοσίας, κάτι που υπογραμμίζει την σημασία της χυμικής ανοσίας στον έλεγχο της νόσου (189). Επίσης ορισμένα anti-HCV αντισώματα όπως τα anti-NS4 μειώνονται ή και εξαφανίζονται σε ασθενείς που αναρρώνουν από οξεία HCV ηπατίτιδα ή ανταποκρίνονται σε θεραπεία με ιντερφερόνη (190). Και το IgM-anti-HCV έχει δειχθεί να μειώνεται μετά από επιτυχή IFN θεραπεία ενώ ορισμένοι ερευνητές θεωρούν ότι τα επίπεδα του έχουν σχέση με την ενεργότητα της νόσου (191), και άλλοι όχι (192). Γεγονός παραμένει ότι τα αντισώματα αυτά είναι εξουδετερωτικά μόνον για τον ακριβή υπότυπο που προκάλεσε την λοίμωξη, ενώ η ανάπτυξη των «σχεδόν ειδών» (quasispecies) του ιού τού επιτρέπει να ξεφεύγει της εξουδετέρωσης. Αυτός είναι και ο λόγος της αδυναμίας παραγωγής εμβολίου.

Όσον αφορά στην συμμετοχή των αντισωμάτων του ιού στην ηπατοτοξικότητα είτε διαμέσου ενεργοποίησης του συμπληρώματος είτε δια του μηχανισμού της κυτταροτοξικότητας διαμέσου των αντισωμάτων (ADCC), δεν φαίνεται με τις υπάρχουσες μελέτες να είναι σημαντικός. Ο κυριότερος λόγος γι' αυτό είναι ότι *in vitro* & *in vivo* τα αντιγόνα του ιού (core, E1, E2, NS3, NS4) δεν εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη των μολυσμένων ηπατοκυττάρων αλλά στο κυτταρόπλασμα τους (193).

Ενώ ο ακριβής ρόλος της χυμικής ανοσίας στην εξέλιξη της νόσου δεν μπορεί να καθοριστεί, η σημασία της είναι ξεκάθαρη στην εμφάνιση εξωηπατικών αυτοάνοσων φαινομένων κατά την διάρκεια της HCV λοίμωξης. Περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς παρουσιάζουν εκσεσημασμένη ανάπτυξη των CD5+ B λεμφοκυττάρων στον ορό τους (194). Ενεργοποίηση τέτοιων κλώνων έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση αυτοανόσων νοσημάτων όπως της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Σε πολλούς ασθενείς ανιχνεύονται αυτοαντισώματα όπως τα anti-LKM, anti-GOR, τα οποία δεν φαίνεται να έχουν ρόλο στην παθογένεια της νόσου (195,196). Τα τελευταία αντισώματα φαίνεται να προέρχονται από μοριακή μιμητικότητα ανάμεσα σε γονιδιακή σειρά της περιοχής core του HCV και στην ανθρώπινη πρωτεΐνη GOR (197).

## **ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ**

Με όμοιο μηχανισμό εκείνου στην HBV ιική λοίμωξη συμμετέχουν τα CD4+, CD8+ CTL λεμφοκύτταρα στην HCV λοίμωξη. Έχει δειχθεί ότι τα CD4+ T λεμφοκύτταρα απαντούν με πολλαπλασιασμό σε διάφορες ιικές πρωτεΐνες του HCV με τα αντιγόνα της περιοχής NS4 να αποτελούν τα πλέον ανοσοδραστικά. Ιδιαίτερα στα άτομα με HCV, RNA θετικό χωρίς κλινικά ή ιστολογικά ευρήματα νόσου τα CD4+ T λεμφοκύτταρα έχουν σημαντικά μεγαλύτερη πολλαπλασιαστική ικανότητα στις HCV core πρωτεΐνες (73%) απ' ότι οι ασθενείς με χρόνια HCV ηπατίτιδα (10%) (198). Η κάθαρση του ιού έχει συνδεθεί με

ισχυρότερη T-λεμφοκυτταρική πολλαπλασιαστική απάντηση στις core, NS4A και NS5B περιοχές (199).

Από τις ανωτέρω μελέτες που έχουν γίνει σε περιφερικά T λεμφοκύτταρα, διαφαίνεται ότι η δράση των CD4+ λεμφοκυττάρων ελέγχει και προστατεύει περισσότερο παρά προκαλεί ηπατοκυτταρική βλάβη. Τα περισσότερα ενδοηπατικά T λεμφοκύτταρα πάντως δεν είναι ενεργοποιημένα ενάντια στον ιό μια που οι περισσότερες μελέτες στη βιβλιογραφία έδειξαν ότι απομονωμένα ενδοηπατικά λεμφοκύτταρα δεν απαντούν στις ιικές πρωτεΐνες σε όλους τους ασθενείς. Είναι πάντως γενικά παραδεκτό ότι τα άτομα με εντονότερες πολλαπλασιαστικές απαντήσεις στον ιό έχουν περισσότερες πιθανότητες να καθάρουν την λοίμωξη μετά από οξεία προσβολή ή την ιαμμία μετά από θεραπεία με ιντερφερόνη. Όταν η λοίμωξη διαρκεί, τα CD4+ συμμετέχουν στις φλεγμονώδεις διηθήσεις του ήπατος και πιθανόν και στην ηπατική βλάβη (200). Τα CD8+ CTL λεμφοκύτταρα στην προσπάθειά τους να ελέγξουν την ιική λοίμωξη θανατώνουν τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα. Μία διαρκής HCV-ειδική CTL απάντηση που δεν συνοδεύεται από ιική κάθαρση συμβάλλει στην ηπατική βλάβη λόγω της ηπατοκυτταρικής καταστροφής. Η σημασία των CTL στην κάθαρση της ιικής λοίμωξης έχει μελετηθεί σε χιμπατζήδες (201). Διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν απομονώσει στο αίμα και το ήπαρ ασθενών με ηπατίτιδα C, HCV-ειδικά CTL λεμφοκύτταρα (202,203,204). Ακόμα εκφράζονται αυξημένα μόρια προσκολλητικότητας στα φλεγμαίνοντα πυλαία διαστήματα ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα για την στρατολόγηση των λεμφοκυττάρων στην περιοχή (205). Πυλαία και περιπυλαία φλεγμονή στις βιοψίες χρόνιας ηπατίτιδας C σχετίζεται με την παρουσία CTL δραστηριότητας, ενώ παρατηρείται αυξημένη παρουσία των CD8+ στα περιπυλαία διαστήματα και ιδιαίτερα στις περιοχές με γεφυροποιό νέκρωση (202). Ασθενείς με δραστηριοποιημένα HCV-ειδικά CTL λεμφοκύτταρα έχουν επίπεδα HCV-RNA μόνον 0.5-1 log υπογραμμίζοντας την σημασία τους στον έλεγχο της λοίμωξης (206). Σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση c-Fas στην επιφάνεια των μολυσμένων ηπατοκυττάρων κυρίως εκείνων που βρίσκονται κοντά στα διηθούμενα λεμφοκύτταρα. Η σύνδεση του Fas με το Fas-L των CTL CD8+ προκαλεί απόπτωση των μολυσμένων ηπατοκυττάρων (207,208). Δεν είναι όμως ο μηχανισμός της

λύσης δια των κυτταροτοξινών και απόπτωσης των μολυσμένων ηπατοκυττάρων ο μόνος που τα CTL δρουν(209), όπως προαναφέρθηκε και στην Β ηπατίτιδα. (210). Ιδιαίτερη ρόλο διαδραματίζουν και οι κυτταροκίνες TNF-α και IFN-γ που παράγουν τα CTL και αναστέλλουν άμεσα τον ιικό πολλαπλασιασμό (211)

## **ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ**

Στην οξεία αυτοπεριοριζόμενη ηπατίτιδα C τα περιφερικά T λεμφοκύτταρα παράγουν κυρίως IFN-γ εκφράζοντας προφίλ T<sub>H</sub>1 (212). Τα λεμφοκύτταρα ασθενών που καθάρουν την λοίμωξη και δεν προχωρούν σε χρόνια λοίμωξη έχουν ισχυρό T<sub>H</sub>1 προφίλ. Ισχυρή T<sub>H</sub>2 (IL-4, IL-10) απάντηση έχουν αντίθετα τα λεμφοκύτταρα ασθενών με χρόνια λοίμωξη, ενώ δίδουν ηπιότερες T<sub>H</sub>1 απαντήσεις (213). Το ίδιο προφίλ έχει βρεθεί από άλλες ερευνητικές ομάδες στα περιφερικά λεμφοκύτταρα και στα λεμφοκύτταρα που διηθούν το ήπαρ (214,215,216). Μία ενδιαφέρουσα μελέτη του Reiser και συνεργατών ανέδειξε αυξημένα επίπεδα στον ορό IL-4 και IL-10 παρ' ότι τα T<sub>H</sub>2 λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα που διηθούσαν το ήπαρ των ίδιων ασθενών ήταν μόνον η μειονότητα. Ερμήνευσε το γεγονός με την υπόθεση ότι η παραγωγή αυτών των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών στοχεύει στην καταστολή της T<sub>H</sub>1 επαγόμενης κυτταρικής ανοσίας η οποία ευθύνεται για ηπατοκυτταρική καταστροφή (217). Από τα υπάρχοντα δεδομένα φαίνεται ότι η HCV λοίμωξη αρχικά ενεργοποιεί μέσα στο ήπαρ απάντηση τύπου 1 που προσπαθεί να αναστείλει τον ιικό πολλαπλασιασμό και να λύσει τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα. Στις περιπτώσεις χρόνιας ηπατίτιδας για άγνωστο λόγο ο μηχανισμός αυτός είναι ανεπαρκής με αποτέλεσμα την διατήρηση της λοίμωξης και την διαρκή ηπατοκυτταρική βλάβη. Η ενεργοποίηση ως εκ τούτου της T<sub>H</sub>2 απάντησης έξω από το ήπαρ στοχεύει στον περιορισμό της βλάβης στο ήπαρ, ενώ η αιτιολογική συμμετοχή της στην εξέλιξη της λοίμωξης σε χρόνια υποστηρίζεται από ορισμένους ερευνητές αλλά δεν μπορεί να αποδειχθεί..

## **ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

Αλληλίου του συστήματος ιστοσυμβατότητας HLA , έχουν συσχετισθεί με ευπάθεια (I B54) ή ανθεκτικότητα (DR5, DR13) στον ιό C (218,219,220). Ο HCV ιδιαίτερα σε υψηλή ιαίμια έχει άμεση κυτταροτοξικότητα κάτι που όμως έχει κλινική σημασία μόνον όταν καταστάσεις που αφορούν τον ξενιστή επιτρέπουν τον ιδιαίτερα υψηλό ιικό πολλαπλασιασμό (221). Ιικές συνλοιμώξεις, κατάχρηση αλκοόλ και ηπατοτοξικών φαρμάκων είναι περιβαλλοντολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν την παθογένεια της ηπατίτιδας C.



## ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΗΑΥ

Πρόκειται για RNA ribonucleoprotein. Μετά την λοίμωξη φθάνει στο ήπαρ διαμέσου της πυλαίας κυκλοφορίας. Μελέτες σε κυτταρικές καλλιέργειες απέδειξαν ότι εισέρχεται μέσα στα ηπατοκύτταρα συνδεδεμένος με ασιαλογλυκοπρωτεϊνικούς υποδοχείς τους ίδιους που χρησιμοποιούν οι ανοσοσφαιρίνες IgA, είτε μόνος του είτε συνδεδεμένος με IgA. Αυτό εξηγεί και την ενίοτε υποτροπιάζουσα μορφή της οξείας νόσου που εκδηλώνεται παρά την εμφάνιση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων (222). Τελευταία έχει αναδειχθεί πάλι σε κυτταρικές καλλιέργειες και άλλος κυτταρικός υποδοχέας του ιού ο *haver-1* (223). Θεωρείται και στην περίπτωση του ιού Α όπως και για τους άλλους δύο ιούς, ότι η κυτταρική ανοσία μέσω της καταστροφής των μολυσμένων ηπατοκυττάρων και η χυμική ανοσία με την παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων είναι υπεύθυνες για την ιική κάθαρση (224).

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βαρύνουσα σημασία στην καταστροφή του ηπατοκυττάρου κατά την διάρκεια οξείας ιογενούς ηπατίτιδας έχει δοθεί στην κυτταρική ανοσία, ενώ άλλοι μηχανισμοί ηπατοκυτταρικής καταστροφής δεν έχουν επακριβώς μελετηθεί.

Σκοπός της παρούσης μελέτης αποτελεί η ανίχνευση νέων επιπρόσθετων μοντέλων καταστροφής του ηπατοκυττάρου διαμέσου παραγωγής χυμικών παραγόντων, κατά την διάρκεια οξείας ιογενούς ηπατίτιδας. Η υπόθεση που θα ελεγχθεί βασίζεται στο γεγονός ότι αντιγόνα των ιών της ηπατίτιδας A, B, και C παρουσιάζονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (κυρίως κύτταρα Kupffer) στα CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα προκαλούν την παραγωγή μιας σειράς κυτταροκινών που οδηγούν στην ενεργοποίηση της πρωτογενούς και δευτερογενούς ανοσιακής απάντησης. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, το κύτταρο Kupffer δρα και ως δραστικό κύτταρο (effector cell) παράγοντας χυμικούς παράγοντες εκ νέου που συμβάλλουν στην ηπατοκυτταρική καταστροφή.

Ειδικότερα, μετά από την φαγοκυττάρωση ιού από ένα κύτταρο Kupffer ακολουθεί η ενζυματική του επεξεργασία και εμφάνιση αντιγόνων του στην επιφάνεια του κυττάρου συνδεδεμένα με αντιγόνα ιστοσυμβατότητας της τάξεως II (MHC II), όπου αναγνωρίζεται και συνδέεται με ένα T λεμφοκύτταρο. Αρχίζει παράλληλα η έκκριση από τα κύτταρα Kupffer προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α) με αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσεως και επαγωγίσιμης συνθετάσης μονοξειδίου του αζώτου (iNOS) από τα ηπατοκύτταρα, και την ενεργοποίηση της δευτερογενούς ανοσολογικής απάντησης. Επιπρόσθετα παράγουν άλλους χυμικούς παράγοντες όπως πρωτεολυτικά ένζυμα, λιπολυτικά ένζυμα, λευκοτριένια και μονοξείδιο του αζώτου, που προκαλούν διάσπαση της εξωκυτταρίου θεμελίου ουσίας του Disse και καταστροφή της μεμβράνης των μολυσμένων ηπατοκυττάρων ή μη. Με την ενεργοποίηση της δευτερογενούς ανοσολογικής απάντησης τα CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα τύπου T<sub>H</sub>0 αναγνωρίζουν στην επιφάνεια των κυττάρων Kupffer τα ιικά αντιγόνα με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους καθώς και την παραγωγή νέων κυτταροκινών που ανάλογα με το είδος τους προκαλούν την διαφοροποίηση των T<sub>H</sub>0 λεμφοκυττάρων σε λεμφοκύτταρα τύπου T<sub>H</sub>1 (IL-2, IL-12, IFN-γ) ή T<sub>H</sub>2 (IL-4, IL-

10). Η  $T_H1$  ανοσολογική απάντηση έχει ως αποτέλεσμα την ενδυνάμωση της κυτταρικής ανοσίας διαμέσου των κυτταροτοξικών  $CD8^+$  T λεμφοκυττάρων και NK (CTL). Με την εμφάνιση της τύπου 2 ανοσολογικής απάντησης αποκαθίσταται η φυσιολογική ομοιόσταση. Αφ' ενός καταστέλλονται οι φλεγμονώδεις διεργασίες της τύπου 1 κυτταρικής ανοσίας αφ' ετέρου παράγονται προστατευτικά αντισώματα και κλώνοι B για την ανοσιακή μνήμη.

## ΣΚΟΠΟΣ

Μελέτη των τριών σκελών της ανοσολογικής απάντησης διαμέσου της μέτρησης στον ορό των κυτταροκινών που συνδέονται με αυτές καθώς και ορισμένων από τους χημικούς παράγοντες που θεωρούμε ότι μετέχουν στις φλεγμονώδεις διεργασίες. Αναλυτικότερα:

**Πρωτογενής ανοσολογική απάντηση:** *Κυτταροκίνες (IL-1, IL6, TNF- $\alpha$ ) , πρωτείνες οξείας φάσεως (C αντιδρώσα πρωτεΐνη CRP, C3 παράγων του συμπληρώματος, σερουλοπλασμίνη CER,  $\alpha 1$  αντιθρυψίνη AAT, αποσφαιρίνη HAP), αναστολείς των πρωτεολυτικών ενζύμων ( $\alpha 1$  αντιθρυψίνη AAT,  $\alpha 2$  μακροσφαιρίνη AMG),*

**Τύπου 1 ανοσολογική απάντηση:** *Κυτταροκίνες (IL-2, IL12, IFN-  $\gamma$ )*

**Τύπου 2 ανοσολογική απάντηση:** *Κυτταροκίνες (IL-4, IL10), κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα.*

**Μονοξειδίο του αζώτου (NO) και TGF- $\beta$**

**Μεταλλοπρωτεάσες (MMP-1, MMP-3, MMP-2, MP-9) και ιστικοί αναστολείς αυτών (TIMP-1, TIMP-2)**

## ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Η επιλογή ασθενών και συλλογή ορών διήρκησε δύο έτη. Κριτήρια εισόδου στην μελέτη αποτελούσαν:

- Κλινική και εργαστηριακή εικόνα συμβατή με οξεία ηπατίτιδα
- ηλικία από 16-65 ετών
- απουσία χρόνιας ηπατοπάθειας
- κατανάλωση αλκοόλ μικρότερη από 10 gr την ημέρα για τις γυναίκες και 20 gr την ημέρα για τους άνδρες

- συγκατάθεση

#### Κριτήρια αποκλεισμού

- συστηματικό χρόνιο νόσημα
- συστηματική λήψη ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων
- συν-λοίμωξη από άλλο ιό ηπατίτιδας
- παρουσία θετικών αυτοαντισωμάτων ANA>1/80

Από το 1995 έως 1997, 19 διαδοχικοί ασθενείς με οξεία ιογενή ηπατίτιδα που πληρούσαν τα κριτήρια εισόδου συμπεριελήφθησαν στην μελέτη. Πρόκειται για 12 άνδρες και 7 γυναίκες διάμεσης ηλικίας 24 ετών (εύρος 16-65 ετών). Η εισαγωγή όλων των ασθενών στην Γαστρεντερολογική Κλινική έγινε τις πρώτες ημέρες της εμφάνισης του ικτέρου.

Από ιό HAV έπασχαν 2 ασθενείς, όπως απεδείχθη από την παρουσία στον ορό θετικών IgM anti-HAV αντισωμάτων. Από ιό HCV έπασχαν 2 ασθενείς, όπως απεδείχθη από την παρουσία anti-HCV και θετική PCR για το RNA του ιού HCV. Οι υπόλοιποι 15 ασθενείς παρουσίαζαν ορολογική εικόνα συμβατή με λοίμωξη από τον ιό HBV δηλαδή HBsAg θετικό, HBeAg θετικό, IgM HBcAg θετικό και IgG HBcAg θετικό. 1 ασθενής με ηπατίτιδα B και οι δύο ασθενείς με ηπατίτιδα C ακολούθως ανέπτυξαν χρόνια ηπατίτιδα, όπως επιβεβαιώθηκε από βιοψία ήπατος στην οποία υποβλήθηκαν 9 μήνες μετά την οξεία ηπατίτιδα. Η οξεία ηπατίτιδα στους υπόλοιπους ασθενείς (14 με οξεία B και 2 με οξεία A) ιάθη πλήρως και τα αντιγόνα των ιών εξαφανίσθηκαν μετά πάροδο τριών μηνών. Σε κανέναν ασθενή η νόσος δεν έλαβε κεραυνοβόλο μορφή, σε όλους η πορεία της νόσου ήταν ομαλή ήπια και χωρίς επιπλοκές.

Δημογραφικά και βιοχημικά ευρήματα για τους ασθενείς παρουσιάζονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11

**ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΣΘΕΝΩΝ**

No	Ασθ.	Ιός	Φύλο	Ηλ.	SGOT/SGPT U/L	Αλβ. mg/dl	Χολερυθρίνη mg/dl	PT/s ec	Έκβασ η
1	NN	HAV	Γ	20	2070/2125	3.5	12/9.5	14	Ίαση
2	EO	HAV	A	22	1850/2220	3.5	8.1/5.8	12.5	Ίαση
3	ΣΓ	HCV	Γ	23	475/640	3.9	3.3/2.6	13	ΧΕΗ
4	BE	HCV	A	41	1110/1565	3.2	3.04/2	13	ΧΕΗ
5	MZ	HBV	Γ	52	3140/3270	3.3	15.2/10.2	14.5	Ίαση
6	ΤΑ	HBV	Γ	24	1660/2140	3.1	5.1/4	13.5	Ίαση
7	ΠΕ	HBV	Γ	47	1155/1311	3.9	2.1/2	13	Ίαση
8	ΛΠ	HBV	Γ	16	1250/1710	4	17.7/13.5	15.5	Ίαση
9	ΖΑ	HBV	Γ	65	1500/2120	3.6	5/4.1	12.5	Ίαση
10	ΣΠ	HBV	A	24	1800/2825	4.3	16.7/8.7	13.5	Ίαση
11	ΚΜ	HBV	A	52	2340/3005	3.8	29/25.5	13	Ίαση
12	ΜΓ	HBV	A	21	1270/1500	4.6	24.5/21.8	13	Ίαση
13	ΓΕ	HBV	A	17	965/2085	4.9	8.6/5	13	Ίαση
14	ΠΚ	HBV	A	28	1596/2166	3.7	23.4/18	12.5	Ίαση
15	ΒΠ	HBV	A	22	1662/3510	3.4	3.8/2.3	13	Ίαση
16	ΚΜ	HBV	A	26	3280/3930	3.2	13/9	20	Ίαση
17	ΠΕ	HBV	A	19	1051/1936	4.7	5.1/3.05	13	Ίαση
18	ΜΑ	HBV	A	31	724/1245	5.1	1.1/0.51	13.5	ΧΕΗ
19	ΜΜ	HBV	A	19	1735/3175	4.3	12.8/8.9	13.5	Ίαση

**Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 15 αιμοδότες (8 άνδρες), διάμεσης ηλικίας 29 ετών (εύρος 18-45 ετών).**

## **ΜΕΘΟΔΟΙ**

Αιμοληψία εγένετο κατά την πρώτη και τρίτη ημέρα της εισόδου των ασθενών στην Γαστρεντερολογική Κλινική, το πρωί στις 8π.μ. και το απόγευμα στις 6 μ.μ. Μετά από τη δημιουργία πήγματος σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθούσε φυγοκέντριση στους 3000 κύκλους το λεπτό για 10 λεπτά και κατάψυξη των ορών στους  $-80^{\circ}$  C. Μετά την συλλογή των ορών 19 ασθενών, ακολούθησαν οι μετρήσεις στον ορό των ασθενών και στον κατεψυγμένο ορό των αιμοδοτών.

### **1 Κυτταροκίνες**

Οι μετρήσεις των κυτταροκινών έγιναν με εμπορικά διαθέσιμη ELISA (R and D Systems Inc, Minneapolis, MN), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **2 Πρωτεΐνες οξείας φάσεως**

Οι μετρήσεις των πρωτεϊνών οξείας φάσεως έγιναν με νεφελομετρία χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια (kits) και το νεφελόμετρο QM-300 (Callestad-Pasteur, France).

### **3 Ανοσοσυμπλέγματα**

Τα ανοσοσυμπλέγματα μετρήθηκαν επίσης με εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια (N Latex CIC) σε νεφελόμετρο Behring.

### **4 Μεταλλοπρωτεάσες και αναστολείς**

Οι μετρήσεις των μεταλλοπρωτεασών έγιναν με δύο μεθόδους:

1. ELISA



Τα επίπεδα στον ορό των MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 και TIMP-2 μετρήθηκαν με Biotrack enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, UK). Τα αντιδραστήρια για την μέτρηση της MMP-1 ELISA αναγνωρίζουν την ελεύθερη MMP-1 και την MMP-1 συνδεδεμένη με τον αναστολέα της TIMP-1 αλλά όχι τα συμπλέγματα AMG-MMP-1. Τα αντιδραστήρια MMP-2 και MMP-9 ELISAs αναγνωρίζουν τις προ-ενζυμικές μορφές είτε ελεύθερες είτε συνδεδεμένες με τους TIMP αλλά όχι τις ενεργές μορφές των ενζύμων. Τα MMP-3 ELISA αναγνωρίζουν τις προ-ενζυμικές ανενεργές και τις ενεργές μορφές είτε ελεύθερες είτε συνδεδεμένες με τους αναστολείς TIMPS. Οι ELISAs για τους αναστολείς TIMP-1 and TIMP-2 αναγνωρίζουν τις ελεύθερες μορφές και τις συνδεδεμένες με τις pro-MMPs.

## 2. Gelatin zymography

Τα επίπεδα στον ορό των MMP-2 και -9 μετρήθηκαν με zymogram protease assays, τα οποία αναγνωρίζουν τις ενεργές και προ-ενζυμικές μορφές των κυκλοφορούντων ενζύμων είτε ελεύθερων είτε συνδεδεμένων με τα TIMPs. 10% SDS polyacrylamide gels που περιέχουν 0.1% γελατίνη ως υπόστρωμα (Zymogram ready gels, Biorad, USA) χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση. Μετά την ηλεκτροφόρηση τα gel ξεπλύθηκαν με 1.5% Triton X-100 σε ένα περιστροφικό shaker για 60 λεπτά για να απομακρυνθεί το SDS. Κατόπιν το gel επώαστηκε μία νύχτα σε buffer (50mM Tris/HCl, pH 8.0, 200mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2% Brij 35) στους 37°C, σε χρώση με Coomassie brilliant blue R-250 και κατόπιν 10% acetic acid-20% methanol σε νερό. Η μέτρηση της ενεργότητας MMP έγινε με πυκνόμετρο (densitometer) συνδεδεμένο σε σύστημα θεμελιώσεως και αναλύσεως των gels (Quantiscan<sup>TM</sup>, Biosoft, Cambridge, UK). Σε κάθε gel περιλαμβάνοντο standards σε εν σειρά διαλύσεις που απετελούντο από ανασυνδυασμένες ενεργοποιημένες MMP-2 και MMP-9 (Oncogene Research Products, California, USA) και η ολική δραστηριότητα των MMP-2 και MMP-9 ορού υπολογιζέτο βάσει σταθεράς καμπύλης που προέκυπτε από τον υπολογισμό των standards.

## 5 Μονοξείδιο του αζώτου

Υλικά: HEPES της MERCK (Darmstadt Germany). Nitrate reductase (from *Aspergillus* species), L-lactic dehydrogenase, pyruvic acid (sodium salt), NADPH (reduced form, tetrasodium salt), FAD (disodium salt), N-(1-naphthyl)ethyl-enediamine και sulfanilamide της SIGMA (Munche, Germany).

Για τον προσδιορισμό της συστηματικής παραγωγής του NO, μετρήθηκε η συγκέντρωση στον ορό των δειγμάτων των ολικών νιτρικών (nitrite, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) και νιτρωδών (nitrate, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Χρησιμοποιήθηκε μία παραλλαγή της αντίδρασης Griess όπως περιγράφηκε από τον Grisham και συνεργάτες (121). Συνοπτικά 100μl ορού επώαστηκαν για 60 min στους 37°C παρουσία 0.2U/ml *Aspergillus nitrate* αναγωγάσης, 5μM FAD, 0.1mM NADPH σε 50mM HEPES buffer (συνολικός όγκος 500μl) για την μετατροπή των NO<sub>3</sub><sup>-</sup> σε NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Μετά την επώαση, 5μl γαλακτικής αφυδρογονάσης (1500U/ml) και 50μl από 100mM πυρουβικού οξέος προστέθηκαν σε κάθε σωληνάριο για την οξείδωση όλου του NADPH. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο διότι παρουσία περίσσειας NADPH επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα, αποδίδοντας ψευδώς χαμηλές τιμές. Τα δείγματα επώαστηκαν για 10 min ακόμα σε 37°C. Τέλος 1ml του αντιδραστηρίου Griess προσετέθη σε κάθε σωληνάριο. Μετά από 10 min επώαση σε θερμοκρασία δωματίου η απορρόφηση κάθε δείγματος μετρήθηκε στα 543 nm με Hitachi U-2000 Spectrophotometer.

## ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 8. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ± πιθανό σφάλμα (mean ± SEM). Τα δεδομένα και οι διαφορές ανάμεσα στις ομάδες αναλύθηκαν με το Student's *t*-test για τα ασύζευκτα δεδομένα (unpaired data). Οι συσχετίσεις ανάμεσα στις διάφορες ατομικές μεταβλητές έγιναν με την μέθοδο Pearson test (linear regression analysis). Η μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney *U*-test χρησιμοποιήθηκε για τις συγκρίσεις ανάμεσα στις ομάδες στις περιπτώσεις των CRP, INF-γ,

IL-2, IL-4, IL-6 and IL-10, όπου τα δεδομένα δεν είχαν φυσιολογική κατανομή. Χρησιμοποιήθηκαν το κατά ζεύγη (paired) Student's *t* test και Wilcoxon signed-rank test για την σύγκριση των πρωινών και απογευματινών αποτελεσμάτων των τριών ημερών. Στην περίπτωση της IL-2, 18/19 ασθενείς και στην περίπτωση του TNF-α όλες οι τιμές των φυσιολογικών μαρτύρων είχαν τιμές κατώτερες από τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου. Για στατιστικούς λόγους οι τιμές αυτές θεωρήθηκαν 0. Η μέθοδος της Factor analysis χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση πιθανών διαφορών μέσα στο σύνολο των ασθενών με οξεία ηπατίτιδα και των αιμοδοτών. A two-tailed value of  $P < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Η μέθοδος της factor analysis δεν ανέδειξε διαφορές ανάμεσα στις τρεις υποομάδες των ασθενών με HAV, HBV και HCV οξεία ηπατίτιδα (διάγραμμα 2), ώστε τελικά αναλύθηκαν ως μία ομάδα. Ουδεμία σημαντική ημερήσια διακύμανση ή διαφορές ανάμεσα στην πρώτη και τρίτη ημέρα νοσηλείας παρατηρήθηκαν στις συγκεντρώσεις του ορού των κυτταροκινών, πρωτεϊνών οξείας φάσεως, μεταλλοπρωτεασών και αναστολέων, NO και ανοσοσυμπλεγμάτων. Έτσι αναλύθηκε η μέση τιμή για τον κάθε ασθενή.

### ***Κυτταροκίνες***

*Κυτταροκίνες της αρχέγονης ανοσίας:* Οι τιμές στον ορό του TNF-α βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένες στους ασθενείς ( $6.7 \pm 1.2$  pg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου όπου ο TNF-α ήταν μη ανιχνεύσιμος ( $p < 0.001$ ). Παρόμοιο προφίλ βρέθηκε για τις άλλες δύο προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-6 και IL-1β, δηλαδή, στους ασθενείς οι τιμές ήταν  $5.8 \pm 1.4$  pg/ml και  $2.1 \pm 0.2$  pg/ml ενώ στην ομάδα ελέγχου ήταν  $1.9 \pm 0.2$  pg/ml ( $p < 0.05$ ) και  $1.4 \pm 0.1$  pg/ml αντίστοιχα ( $p < 0.01$ ) (διάγραμμα 3).

*Th1 κυτταροκίνες:* Η IL-2, η κατ' εξοχή τύπου 1 κυτταροκίνη, βρέθηκε σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ( $0.84 \pm 0.8$  pg/ml έναντι  $4.01 \pm 0.5$  pg/ml

$p < 0.0001$ ). Οι τιμές της IL-12 βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερες στους ασθενείς από την ομάδα ελέγχου, ( $5.8 \pm 0.6 \text{ pg/ml}$  έναντι  $4 \pm 0.5 \text{ pg/ml}$ ,  $p < 0.05$ ). Η IFN- $\gamma$  επίσης βρέθηκε αυξημένη στους ασθενείς από ότι στην ομάδα ελέγχου ( $3.76 \pm 0.6$  έναντι  $1.29 \pm 0.1 \text{ pg/ml}$ ,  $p < 0.0001$ ) (διάγραμμα 4).

*Th2 κυτταροκίνες*: Οι ασθενείς βρέθηκε να έχουν σημαντικά υψηλότερες IL-4 τιμές ( $1.93 \pm 0.4 \text{ pg/ml}$ ) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $1.17 \pm 0.1 \text{ pg/ml}$ ) ( $p < 0.001$ ) όπως και αυξημένες τιμές IL-10 ( $17.3 \pm 4.7 \text{ pg/ml}$  έναντι  $4.9 \pm 0.42 \text{ pg/ml}$ ,  $p < 0.001$ ) (διάγραμμα 5).

*TGF- $\beta$* : Τα επίπεδα στον ορό του TGF- $\beta$  στους ασθενείς βρέθηκαν αυξημένα ( $9.6 \pm 2.6 \text{ pg/ml}$ ), σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $2 \pm 0.3 \text{ pg/ml}$ ,  $P < 0.05$ ) (διάγραμμα 3).

Οι συσχετίσεις των κυτταροκινών με τις τρανσαμινάσες, τις πρωτεΐνες οξείας φάσεως, τα CIC και μεταξύ τους φαίνονται στον πίνακα 12.

Ανάμεσα στις κυτταροκίνες και τις τρανσαμινάσες βρέθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των τιμών SGOT και TGF- $\beta$ . Ειδικότερα μεταξύ SGOT και TGF- $\beta$  ( $r = -0.464$  με  $p = 0.04$ ).

Μεταξύ των κυτταροκινών υπάρχουν οι εξής σημαντικές συσχετίσεις ( $P < 0.05$ ) που αναγράφονται με κόκκινο στον πίνακα 12:

- Η IL-4 με την INF- $\gamma$  ( $r = 0.611$ ,  $p = 0.0001$ ) και τον TNF- $\alpha$  ( $r = 0.557$ ,  $p = 0.01$ )
- Η INF- $\gamma$  εκτός από την θετική της συσχέτιση με την IL-4, συσχετίσθηκε θετικά με την IL-6 ( $r = 0.462$ ,  $p = 0.01$ ) και αρνητικά με την IL-2 ( $r = -0.355$ ,  $p = 0.03$ )
- Ο TNF- $\alpha$  εκτός από την θετική του συσχέτιση με την IL-4, συσχετίσθηκε θετικά με την IL-12 ( $r = 0.582$ ,  $p = 0.008$ )
- Η IL-2 εκτός από την αρνητική του συσχέτιση με την INF- $\gamma$ , συσχετίσθηκε αρνητικά με τον TGF- $\beta$  ( $r = -0.358$ ,  $p = 0.03$ )

Πίνακας 12																		
Συσχέτιση με Pearson Correlation των τρανσαμινασών, κυτταροκινών, πρωτεϊνών οξείας φάσεως και ανοσοσυμπλεγμάτων																		
		SGOT	SGPT	IL-1β	IL-4	INF-γ	TNF-α	IL-6	IL-2	IL-10	IL-12	TGF-β	C3	AAT	HAP	CER	CRP	CIC
SGOT	r=	1	<b>0.84</b>	0.131	0.07	0.17	-0.07	0.32	-0.2	0.17	0.13	<b>-0.46</b>	<b>-0.4</b>	0.19	0.08	0.24	0.29	0.13
	p=		<b>0</b>	0.593	0.78	0.5	0.769	0.18	0.44	0.5	0.6	<b>0.05</b>	<b>0.09</b>	0.45	0.73	0.32	0.22	0.59
SGPT	r=	<b>0.84</b>	1	0.226	0.01	0.11	-0.12	0.2	-0.3	0.18	0.01	-0.09	-0.34	0.22	0.04	0.26	0.23	0.07
	p=	<b>0</b>		0.353	0.98	0.65	0.614	0.41	0.16	0.46	0.97	0.72	0.16	0.38	0.87	0.29	0.34	0.78
IL-1β	r=	0.13	0.23	1	0.22	0.27	0.028	0.2	-0.3	0.11	0.06	0.28	0.2	0.19	-0.34	0.14	0.31	0.13
	p=	0.59	0.35		0.2	0.12	0.911	0.3	0.15	0.52	0.72	0.1	0.25	0.43	0.05	0.44	0.07	0.61
IL-4	r=	0.07	0.01	0.224	1	<b>0.61</b>	<b>0.558</b>	-0.12	-0.2	0.06	0.27	0.02	0.22	0.3	-0.23	0.27	0.07	-0.04
	p=	0.78	0.98	0.203		<b>0</b>	<b>0.013</b>	0.52	0.19	0.73	0.12	0.93	0.2	0.08	0.19	0.13	0.7	0.88
INF-γ	r=	0.17	0.11	0.271	<b>0.61</b>	1	0.149	<b>0.46</b>	<b>-0.4</b>	0.31	0.06	0.06	0.28	0.26	-0.16	<b>0.47</b>	0.14	0.16
	p=	0.5	0.65	0.122	<b>0</b>		0.542	<b>0.01</b>	<b>0.04</b>	0.07	0.75	0.73	0.24	0.29	0.52	<b>0.04</b>	0.42	0.5
TNF-α	r=	-0.1	-0.12	0.028	<b>0.56</b>	0.15	1	-0.06	0.04	-0.1	<b>0.58</b>	-0.1	-0.02	-0.01	-0.27	-0.1	-0.2	-0.04
	p=	0.77	0.61	0.911	<b>0.01</b>	0.54		0.82	0.88	0.7	<b>0.01</b>	0.67	0.92	0.98	0.27	0.78	0.5	0.86
IL-6	r=	0.32	0.2	0.201	-0.1	<b>0.46</b>	-0.06	1	-0.2	0.04	0.16	0.04	0.31	0.34	-0.25	0.4	0.24	0.26
	p=	0.18	0.41	0.295	0.52	<b>0.01</b>	0.818		0.33	0.85	0.4	0.83	0.1	0.16	0.31	0.09	0.21	0.28
IL-2	r=	-0.2	-0.33	-0.25	-0.2	<b>-0.36</b>	0.036	-0.19	1	-0.2	-0.1	<b>-0.36</b>	-0.15	0.06	0.29	-0.3	-0.3	-0.23
	p=	0.44	0.16	0.149	0.19	<b>0.04</b>	0.883	0.33		0.17	0.49	<b>0.04</b>	0.39	0.8	0.09	0.14	0.05	0.35
IL-10	r=	0.17	0.18	0.114	0.06	0.31	-0.09	0.04	-0.2	1	0.05	-0.1	0.04	0.16	-0.21	0.19	<b>0.47</b>	-0.24
	p=	0.5	0.46	0.519	0.73	0.07	0.702	0.85	0.17		0.78	0.58	0.84	0.51	0.23	0.28	<b>0.04</b>	0.33
IL-12	r=	0.13	0.01	0.064	0.27	0.06	<b>0.583</b>	0.16	-0.1	0.05	1	0.04	0.01	0.21	-0.22	0.14	0.34	-0.21
	p=	0.6	0.97	0.719	0.12	0.75	<b>0.009</b>	0.4	0.49	0.78		0.83	0.95	0.23	0.2	0.42	0.05	0.38
TGF-β	r=	<b>-0.5</b>	-0.09	0.284	0.02	0.06	-0.1	0.04	<b>-0.4</b>	-0.1	0.04	1	<b>0.37</b>	0.22	-0.19	0	-0	0.1
	p=	<b>0.05</b>	0.72	0.103	0.93	0.73	0.673	0.83	<b>0.04</b>	0.58	0.83		<b>0.03</b>	0.22	0.45	0.98	0.81	0.67
C3	r=	-0.4	-0.34	0.204	0.22	0.28	-0.02	0.31	-0.2	0.04	0.01	<b>0.37</b>	1	<b>0.58</b>	-0.2	<b>0.52</b>	0.19	<b>0.57</b>
	p=	0.09	0.16	0.247	0.2	0.24	0.923	0.1	0.39	0.84	0.95	<b>0.03</b>		<b>0.01</b>	0.2	<b>0.02</b>	0.23	<b>0.01</b>
AAT	r=	0.19	0.22	0.193	0.3	0.26	-0.01	0.34	0.06	0.16	0.21	0.22	<b>0.58</b>	1	0.39	<b>0.72</b>	<b>0.5</b>	0.39
	p=	0.45	0.38	0.428	0.08	0.29	0.984	0.16	0.8	0.51	0.23	0.22	<b>0.01</b>		0.1	<b>0</b>	<b>0.03</b>	0.1
HAP	r=	0.08	0.04	-0.34	-0.2	-0.16	-0.27	-0.25	0.29	-0.2	-0.2	-0.19	-0.2	0.39	1	<b>0.57</b>	<b>0.58</b>	0.17
	p=	0.73	0.87	0.05	0.19	0.52	0.272	0.31	0.09	0.23	0.2	0.45	0.2	0.1		<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	0.47
CER	r=	0.24	0.26	0.138	0.27	<b>0.47</b>	-0.07	0.4	-0.3	0.19	0.14	0	<b>0.52</b>	<b>0.72</b>	<b>0.57</b>	1	0.38	<b>0.48</b>
	p=	0.32	0.29	0.437	0.13	<b>0.04</b>	0.778	0.09	0.14	0.28	0.42	0.98	<b>0.02</b>	<b>0</b>	<b>0.01</b>		0.11	<b>0.04</b>
CRP	r=	0.29	0.23	0.315	0.07	0.14	-0.17	0.24	-0.3	<b>0.47</b>	0.34	-0.04	0.19	<b>0.5</b>	<b>0.58</b>	0.38	1	-0.06
	p=	0.22	0.34	0.07	0.7	0.42	0.499	0.21	0.05	<b>0.04</b>	0.05	0.81	0.23	<b>0.03</b>	<b>0.01</b>	0.11		0.81
CIC	r=	0.13	0.07	0.126	-0	0.16	-0.04	0.26	-0.2	-0.2	-0.2	0.1	<b>0.57</b>	0.39	0.17	<b>0.48</b>	-0.1	1
	p=	0.59	0.78	0.607	0.88	0.5	0.86	0.28	0.35	0.33	0.38	0.67	<b>0.01</b>	0.1	0.47	<b>0.04</b>	0.81	

Ανάλυση των συγκεντρώσεων των κυτταροκινών σε σχέση με τον ιό ή την έκβαση της νόσου δεν έδειξε σημαντικές συσχετίσεις.

Πρωτεΐνες οξείας φάσεως:

**Οι μέσες τιμές των πρωτεϊνών οξείας φάσεως των ασθενών και της ομάδας ελέγχου καταγράφονται στον πίνακα 13:**

Πίνακας 13

	CRP	AAT	C3	CER	HAP
Ασθενείς	1.09±0.2mg/dl	240±12 mg/dl	147±12mg/dl	43±2 mg/dl	48±8 mg/dl
Μάρτυρες	<0.5 mg/dl	142±5 mg/dl	106±3mg/dl	38±2 mg/dl	115±12 mg/dl
P values	P<0.001	P<0.001	P<0.01	NS	P<0.001

Οι τιμές εκφράζονται σαν mean ± SEM, NS = μη στατιστικά σημαντικό

Οι τιμές των C αντιδρώσης πρωτεΐνης (CRP), α1 αντιθρυψίνης (AAT) και του παράγοντα του συμπληρώματος C3 ήταν σημαντικά αυξημένες στους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Οι τιμές της σερουλοπλασμίνης (CER) βρέθηκαν αυξημένες αλλά χωρίς σημαντική διαφορά. Σε αντίθεση η αποσφαιρίνη (HAP) βρέθηκε σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Οι συσχετίσεις των πρωτεϊνών οξείας φάσεως με τις τρανσαμινάσες, τις κυτταροκίνες και μεταξύ τους φαίνονται στον πίνακα 12.

Η συσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνών οξείας φάσεως και των τρανσαμινασών δεν ανέδειξε σημαντικές συσχετίσεις.

Μεταξύ των πρωτεϊνών οξείας φάσεως συσχετίστηκαν θετικά (αναγράφονται με κόκκινο στον πίνακα 12):

- η CER με την C3 ( $r = 0.520, p=0.02$ ), την CRP ( $r = 0.382, p=0.01$ ) και την HAP ( $r = 0.570, p=0.01$ )

- η AAT με την CER ( $r = 0.716, p=0.0005$ ), με την C3 ( $r = 0.576, p=0.009$ ) και με την CRP ( $r = 0.499, p=0.02$ )
- η HAP και με την CRP ( $r = 0.578, p=0.009$ )

Μεταξύ των πρωτεϊνών οξειάς φάσεως και των κυτταροκινών συσχετίστηκαν θετικά (αναγράφονται με κόκκινο στον πίνακα 12):

- Το C3 με τον TGF- $\beta$  ( $r = 0.368, p=0.03$ )
- Η CER με την INF- $\gamma$  ( $r = 0.465, p=0.04$ ) και
- Η CRP με την IL-10 ( $r = 0.472, p=0.04$ )

#### Ανοσοσυμπλέγματα (CIC):

Τα CIC στους ασθενείς είχαν μέση τιμή σημαντικά μεγαλύτερη στους ασθενείς από την ομάδα ελέγχου ( $p<0.001$ ). Αναλυτικότερα βρέθηκαν στους ασθενείς  $4.87\pm 0.72$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Οι αντίστοιχες τιμές στην ομάδα ελέγχου ήταν  $2.03\pm 0.36$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  (διάγραμμα 6).

Τα CIC συσχετίστηκαν θετικά με την C3 ( $r = 0.572, p=0.01$ ) και με την CER ( $r = 0.483, p=0.03$ ). Οι λοιπές συσχετίσεις τους με τις τρανσαμινάσες, κυτταροκίνες και πρωτεΐνες οξειάς φάσεως αναγράφονται στον πίνακα 12, με το NO στον πίνακα 14 και με τις MMPs και αναστολείς στον πίνακα 16.

#### Μονοξείδιο του αζώτου (NO)

NO: Τα επίπεδα στον ορό των νιτρικών (nitrites  $\text{NO}_2^-$ ) και νιτροδών (nitrates  $\text{NO}_3^-$ ) βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $159 \pm 9.6$   $\mu\text{moles}/\text{l}$  vs  $51 \pm 6.2$   $\mu\text{moles}/\text{l}$ ,  $p<0.001$ ) (διάγραμμα 5).

Οι συσχετίσεις του NO με τις τρανσαμινάσες, κυτταροκίνες, πρωτεΐνες οξειάς φάσεως και CIC με Pearson correlation φαίνονται στον πίνακα 14, με τις MMPs και τους αναστολείς τους φαίνονται στον πίνακα 16.

Πίνακας 14				
Συσχετίσεις με Pearson Correlation του NO με τρανσαμινάσες, Κυτταροκίνες, πρωτεΐνες οξείας φάσεως και ανοσοσυμπλέγματα				
		NO		
SGOT	r=	0.408199135		
	p=	0.092628769		
IL-1β	r=	0.14212857		
	p=	0.573721399		
IL-4	r=	0.090297469		
	p=	0.721596649		
INF-γ	r=	0.309547019		
	p=	0.211301455		
TNF-α	r=	-0.277403627		
	p=	0.265072204		
IL-6	r=	0.238124017		
	p=	0.341335065		
IL-2	r=	-0.294608867		
	p=	0.235324915		
IL-10	r=	0.227333746		
	p=	0.364294232		
IL-12	r=	-0.171262401		
	p=	0.496828432		
TGF-β	r=	-0.10893807		
	p=	0.666985544		
C3	r=	0.296402322		
	p=	0.23235238		
AAT	r=	0.431156598		
	p=	0.074033235		
HAP	r=	0.348155347		
	p=	0.156831359		
CER	r=	<b>0.681009192</b>		
	p=	<b>0.001862179</b>		
CRP	r=	0.457998855		
	p=	0.055960178		
CIC	r=	<b>0.552445348</b>		
	p=	<b>0.017431771</b>		



Αναλυτικότερα τα επίπεδα του NO συσχετίστηκαν θετικά με τις τιμές της CER ( $r = 0.681$ ,  $p=0.001$ ) και των CIC ( $r = 0.552$ ,  $p=0.01$ ) (αναγράφονται με κόκκινο στον πίνακα 14) και αρνητικά με την MMP-2 ( $r = -0.766$ ,  $p=0.02$ ) (αναγράφονται με κόκκινο στον πίνακα 16).

#### **Μεταλλοπρωτεάσες (MMPs) και αναστολείς (TIMPs και AMG):**

*MMPs:* Η μέση τιμή συγκέντρωσης στον ορό όλων των MMPs με μέθοδο μέτρησης την ELISA ήταν μειωμένη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η MMP-1 στον ορό των ασθενών ήταν  $75,8 \pm 11,8$  ng/ml και  $121,8 \pm 18,3$  ng/ml στην ομάδα ελέγχου ( $P < 0,05$ ). Η MMP-3 ήταν  $5,2 \pm 3,4$  ng/ml στους ασθενείς και  $21,2 \pm 5,2$  ng/ml στην ομάδα ελέγχου ( $P < 0,05$ ). Και οι δύο γελατινάσες βρέθηκαν μειωμένες στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (η MMP-2 ήταν  $789,6 \pm 68$  ng/ml έναντι  $1555 \pm 133$  ng/ml,  $P < 0,001$  και η MMP-9 ήταν  $33,9 \pm 6,9$  ng/ml έναντι  $65,1 \pm 9,4$  ng/ml αντίστοιχα,  $P < 0,05$ ) (διάγραμμα 7).

Και με την μέθοδο μετρήσεως zymography οι δύο γελατινάσες MMP-2 και MMP-9 έδειξαν μειωμένες τιμές στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ( $261 \pm 14$  ng/ml και  $2,7 \pm 0,16$  ng/ml έναντι  $425 \pm 14$  ng/ml και  $5,8 \pm 0,34$  ng/ml αντίστοιχα, και στις δύο περιπτώσεις  $P < 0,001$ ).

*TIMPs:* Δεν υπήρχε διαφορά στην συγκέντρωση του TIMP-1 ανάμεσα στους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες. Η μέση τιμή του TIMP-1 στον ορό των ασθενών βρέθηκε να είναι  $1027 \pm 118$  ng/ml ενώ εκείνη των υγιών μαρτύρων ήταν  $1024 \pm 120$  ng/ml, ( $P = 0,984$ ). Αντιθέτως η τιμή του TIMP-2 ήταν στατιστικά αυξημένη στους ασθενείς ( $68,8 \pm 6,2$  ng/ml) έναντι των υγιών μαρτύρων ( $52,7 \pm 3,1$  ng/ml,  $P < 0,001$ ) (διάγραμμα 8).

*AMG:* Η AMG βρέθηκε αυξημένη στους ασθενείς ( $265 \pm 14$  mg/dl) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $182,5 \pm 12$  mg/dl,  $P < 0,001$ ).

Η ανάλυση με Linear Regression των μεταλλοπρωτεασών και τρανσαμινασών, κυτταροκινών, πρωτεϊνών οξείας φάσεως, ανοσοσυμπλεγμάτων και NO έδειξε τις κάτωθι συσχετίσεις (πίνακες 15, 16 και 17):

Πίνακας 15

**Συσχετίσεις με Pearson Correlation των MMPs και αναστολέων  
με τρανσαμινάσες και κυτταροκίνες**

		SGOT	SGPT	IL-1β	IL-4	INF-γ	TNF-α	IL-6	IL-2	IL-10	IL-12	TGF-β
<b>MMP-1</b>	r=	0.17	0.107	0.152	-0.32	-0.27	-0.109	-0.024		0.474	0.18	-0.477
	p=	0.6387	0.769	0.696	0.394	0.4827	0.7801	0.952		0.197	0.65	0.194
<b>MMP-2</b>	r=	-0.475	-0.57	-0.38	0.303	-0.36	-0.17	-0.332		-0.56	0.46	0.33
	p=	0.1655	0.086	0.31	0.427	0.3408	0.6611	0.383		0.12	0.22	0.386
<b>MMP-3</b>	r=	-0.305	-0.338	<b>-0.79</b>	-0.15	-0.246	-0.092	-0.208		-0.35	0.13	0.521
	p=	0.3919	0.339	<b>0.01</b>	0.7	0.5237	0.8135	0.592		0.352	0.74	0.151
<b>MMP-9</b>	r=	-0.078	-0.191	<b>-0.68</b>	-0.07	-0.437	-0.357	-0.097		-0.23	0.56	0.008
	p=	0.8296	0.596	<b>0.044</b>	0.854	0.24	0.3463	0.804		0.549	0.12	0.983
<b>TIMP-1</b>	r=	0.3278	0.252	-0.37	-0.04	-0.216	-0.023	0.507		-0.02	0.46	-0.451
	p=	0.3551	0.482	0.321	0.922	0.5758	0.9528	0.164		0.966	0.22	0.223
<b>TIMP-2</b>	r=	0.4702	0.531	-0.19	-0.07	0.3791	0.545	0.623		0.282	-0.1	-0.178
	p=	0.1703	0.114	0.627	0.856	0.3143	0.1292	0.073		0.462	0.76	0.648
<b>AMG</b>	r=	<b>-0.509</b>	<b>-0.507</b>	0.296	0.278	0.2782	0.1701	0.255	-0	0.058	0.25	0.231
	p=	<b>0.026</b>	<b>0.027</b>	0.089	0.111	0.2488	0.4863	0.292	0.5	0.744	0.15	0.342
<b>zMMP-9</b>	r=	-0.032	5E-04	0.136	-0.08	0.0607	0.055	<b>0.519</b>	0.3	-0.38	0.01	0.191
	p=	0.9002	0.999	0.591	0.744	0.811	0.8283	<b>0.027</b>	0.3	0.117	0.99	0.447
<b>zMMP-2</b>	r=	0.2221	0.225	0.059	-0.3	0.0407	-0.105	<b>0.62</b>	0.1	-0.02	-0	0.279
	p=	0.3758	0.37	0.815	0.229	0.8727	0.6772	<b>0.006</b>	0.6	0.942	0.98	0.262

Στατιστικά σημαντικές οι τιμές με P<0.05 (αναγράφονται με κόκκινο)

Πίνακας 16							
Συσχετίσεις με Pearson Correlation των MMPs και αναστολέων							
με πρωτείνες οξείας φάσεως, ανοσοσυμπλέγματα και NO							
	C3	AAT	HAP	CER	CRP	CIC	NO
<b>MMP-1</b>	-0.0406	0.57515	0.4654	0.5018	0.6572	0.2627	0.645049
	0.91742	0.10519	0.2068	0.1687	0.0544	0.4946	0.084151
<b>MMP-2</b>	0.15082	-0.0502	-0.1616	-0.2546	-0.24	-0.4518	<b>-0.76616</b>
	0.69851	0.89803	0.6779	0.5085	0.5332	0.2221	<b>0.026623</b>
<b>MMP-3</b>	0.36356	-0.4171	0.1098	0.1438	-0.3	-0.0032	-0.10034
	0.33617	0.26405	0.7786	0.712	0.4332	0.9934	0.81312
<b>MMP-9</b>	0.23168	0.29363	0.4383	0.568	0.3544	-0.2202	0.008455
	0.54864	0.44315	0.238	0.1106	0.3494	0.5691	0.984148
<b>TIMP-1</b>	-0.1621	0.31257	0.2367	0.4622	0.3724	0.0004	0.191199
	0.67697	0.41282	0.5398	0.2104	0.3237	0.9992	0.650143
<b>TIMP-2</b>	-0.509	<b>-0.7022</b>	<b>-0.7428</b>	-0.5791	-0.569	-0.1115	-0.413
	0.16167	<b>0.03494</b>	<b>0.0218</b>	0.1023	0.1099	0.7752	0.309177
<b>AMG</b>	<b>0.62502</b>	0.11024	-0.3767	0.0868	0.1269	0.0331	-0.13805
	<b>0.00422</b>	0.65323	0.1119	0.5845	0.4231	0.893	0.584879
<b>Z-MMP-9</b>	0.30065	-0.0576	-0.0706	0.1523	-0.109	0.0339	0.044633
	0.22541	0.82041	0.7807	0.5462	0.6678	0.8937	0.860409
<b>Z-MMP-2</b>	-0.243	-0.2475	-0.382	-0.228	0.0503	-0.19	0.092341
	0.33114	0.32202	0.1177	0.3628	0.8429	0.4502	0.71554

**Πίνακας 17**

**Συσχετίσεις με Pearson Correlation μεταλλοπρωτεασών και αναστολέων μεταξύ τους**

		MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	AMG	Z-MMP-9	Z-MMP-2
<b>MMP-1</b>	R=	1	-0.44	-0.33	0.502	0.49	-0.48	<b>-0.8615</b>	0.3487	0.376846
	P=		0.203	0.359	0.14	0.15	0.156	<b>0.0028</b>	0.3578	0.317442
<b>MMP-2</b>	r=	-0.44	1	0.128	0.057	-0.2	-0.2	0.471	-0.372	-0.5527
	p=	0.203		0.725	0.876	0.49	0.575	0.2007	0.3241	0.122751
<b>MMP-3</b>	r=	-0.325	0.128	1	0.369	0.21	0.16	0.3751	-0.004	-0.3193
	p=	0.359	0.725		0.294	0.56	0.659	0.3199	0.9926	0.402293
<b>MMP-9</b>	r=	0.502	0.057	0.369	1	<b>0.86</b>	-0.28	-0.0458	<b>0.7004</b>	0.334714
	p=	0.14	0.876	0.294		<b>0</b>	0.437	0.907	<b>0.0356</b>	0.378621
<b>TIMP-1</b>	r=	0.491	-0.25	0.208	<b>0.855</b>	1	0.041	-0.0386	<b>0.8147</b>	<b>0.673851</b>
	p=	0.15	0.487	0.564	<b>0.002</b>		0.909	0.9216	<b>0.0075</b>	<b>0.046573</b>
<b>TIMP-2</b>	r=	-0.484	-0.2	0.16	-0.28	0.04	1	0.6329	0.1525	0.39172
	p=	0.156	0.575	0.659	0.437	0.91		0.0673	0.6953	0.297121
<b>AMG</b>	r=	<b>-0.862</b>	0.471	0.375	-0.05	-0	0.633	1	0.1733	-0.10197
	p=	<b>0.003</b>	0.201	0.32	0.907	0.92	0.067		0.6814	0.810134
<b>Z-MMP-9</b>	r=	0.349	-0.37	-0	<b>0.7</b>	<b>0.81</b>	0.152	0.1733	1	<b>0.652853</b>
	p=	0.358	0.324	0.993	<b>0.036</b>	<b>0.01</b>	0.695	0.6814		<b>0.056612</b>
<b>Z-MMP-2</b>	r=	0.377	-0.55	-0.32	0.335	<b>0.67</b>	0.392	-0.102	<b>0.6529</b>	1
	p=	0.317	0.123	0.402	0.379	<b>0.05</b>	0.297	0.8101	<b>0.0566</b>	

Στατιστικά σημαντικές οι τιμές με P<0.05 (αναγράφονται με κόκκινο)

**Αναλυτικότερα (με κόκκινο στον πίνακα 15) :**

**MMP-3** αρνητική συσχέτιση με

- IL-1β ( $r = -0.794$ ,  $p=0.01$ )

**MMP-9** αρνητική συσχέτιση με

- IL-1β ( $r = -0.644$ ,  $p=0.04$ )

**MMP-2** αρνητική συσχέτιση με

- NO ( $r = -0.766$ ,  $p=0.02$ )

**Z-MMP-2** θετική συσχέτιση με

- IL-6 ( $r = 0.619$ ,  $p=0.006$ )

**Z-MMP-9** θετική συσχέτιση με

- IL-6 ( $r = 0.519$ ,  $p=0.02$ )

**TIMP-2** αρνητική συσχέτιση με

- AAT ( $r = -0.702$ ,  $p=0.03$ ) και με
- HAP ( $r = -0.742$ ,  $p=0.02$ )

**AMG** αρνητική συσχέτιση με

- SGOT ( $r = -0.509$ ,  $p=0.02$ )
- SGPT ( $r = -0.507$ ,  $p=0.02$ )

Θετική συσχέτιση με

- C3 ( $r = 0.625$ ,  $p=0.04$ )

Μεταξύ τους συσχετίστηκαν σημαντικά οι (με κόκκινο στον πίνακα 16):

- MMP-1 και AMG ( $r = -0,861$ ,  $p=0,002$ )
- MMP-9 και Z-MMP-9 ( $r = 0.700$ ,  $p=0.03$ )
- MMP-9 και TIMP-1 ( $r = 0.855$ ,  $p=0.001$ )
- Z-MMP-9 και Z-MMP2 ( $r = 0.529$ ,  $p=0.02$ )
- Z-MMP-9 και AMG ( $r = 0.520$ ,  $p=0.02$ )

- Z-MMP-9 και TIMP-1 ( $r = 0.814$ ,  $p=0.007$ )
- Z-MMP-2 και TIMP-1 ( $r = 0.673$ ,  $p=0.04$ )
- TIMP-2 και AMG ( $r = 0.632$ ,  $p=0.05$ )

Ανάλυση των συγκεντρώσεων MMPs και TIMPs σε σχέση με τον ιό ή την έκβαση της νόσου δεν έδειξε σημαντικές συσχετίσεις.

Συγκρίνοντας την υποομάδα των 15 ασθενών με οξεία ηπατίτιδα Β με την ομάδα ελέγχου δεν βρέθηκαν περαιτέρω διαφορές. Λόγω του μικρού αριθμού ασθενών στις ομάδες με οξεία ηπατίτιδα C (2 ασθενείς) και A (2 ασθενείς) δεν συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα τους με την ομάδα ελέγχου.

Επίσης αναλύθηκαν τα αποτελέσματα των 16 ασθενών που παρουσίασαν ίαση (14 ασθενείς με ηπατίτιδα Β και 2 ασθενείς με ηπατίτιδα Α) και συγκρίθηκαν με τους 2 ασθενείς με ηπατίτιδα C (100%) και τον 1 ασθενή με ηπατίτιδα Β (6.6%) που ανέπτυξαν χρονιότητα. Παρά το ότι εξ' αιτίας του μικρού αριθμού και της ετερογένειας της δεύτερης ομάδας δεν μπορούν να στηριχθούν κατηγορηματικά συμπεράσματα, παρατηρήθηκε μία σημαντικά αυξημένη μέση τιμή της AAT ( $p<0.05$ ) στην ομάδα αυτή σε σχέση με την πρώτη ομάδα των ιαθέντων ασθενών ( $288\pm 6$  έναντι  $254\pm 18$  mg/dl). Σημειώνεται επίσης μια οριακά σημαντική αύξηση του TGF- $\beta$  ( $p=0.078$ ) στην ομάδα των ασθενών που εξελίχθηκαν σε χρονιότητα σε σχέση με τους ιαθέντες ( $20.9\pm 10.5$  έναντι  $7.7 \pm 3$  pg/ml αντίστοιχα).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σημαντικό θέμα στην ερμηνεία του ανοσολογικού προφίλ μίας διαρκώς μεταβαλλόμενης φλεγμονώδους νόσου όπως η οξεία ιογενής ηπατίτις αποτελεί η γνώση της χρονικής στιγμής της αιμοληψίας. Έχει περιγραφεί ότι κατά την διάρκεια της εξέλιξης της οξείας ηπατίτιδος η επικρατούσα ανοσολογική απάντηση μπορεί να

διαφοροποιηθεί (225). Είναι όμως αδύνατον στον άνθρωπο να γνωρίζει κανείς την στιγμή ακριβώς της έναρξης της νεκροφλεγμονώδους διαδικασίας της ηπατίτιδας. Η μελέτη μας πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια της εμφάνισης του ικτερικού σταδίου της οξείας ηπατίτιδας, μετά την σταθεροποίηση της τιμής των τρανσαμινασών.

Οι μέσες τιμές των μελετηθέντων παραγόντων δεν παρουσίασαν ούτε ημερήσια διακύμανση ούτε διαφορά ανάμεσα στην πρώτη και τρίτη ημέρα της εξέλιξης της οξείας ηπατίτιδας, πράγμα που υποδηλοί ότι η μελέτη μας έγινε σε μια σταθερή χρονική στιγμή της εξέλιξης της νόσου. Σημαντικά αυξημένα επίπεδα των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-12 βρέθηκαν, πιθανή ένδειξη της ενεργοποίησης των κυττάρων του Kupffer σε αυτήν την χρονική φάση της φλεγμονώδους διεργασίας. Τα σημαντικώς αυξημένα επίπεδα υποδηλούν επίσης άμεση συμμετοχή της αρχέγονης ανοσολογικής απάντησης στην ικτερική νεκροφλεγμονώδη φάση της οξείας ιογενούς ηπατίτιδας. Υπογραμμίζεται ότι η αύξηση αυτών των κυτταροκινών στην μελέτη μας είναι μικρότερη από εκείνη που έχει αναφερθεί από άλλους ερευνητές στην οξεία κεραυνοβόλο ηπατίτιδα και την οξεία ηπατοκυτταρική ανεπάρκεια (158,155,156), παρ' ότι οι άμεσες συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων μελετών είναι δύσκολες δοθέντων των διαφορετικών μεθοδολογιών, τεχνικών και διαφορετικού σχεδιασμού των μελετών. Η μικρότερη αύξηση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών στους ασθενείς μας πιθανόν να αντανακλά την ήπια βαρύτητα της νόσου των, σε αντίθεση με την κεραυνοβόλο ηπατίτιδα.

Η αύξηση των πρωτεϊνών οξείας φάσεως υπογραμμίζει επίσης την ενεργό συμμετοχή της αρχέγονης ανοσολογικής απάντησης που διαρκεί ακόμα σε αυτήν την χρονική στιγμή της ηπατίτιδας. Η ικανότητα του ήπατος να διατηρεί ικανή παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσεως παρά την κατανάλωση τους στις φλεγμονώδεις διεργασίες έχει συσχετισθεί σε παλαιότερη μελέτη με καλή έκβαση της νόσου (98). Σε συμφωνία με αυτήν τη μελέτη και την καλή έκβαση της ηπατίτιδας των ασθενών μας βρήκαμε σημαντικά αυξημένες τις CRP, AAT και C3. Η CER βρέθηκε αυξημένη αλλά όχι σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Εξαιρέση απετέλεσε η HAP η οποία βρέθηκε σημαντικά μειωμένη. Η HAP είναι θετική πρωτεΐνη οξείας φάσεως (δηλαδή αυξάνεται και δεν μειώνεται κατά την διάρκεια της φλεγμονής), και η μείωση της απετέλεσε ένα ελαφρώς παράδοξο εύρημα. Πιθανολογούμε λοιπόν ότι η πτώση της οφείλεται σε κατανάλωση της, λόγω υποκλινικής ενδοαγγειακής αιμόλυσης που συνοδεύει συχνά την οξεία ηπατίτιδα. Πρέπει να σημειωθεί ότι μειωμένα επίπεδα HAP ενώ οι υπόλοιπες θετικές πρωτεΐνες οξείας φάσεως ήταν αυξημένες, έχουν περιγραφεί και σε ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα και κίρρωση (226). Αξιοσημείωτη είναι η έλλειψη συσχέτισεως των πρωτεϊνών οξείας φάσεως και των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών στους ασθενείς μας κατά την δεδομένη στιγμή της μελέτης. Η πιθανή παθογενετική εμπλοκή της AAT (αναστολέα των πρωτεασών) και του TGF- $\beta$  (παράγοντα που επάγει την ίνωση) στην ομάδα των ασθενών που εξελίχθηκαν σε χρονιότητα και όπου ανευρέθησαν σε μεγαλύτερα από τους ιαθέντες ασθενείς επίπεδα χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Τα κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα βρέθηκαν αυξημένα σε όλους τους ασθενείς παρ' ότι κανείς από αυτούς δεν παρουσίασε νόσο ανοσοσυμπλεγμάτων. Η θετική τους συσχέτιση με τον παράγοντα του συμπληρώματος C3 πιθανόν να μετέχει σε αυτό μια που η σύνδεση των ανοσοσυμπλεγμάτων με το συμπλήρωμα τα διατηρεί διαλυτά.

Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (227,228), τύπου 1 ανοσολογική απάντηση ανιχνεύτηκε σε όλους τους ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα. Φαίνεται όμως, τουλάχιστον κατά το στάδιο αυτό, αυτή υποχωρεί όπως διαφαίνεται από τα χαμηλά επίπεδα της IL-2 ενώ οι IL-12 και INF- $\gamma$  παραμένουν υψηλές. Στο ίδιο στάδιο ανιχνεύθηκαν οι αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες τύπου 2 (IL-4 και IL-10) ιδιαίτερα αυξημένες. Όπως προαναφέρθηκε, προηγούμενες μελέτες και στις δύο ηπατίτιδες B και C συσχετίζουν αυτού του είδους την ανοσολογική απάντηση με χρονιότητα (211, 229). Στην μελέτη μας αντίθετα αυτού του είδους η ανοσολογική απάντηση βρέθηκε σε ασθενείς με αυτοπεριοριζόμενη ηπατίτιδα, πράγμα που υποδηλοί ότι η τύπου 2 ανοσολογική απάντηση καταστέλλει την απάντηση τύπου 1. Σε in vitro μελέτες έχει αποδειχθεί ότι



οι T-κυτταρικοί κλώνοι κατά την διάρκεια πολλαπλών πολλαπλασιασμών τους φυσιολογικά μετατρέπονται από T<sub>H</sub>1 σε T<sub>H</sub>2 (230). Θεωρούμε ότι το προφίλ ύφεσης της ανοσολογικής απάντησης 1 και επικράτησης της τύπου 2 που παρατηρήσαμε στους ασθενείς μας, έχει να κάνει με τον φυσιολογικό μηχανισμό αποκατάστασης της ομοιόστασης μετά την κάθαρση της ιικής λοιμώξεως, κάτι που έχει περιγραφεί σε άλλες ικές λοιμώξεις (231). Επιπλέον καθοριστική συμμετοχή στην κάθαρση της λοιμώξεως πιθανόν να έπαιξε η μεγάλη αύξηση της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 που οι ασθενείς αυτοί είχαν. Όντως σε μελέτες στα ποντίκια η IL-10 βελτιώνει την εικόνα της πειραματικής ηπατίτιδας (232). Μελέτες σε ασθενείς επίσης έδειξαν ότι η IL-10 ασκεί κατασταλτική δράση στην ανοσολογική απάντηση τύπου 1 και στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) (233,47), κάτι που πιθανόν να συνέβη και στην περίπτωση των ασθενών μας με τις ηπίως αυξημένες τιμές των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και την καταστολή στην Th1 απάντηση.

Ο ρόλος του NO κατά την διάρκεια μιας φλεγμονής είναι πολύπλοκος. Είναι πιθανόν το NO να αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς καταστροφής των ηπατοκυττάρων. Η ανοσορυθμιστική δράση του NO που ήδη έχει περιγραφεί (118) πιθανόν να μετέχει και στην διαμόρφωση της επικρατούσης ανοσολογικής τύπου 2 απάντησης που παρατηρήσαμε στους ασθενείς μας τουλάχιστον όσον αφορά στην μείωση των επιπέδων της IL-2.

Ιδιαίτερος αυξημένη ευρέθη και μία κυτταροκίνη που επάγει την ίνωση, ο TGF- $\beta$ , που παρουσιάζει και ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση (82). Η επίσης αυξημένη αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη IL-10 αναστέλλει την ηπατική ίνωση (82). Οι δύο αυτές αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (TGF- $\beta$  και IL-10) θεωρούμε ότι είναι πιθανόν να συμμετέχουν και στον καθορισμό του προφίλ των MMPs και αναστολέων των ασθενών μας την συγκεκριμένη στιγμή. Πραγματικά και οι δύο ενέχονται στην ηπατική ίνωση και κατ' επέκταση και στην διαμόρφωση της εξωκυτταρίου θεμελίου ουσίας και των παραγόντων που μετέχουν σε αυτήν, όπως οι μεταλλοπρωτεάσες και οι αναστολείς τους. Όλες οι μελετηθείσες MMPs (MMP-1,

MMP-3, MMP-2, MMP-9) βρέθηκαν μειωμένες στους ασθενείς, ενώ οι αναστολείς TIMP-2 και AMG βρέθηκαν αυξημένοι και ο TIMP-1 στα ίδια επίπεδα με την ομάδα ελέγχου. Υπάρχουν *in vitro* μελέτες που αποδεικνύουν ότι η IL-10 καταστέλλει την σύνθεση της MMP-9 (gelatinase B) και αναστέλλει την επαγομένη από LPS παραγωγή της MMP-1 στα ανθρώπια μακροφάγα ενώ διεγείρει την παραγωγή του TIMP-1 (234). Παρόμοια δράση της IL-10 έχει βρεθεί και σε άλλα ανθρώπια κύτταρα (καρκινικά κύτταρα του προστάτη, μονοκύτταρα ενδοθηλιακά κύτταρα) αλλά και κατά την διάρκεια άλλων νόσων όπως το Non-Hodgkin λέμφωμα (235,236,237). Ο TGF- $\beta$  ασκεί την δράση του στην ηπατική ίνωση αυξάνοντας την παραγωγή πρωτεϊνών της θεμελίου ουσίας και επηρεάζοντας τις MMPs και τους αναστολείς τους. Αναστέλλει την παραγωγή των MMPs με εξαίρεση την MMP-2 (gelatinase A) ενώ επάγει την παραγωγή TIMP-1 και TIMP-2 (82,85,86). Είναι γνωστό από μελέτη σε πειραματόζωα ότι κατά την διάρκεια οξείας ηπατικής βλάβης που ακολουθείται από πλήρη αποκατάσταση οι κυτταροκίνες TNF- $\alpha$  και TGF- $\beta$  εκφράζονται σε διαφορετικούς χρόνους. Η έκφραση του TNF- $\alpha$  επικρατεί ενωρίς ενώ εκείνη του TGF- $\beta$  αυξάνει σε δεύτερη χρονική στιγμή (38). Έτσι ο TGF- $\beta$  δρα άμεσα καταστέλλοντας την αρχική (TNF- $\alpha$  εξαρτώμενη) παραγωγή των MMPs και έμμεσα επάγοντας την παραγωγή των TIMPs που με την σειρά τους αναστέλλουν τις MMPs. Στην οποιαδήποτε περίπτωση το τελικό αποτέλεσμα είναι η λήξη της διάσπασης της εξωκυτταρίου θεμελίου ουσίας και ο περιορισμός της φλεγμονής. Η AMG με την επαγωγή της κατά την διάρκεια της οξείας φλεγμονής συμμετέχει σε αυτόν τον ρυθμιστικό μηχανισμό με την μη-ειδική σύνδεση της στις MMPs που τις αδρανοποιεί ενώ τα κύτταρα Kupffer ακολούθως απομακρύνουν τα συμπλέγματα AMG-MMP από την κυκλοφορία (135). Ένδειξη για το τελευταίο αυτό υπήρξε στην μελέτη μας όσον αφορά την MMP-1 τα χαμηλά επίπεδα της οποίας βρέθηκε να σχετίζονται αρνητικά με την αύξηση της AMG. Η αρνητική συσχέτιση της AMG με τις τρανσαμινάσες που επίσης παρατηρήθηκε οδηγεί στην υπόθεση ότι πιθανόν όσο αυξάνεται η AMG και κατά συνέπεια αναστέλλονται οι MMPs, τόσο μειώνεται η ηπατοκυτταρική καταστροφή. Η θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο αυξημένων αναστολέων AAT και TIMP-2 θέτουν υπόνοια κοινού ελέγχου παραγωγής των δύο αυτών αναστολέων την συγκεκριμένη χρονική στιγμή κάτι που

δεν συμβαίνει με τον TIMP-1. Τα επίπεδα του τελευταίου παρά το ότι δεν βρέθηκαν αυξημένα εντούτοις παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με τις MMP-9, Z-MMP-9 και την Z-MMP-2. Εξ' άλλου οι τρεις αυτές MMPs είναι και οι μόνες από τις MMPs που σχετίζονται θετικά μεταξύ τους. Υποθέτουμε ότι τα επίπεδα του TIMP-1 θα πρέπει να ήταν αυξημένα ενωρίτερα κατά την διάρκεια της οξείας ηπατίτιδος συγχρόνως με την αύξηση των MMPs, κάτι που δεν ανιχνεύσαμε στην χρονική στιγμή που πραγματοποιήσαμε την μελέτη, με επακόλουθη ομαλοποίηση στις τιμές που διαπιστώσαμε. Αυτό υποστηρίζεται και από προηγούμενη πειραματική μελέτη όπου τα επίπεδα του TIMP-1 αυξάνουν λίαν ενωρίς (1-3 ώρες) στην οξεία ηπατική βλάβη (148).

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Η μελέτη έδειξε ότι κατά το πρώιμο ικτερικό στάδιο της οξείας ιογενούς ηπατίτιδας:

1. Η απουσία σημαντικών διακυμάνσεων των τιμών που παρατηρήσαμε υποδηλοί ότι οποιεσδήποτε διακυμάνσεις της ανοσολογικής απάντησης επισυμβαίνουν σε χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από 3 ημέρες, ενώ ούτε σημαντική ημερήσια διακύμανση παρατηρείται.
2. Υπάρχει ενεργοποίηση των κυττάρων του Kupffer με παραγωγή των TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  και IL-6 και επομένως ενεργό συμμετοχή της αρχηγόνου ανοσολογικής απάντησης.
3. Ως άμεση συνέπεια αυτού, τα ηπατοκύτταρα παράγουν αυξημένα ποσά πρωτεϊνών οξείας φάσεως. Μοναδική εξαίρεση η απτοσφαιρίνη που πιθανόν να καταναλίσκεται σε υποκλινική ενδοαγγειακή αιμόλυση.
4. Φαίνεται να υπάρχει στο στάδιο αυτό τύπου 1 ανοσολογική απάντηση, η οποία όμως πιθανόν υφίεται, υπό την επίδραση της αυξημένης τύπου 2 απαντήσεως. Η τελευταία μάλλον αποτελεί το φρένο της τύπου 1 απαντήσεως και όχι προϋπόθεση χρονιότητας.
5. Μόνη η παρουσία υψηλών επιπέδων κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων δεν είναι αρκετή για να παρουσιαστεί η νόσος από ανοσοσυμπλέγματα .

6. Η μεγάλη παραγωγή NO, πιθανόν συντελεί στον κυτταρικό θάνατο των ηπατοκυττάρων, αλλά πιθανόν να διαδραματίζει και ανοσορυθμιστικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση.
7. Οι μεταλλοπρωτεάσες είναι μειωμένες ενώ αυξημένοι είναι ο ειδικός ιστικός αναστολέας TIMP-2 και οι μη ειδικοί αναστολείς AAT και AMG. Αυτό συνεπάγεται διακοπή της καταστροφής του εξωκυτταρίου υποστρώματος. Σ' αυτό πιθανόν ενέχονται τα αυξημένα επίπεδα TGF-β και IL-10.
8. Χυμικοί παράγοντες κυρίως της αρχέγονης ανοσολογικής απάντησης όπως οι κυτταροκίνες, οι πρωτεΐνες οξείας φάσεως, το νιτρικό μονοξείδιο, οι μεταλλοπρωτεάσες και οι αναστολείς τους συμμετέχουν ενεργά στο στάδιο αυτό της νόσου.
9. Το προφίλ της ανοσολογικής απάντησης των ασθενών μας αντανακλά την ήπια πορεία της νόσου και την τελική της έκβαση με αποκατάσταση της ομοιόστασης.
10. Ο ρόλος της AAT και του TGF-β ως προγνωστικού δείκτη πορείας προς χρονιότητα χρειάζεται περαιτέρω αξιολόγηση.

Η παρούσα μελέτη των χυμικών παραγόντων κυρίως της πρωτογενούς ανοσολογικής απάντησης κατά την διάρκεια οξείας ιογενούς ηπατίτιδας αποτελεί το πρώτο μικρό βήμα στην προσπάθεια κατανόησης των παθογενετικών μηχανισμών καταστροφής του ηπατοκυττάρου.

Μελλοντικός στόχος είναι η περαιτέρω διευκρίνηση των μηχανισμών αυτών και διαμέσου μελετών επί κυτταρικών καλλιιεργειών ηπατοκυττάρων, κυττάρων Kupffer και ινοβλαστών.

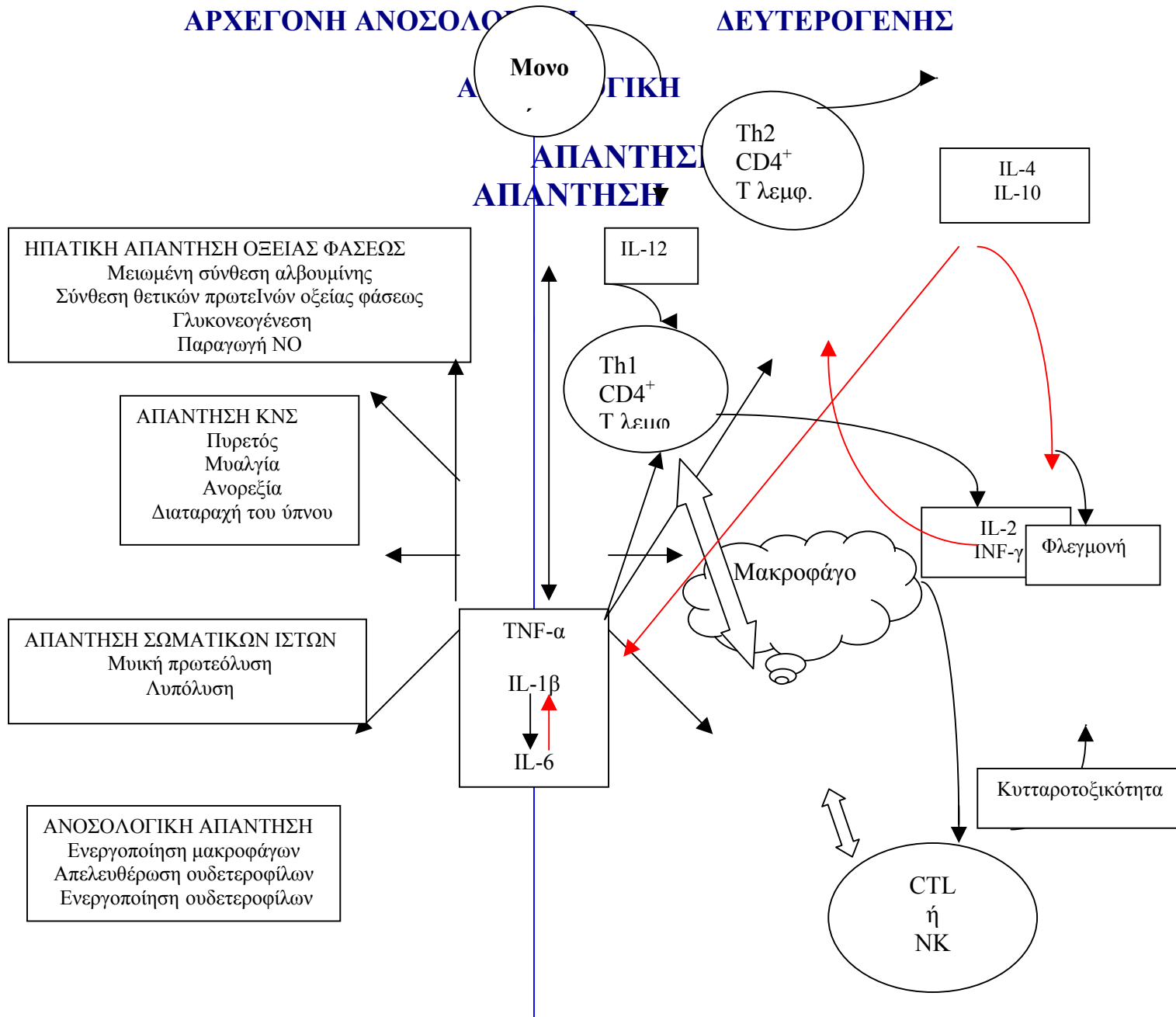
Ιδιαίτερος ενδιαφέρουσα θεωρούμε την παρατήρηση της πιθανής εμπλοκής των αναστολέων των πρωτεασών (AAT και AMG) και του TGF-β στην εμφάνιση χρονιότητας.

Η επιβεβαίωση του πιθανού ρόλου τους ως προγνωστικού δείκτη χρονιότητας στην οξεία ιογενή ηπατίτιδα πέραν της διαγνωστικής του σημασίας θα δώσει και την δυνατότητα μελλοντικής θεραπευτικής παρέμβασης.

# ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

# Διάγραμμα 1

## ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ

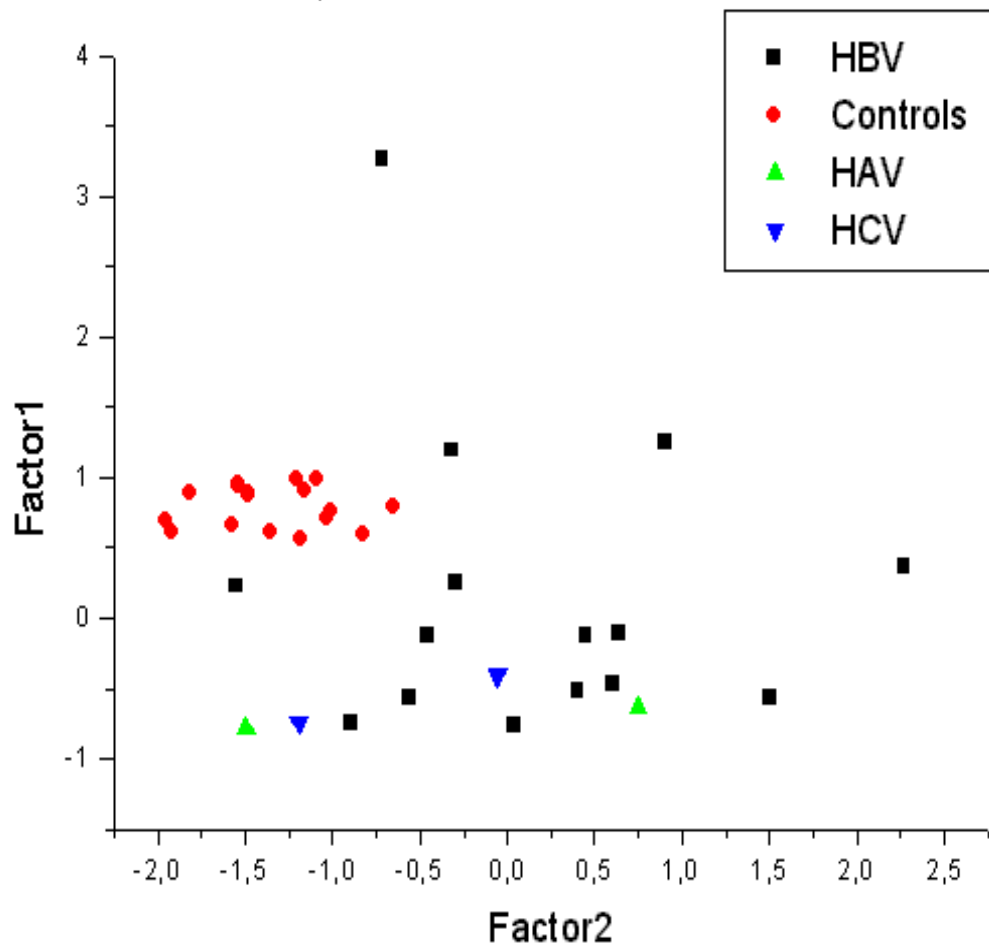


**Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην σχέση μεταξύ των δύο ανοσολογικών απαντήσεων . Επάγουν την αρχέγονη ανοσολογική απάντηση και καθορίζουν την φύση και την ένταση της δευτερογενούς**

↗ επάγει

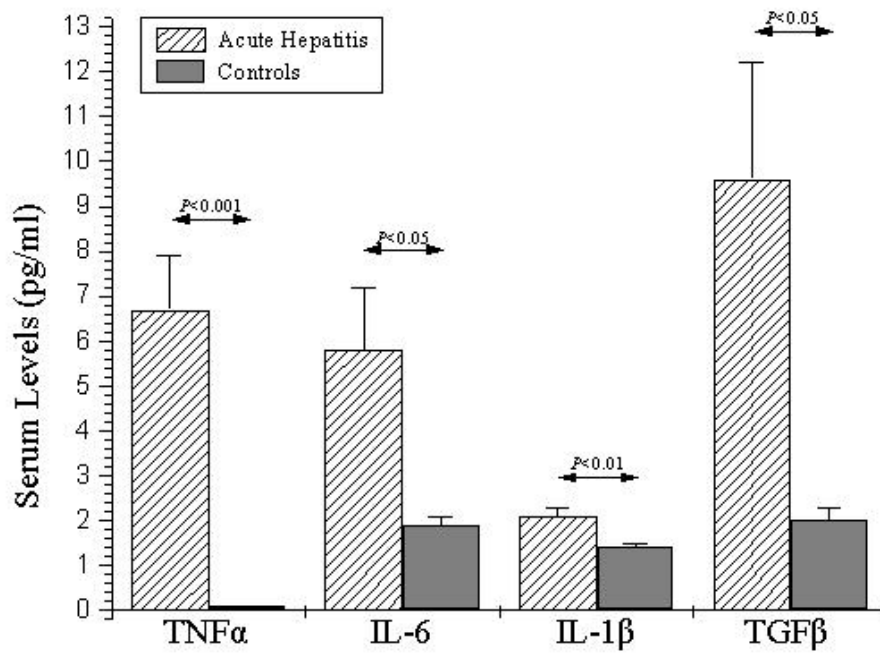
↘ αναστέλλει

Διάγραμμα 2. Factor analysis μεταξύ των ομάδων



### Διάγραμμα 3

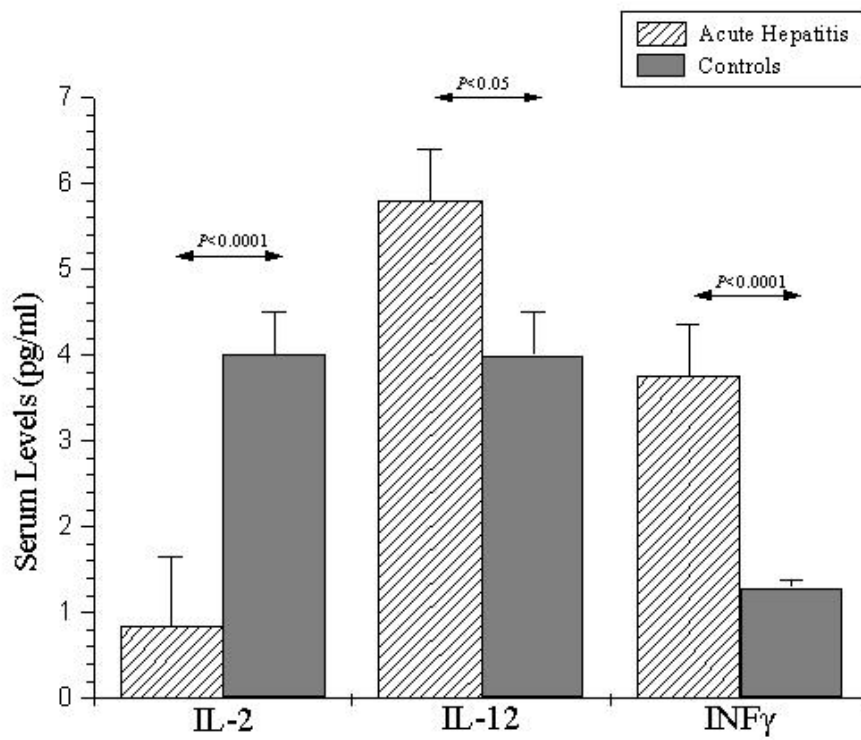
Επίπεδα των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-α , IL-6, IL-1β και του TGF-β σε ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα (n=19) και ομάδα ελέγχου υγιών αιμοδοτών (n=15).





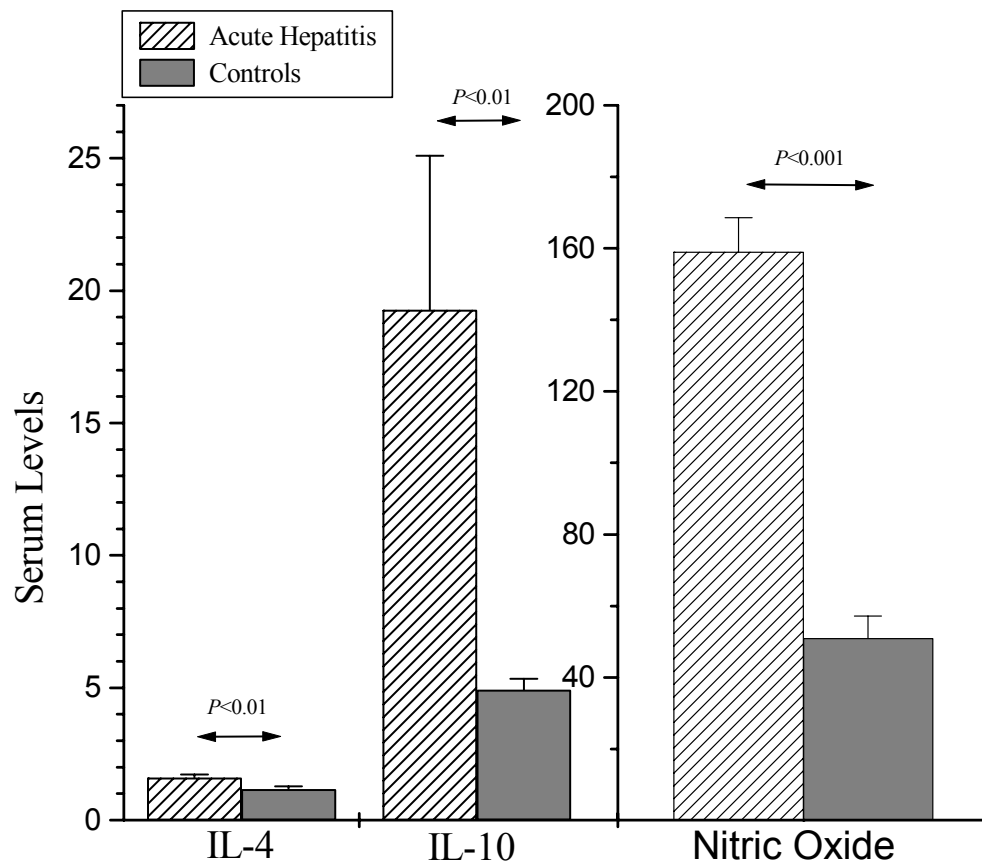
## Διάγραμμα 4

Επίπεδα των κυτταροκινών IL-2, IL-12 και IFN- $\gamma$  σε ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα (n=19) και ομάδα ελέγχου υγιών αιμοδοτών (n=15).



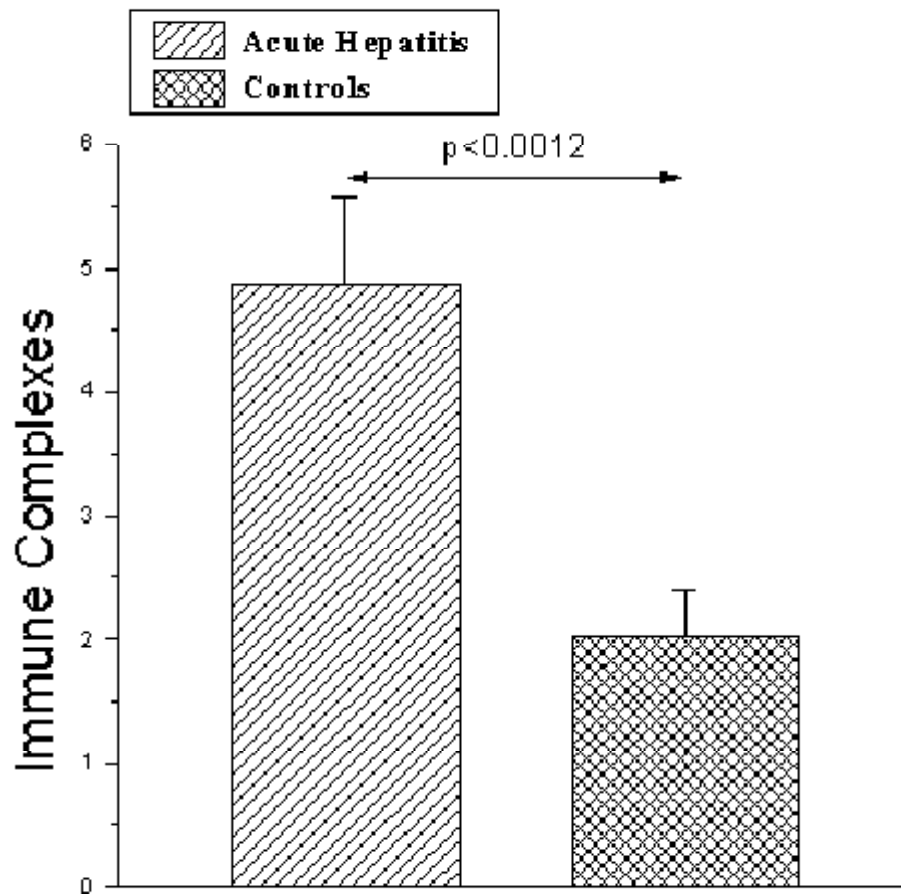
## Διάγραμμα 5

Επίπεδα των αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-4, IL-10 σε pg/ml και του μονοξειδίου του αζώτου (NO) σε  $\mu\text{moles/l}$  σε ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα (n=19) και ομάδα ελέγχου υγιών αιμοδοτών (n=15).



## Διάγραμμα 6

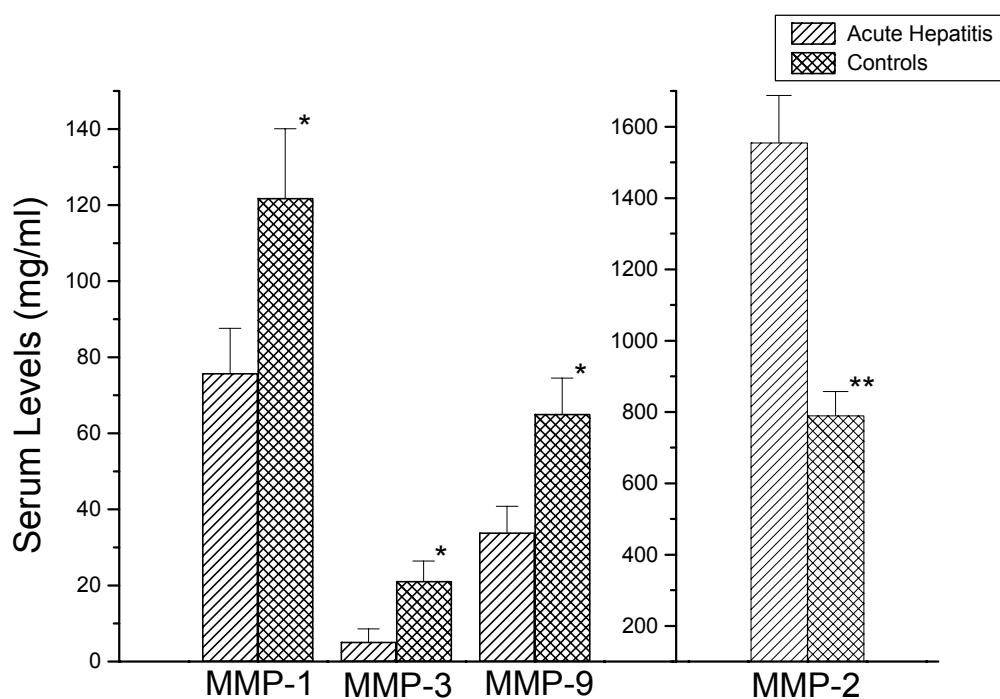
Επίπεδα ορού ανοσοσυμπλεγμάτων (Immune Complexes) σε  $\mu\text{g}/\text{ml}$  σε ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα ( $n=19$ ) και ομάδα ελέγχου υγιών αιμοδοτών ( $n=15$ ).



Οι τιμές εκφράζονται σε  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ .

## Διάγραμμα 7

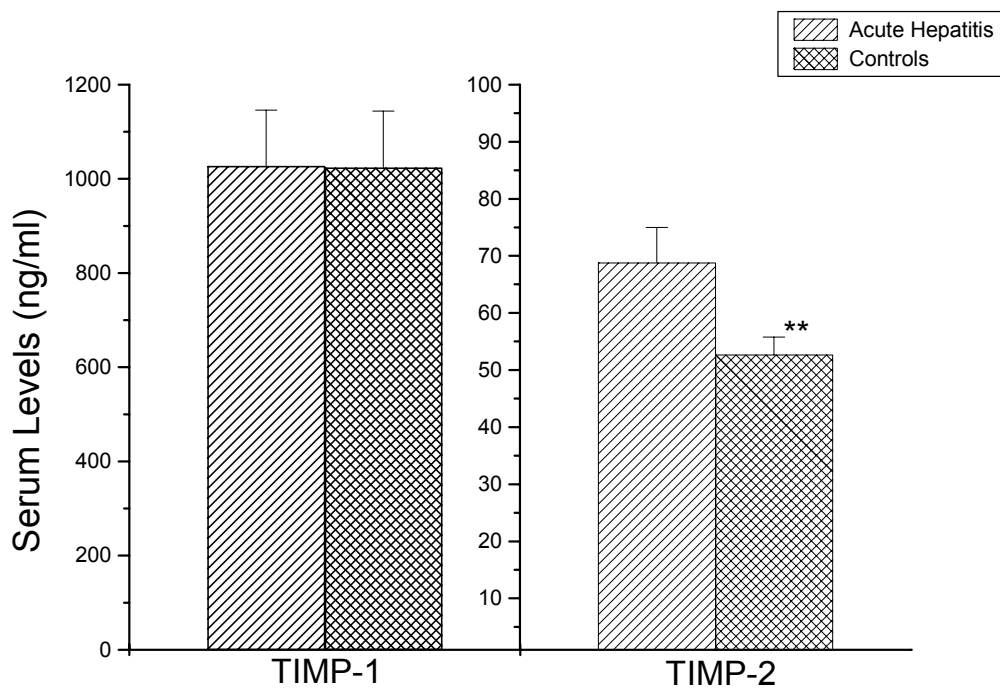
Επίπεδα μεταλλοπρωτεασών MMP-1, MMP-3, MMP-9 και MMP-2 σε ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα (n=19) και ομάδα ελέγχου υγιών αιμοδοτών (n=15).



Οι τιμές εκφράζονται σε mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$

## Διάγραμμα 8

Επίπεδα των ιστικών αναστολέων των μεταλλοπρωτεασών TIMP-1 και TIMP-2 σε ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα (n=19) και ομάδα ελέγχου υγιών αιμοδοτών (n=15).



Οι τιμές εκφράζονται σαν mean  $\pm$  SEM., \*\*  $P < 0.001$

# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Ward SG, Westwick J. Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *Biochem J.* 1998; 333:457-470.
2. Chandler S, Miller KM, Clements JM, Lury J, Corkill D, Anthony DC, et al. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunol.* 1997; 72:155-161.
3. Re F, Muzio M, De Rossi M, Polentarutti N, Giri JG, Mantovani A, et al. The type II “receptor” as a decoy target for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor. *J Exp Med.* 1994; 179:739-743.
4. Modur V, Li Y, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *J Clin Invest.* 1997; 100:2752-2756.
5. Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem.* 1993; 268:18542-18548.
6. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med.* 1992; 175:323-329.
7. Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89:4845-4849.
8. Arend WP. IL-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 1993; 54:167-227.
9. Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. The type II decoy receptor: a novel regulatory pathway for interleukin-1. *Immunol Today.* 1994; 15:562-566.
10. Dinarello CA. The IL-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 1994; 8:1314-1325.
11. Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, et al. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:7907-7912.

12. March CJ, Mosley B, Larsen A, et al. Cloning sequence and expression of two distinct human interleukin-1 cDNAs. *Nature* 1985; 315:641-645.
13. Tocci MJ and Schmidt JA. Interleukin-1: Structure and Function. In Daniel G Remick, Jon S Friedland ed. *Cytokines in Health and Disease*. 2<sup>nd</sup> rev. ed. Marcel Dekker 1997:1-27.
14. Schmidt JA, Tocci MJ. Interleukin-1. In Sporn M, Roberts A, eds. *The handbook of experimental Pharmacology, Part 1, Peptide growth factors and their Receptors*. Berlin: Springer-Verlag, 1990: 473-521.
15. Nicod LP, Habre FE, Dayer JM. Natural and recombinant interleukin-1 receptor antagonist does not inhibit human T-cell proliferation induced by mitogens, soluble-antigens or allogeneic determinants. *Cytokine* 1992; 4:29-35.
16. Havell EA, Moldawer LL, Helfgott D, Killian PL, Sehgal PB. Type 1 Il-1 receptor blockade exacerbates murine listeriosis. *J Immunol* 1992; 148:1486-1492.
17. Smith JW, Urba WJ, Curti BD, Elwood LJ, Steis RG, Janik JE, et al. The toxic and hematologic effects of interleukin-1 alpha administered in a phase I trial to patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol*.1992; 10:1141-1152.
18. Rossi V, Breviario F, Ghezzi P et al. Prostacyclin synthesis induced in vascular cells by interleukin-1. *Science* 1985; 229:174-176.
19. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T et al. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 1988; 81:1162-1172.
20. Dejana E, Breviario F, Erroi A, et al. Modulation of endothelial cell functions by different molecular species of interleukin 1. *Blood* 1987; 69:695-699.
21. Breder CD, Dinarello CA, Saper CB. Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science* 1988;240:321-324.
22. Chrousos GP. The hypothalamic pituitary-adrenal axis and immune mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995; 332:1351-1361.



23. Bertini R, Bianchi M, Ghezzi P. Adrenalectomy sensitizes mice to the lethal effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1988; 167:1708-1717.
24. Benveniste EN. Hormonal activities of cytokines. In Blalock JE, ed. *Neuroimmunoendocrinology*. 2<sup>nd</sup> rev. ed. Karger: Basel, 1992: 106-142.
25. Eastgate JA, Symons JA, Wood NC, Grinlinton FM, di Giovine FS, Duff GW. Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 1988; 2:706-709.
26. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Ann Rev Immunol*. 1998; 16:27-55.
27. Smith JW, Longo D, Alford WG, Janik JE, Sharfman WH, Gause BL, et al. The effects of treatment with interleukin-1 on platelet recovery after high-dose carboplatin. *N Engl J Med*. 1993; 328:756-761.
28. Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 1988; 240:1169-1176.
29. Whiteside TL, Herberman RB. The role of natural killer cells in human disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 53:1-23
30. Espinoza-Delgado I, Bosco MC, Musso T, Gusella GL, Longio DL, Varesio L. Interleukin-2 and human monocyte activation. *J Leukocyte Biol* 1995; 57:13-19.
31. Aversa G, Cocks BG, Punnonen J, Carballido JM, DeVries JE. Contact mediated signals and cytokines involved in B cell activation and isotope switching in pre B and mature B cells. *Res Immunol* 1994; 145:222-226.
32. Bacchetta R, de Waal Malefyt R, Yssel H et al. Hosteactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell clones isolated from a human chimera produce IL-5, IL-2, IFN- $\gamma$  but not IL-4. *J Immunol* 1990; 144:902-908.
33. Castro A, Sengupta TK, Ruiz DC, Yang E, Ivashkiv LB. IL-4 selectively inhibits IL-2-triggered Stat5 activation, but not proliferation, in human T cells. *J Immunol*. 1999; 162:1261-1269.

34. Vannier E, Miller LC, Dinarello CA. Coordinated anti-inflammatory effect of IL-4: IL-4 down regulates IL-1 synthesis but up regulates IL-1ra production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89:4076-4080.
35. T Taga, T Kishimoto. Interleukin-6. In *Human Cytokines* p. 143-166.
36. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15:797-819.
37. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Fabra R, Trullenque R, Heinrich PC: Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology* 1990, 12: 1179-1186.
38. Fong Y, Moldawer LL, Marano M, Wei H, Tatter SB, Clarick RH, et al. Endotoxemia elicits increased circulating beta 2-IFN/IL-6 in man. *J Immunol.* 1989; 142:2321-2324.
39. Nijsten MW, Hack CE, Helle M, ten DH, Klasen HJ, Aarden LA. Interleukin-6 and its relation to the humoral immune response and clinical parameters in burned patients. *Surgery.* 1991; 109:761-767.
40. Guo Y, Dickerson C, Chrest FJ, Adler WH, Munster AM, Winchurch RA. Increased levels of circulating interleukin 6 in burn patients. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990; 54:361-371.
41. Calandra T, Gerain J, Heumann D, Baumgartner JD, Glauser MP. High circulating levels of interleukin-6 in patients with septic shock: evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. The Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *Am J Med.* 1991; 91:23-29.
42. Lenczowski MJ, Bluthe RM, Roth J, Rees GS, Rushforth DA, van Dam AM, et al. Central administration of rat IL-6 induces HPA activation and fever but not sickness behavior in rats. *Am J Physiol.* 1999; 276:R652-R658.
43. Dinarello CA, Cannon JG, Mancilla J, Bishai I, Lees J, Coceani F. Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. *Brain Res.* 1991; 562:199-206.

44. Yoshizawa K, Naruto M, Ida N. Injection time of interleukin-6 determines fatal outcome in experimental endotoxin shock. *J Interferon Cytokine Res.* 1996; 16:995-1000.
45. Barton BE, Jackson JV. Protective role of interleukin 6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. *Infect Immun.* 1993; 61:1496-1499.
46. Dinarello CA, Moldawer LL. Interleukins and their receptors. In *Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis*. Edited By Amgen, 1999, p.46.
47. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11:165-190.
48. Hermann JA, Hall MA, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM. Important immunoregulatory role of interleukin-11 in the inflammatory process in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998; 41:1388-1397.
49. Okamoto H, Yamamura M, Morita Y, Harada S, Makino H, Ota Z. The synovial expression and serum levels of interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997; 40:1096-1105.
50. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood.* 1990; 75:40-47.
51. Trepicchio WL, Dorner AJ. Interleukin-11: a gp130 cytokine. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 856:12-21.
52. Sonis S, Edwards L, Lucey C. The biological basis for the attenuation of mucositis: the example of interleukin-11. *Leukemia.* 1999; 13:831-834.
53. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, et al. IL-12 upregulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells and B cells: synergism with IL-18 for IFN production. *J Immunol.* 1998; 161:3400-3407.

54. Vannier E, de Waal Malefyt R, Salazar-Montes A, de Vries JE, Dinarello CA. IL-13 induces IL-1 receptor antagonist gene expression and protein synthesis in peripheral blood mononuclear cells: inhibition by an IL-4 mutant protein. *Blood*. 1996; 87:3307-3315.
55. Kirman I, Vainer B, Nielsen OH. Interleukin-15 and its role in chronic inflammatory diseases. *Inflamm Res*. 1998; 47:285-289.
56. Dinarello CA, Moldawer LL. Interleukins and their receptors. In *Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis*. Edited By Amgen, 1999, p.52.
57. Aarvak T, Chabaud M, Miossec P, Natvig JB. IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. *J Immunol*. 1999; 162:1246-1251.
58. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 1999; 103:1345-1352.
59. Awane M, Andres PG, Li DJ, Reinecker HC. NF-kappa B-inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF- $\alpha$ -, and IL-1 beta-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *J Immunol*. 1999; 162:5337-5344.
60. Nakamura K, Okamura H, Wada M, Nagata K, Tamura T. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect Immun*. 1989; 57:590-595.
61. Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, et al. Cloning of a new cytokine that induces interferon-g. *Nature*. 1995; 378:88-91.
62. Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, et al. Cloning of the cDNA for human IFN-g-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol*. 1996; 156:4274-4279.
63. Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, Suemoto Y, Okamoto I, Usui M, et al. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J Immunol*. 1997; 158:1541-1550.

64. Tsutsui H, Nakanishi K, Matsui K, Higashino K, Okamura H, Miyazawa Y, et al. IFN-g-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J Immunol.* 1996; 157:3967-3973.
65. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunity to viruses. In *Immunology 5<sup>th</sup> Edition*. Mosby 1998; p222
66. Pestka S, Langer J A, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Ann.Rev. Biochem.* 1987; 56:727-777.
67. Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science.* 1986; 232:977-980.
68. Beutler B, Brown T. A CAT reporter construct allows ultrasensitive estimation of TNF synthesis, and suggests that the TNF gene has been silenced in non-macrophage cell lines. *J Clin Invest.* 1991; 87:1336-1344.
69. Kunkel SL, Remick DG, Strieter RM, Larrick JW. Mechanisms that regulate the production and effects of tumor necrosis factor-alpha. *Crit Rev Immunol.* 1989; 9:93-117.
70. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 1996; 334:1717-1723.
71. Ksontini R, MacKay SL, Moldawer LL. Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation. *Arch Surg.* 1998; 133:558-567.
72. Aiyer RA, Aggarwal BB. Tumor Necrosis Factor. In: Podack ER, ed. *CRC Handbook on cytolytic lymphocytes and complement: effectors of the immune system*. Boca Raton, Fla.: CRC press, 1988:105-132.
73. Beutler B, Cerami A. Cachectin (tumor necrosis factor): an endogenous mediator of shock and inflammatory response. In Oppeheim JJ, Shevach EM, eds. *Immunophysiology: the role of cells and cytokines in immunity and inflammation*. New York: Oxford University Press, 1990:226-237.

74. Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature*. 1986; 320:584-588.
75. Edwards CK III, Borchering S, Zhang J, Borchering DR. The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in acute and chronic inflammatory processes: novel therapeutic approaches. In: Schook LB, Laskin D, eds. *Xenobiotic-Induced Inflammation: Role of Cytokines and Growth Factors*. New York, NY: Academic Press; 1994:97-147.
76. Zhang M, Tracey KJ. Tumor necrosis factor. In: Thompson A, ed. *The Cytokine Handbook*. 3rd ed. San Diego, Calif: Academic Press; 1998:517-548.
77. Van der Poll T, van Deventer SJ, Hack CE, Wolbink GJ, Aarden LA, Buller HR, et al. Effects on leukocytes after injection of tumor necrosis factor into healthy humans. *Blood*. 1992; 79:693-698.
78. Van der Poll T, van Deventer SJ, Buller HR, Sturk A, ten Cate JW. Comparison of the early dynamics of systemic prostacyclin release after administration of tumor necrosis factor and endotoxin to healthy humans. *J Infect Dis*. 1991; 164:599-601.
79. van der Poll T, Romijn JA, Endert E, Borm JJ, Buller HR, Sauerwein HP. Tumor necrosis factor mimics the metabolic response to acute infection in healthy humans. *Am J Physiol*. 1991;261:E457-E465.
80. Van der Poll T, Levi M, Buller HR, van Deventer SJ, de Boer JP, Hack CE, et al. Fibrinolytic response to tumor necrosis factor in healthy subjects. *J Exp Med*. 1991; :729-732.
81. AB Roberts, MB Sporn. Transforming Growth Factor-beta. In *Human Cytokines* p. 408-418.
82. Maher JJ. Cytokines: Overview. *Sem liver Dis* 1999; 19: 109-115.
83. SL Friedman. Cytokines and Fibrogenesis. *Sem Liv Dis* 1999; 19:129-140
84. Nakamura T, Tomita Y, Hirai R, Yamaoka K, Kaji K, Ichihara A. Inhibitory effect of transforming growth factor- $\beta$  on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 133:1042-1050.

85. Braun L, Mead JE, Panzica M, Mimuko R, Bell GI, Fausto N. Transforming growth factor- $\beta$  mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:1539-1543.
86. M Masuhara, M Yasunaga, K Tanigawa, F Tamura, S Yamashita, I Sakaida, K Okita. Expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor  $\alpha$  and transforming growth factor  $\beta$ 1 messenger RNA in various human liver diseases and correlation with hepatocyte proliferation. *Hepatology* 1996; 24(2):323-329.
87. Benedetti A, Di Sario A, Baroni S G, Jezequel AM. Transforming growth factor - $\beta$ 1 increases the number of apoptotic bodies and decreases intracellular pH in isolated periportal and perivenular rat hepatocytes. *Hepatology* 1995; 22:1488-1498.
88. Ward SG, Westwick J. Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *Biochem J*.1998; 333:457-470.
89. Szekanecz Z, Strieter RM, Kunkel SL, Koch AE. Chemokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol*. 1998; 20:115-132.
90. Brieland JK, Flory CM, Jones ML, Miller GR, Remick DG, Warren JS, et al. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression and secretion in rat pulmonary alveolar macrophages by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleukin-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*.1995; 12:104-109.
91. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the innate immune response. *Science*. 1996; 272:50-53.
92. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*.1999; 340:448-454.
93. Dinarello CA, Moldawer LL. Cytokines and the inflammatory response. In *Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis*. Edited By Amgen, 1999, p.16-17.
94. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med*. 1994; 45:491-503.

95. Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*. 1997; 112:321S-329S.
96. Dinarello CA. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996; 216:133-165.
97. Moldawer LL, Copeland EM. Proinflammatory cytokines, nutritional support, and the cachexia syndrome: interactions and therapeutic options. *Cancer*. 1997; 79:1828-1839.
98. Izumi S, Hughes R D, Langley PG, Pernambuco JRB, Williams R: Extent of the acute phase response in fulminant hepatic failure. *Gut* 1994, 35:982-986.
99. Thomas HC Foster GR, Sumiya M, McIntosh D, Jack DL, Turner MW, Summerfield JA. Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet* 1996; 348:1417-1419.
100. I Roit, J Brostoff, D Male. *Immunology*. 5<sup>th</sup> Ed., Mosby. Chapter 25: 329-340.
101. S Sherlock, J Dooley. *Diseases of the Liver and Biliary System*. 9<sup>th</sup> Ed., Blackwell Scientific Publications. Chapter 16:260-292.
102. MA Marletta: Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993, 268: 12231-12234.
103. ER Wood, H Berger Jr, PA Sherman, EG Lapetina: Hepatocytes and macrophages express an identical cytokine inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 191: 767-774.
104. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682-685.
105. Fosterman U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric Oxide synthase isoenzymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23(2): 1121-1131.
106. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Loweinstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, Billiard TR. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the



- expression of inducible nitric oxide in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 522-526.
107. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology, and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 361-371.
  108. Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russell SW. Expression of nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergism between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1993; 268: 1908-1913.
  109. Hogg N, Darley-Usmar VM, Wilson MT, Moncada S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J* 1992; 281: 419-424.
  110. Nathan CF, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 13725-13728.
  111. Beasley D, Eldridge M. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically induce NO synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1994; 266(2): R1197-R1203.
  112. Marumo T, Nakaki T, Adachi H, Esumi H, Suzuki H, Saruta T, Kato R. Nitric oxide synthase mRNA in endothelial cells: Synergistic induction by interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide and inhibition by dexamethasone. *Jpn J Pharmacol* 1993; 63: 327-334.
  113. Mosmann TR. Role of a new cytokine, interleukin-10, in the cross-regulation of T helper cells. *Ann NY Acad Sci* 1991; 628: 337-344.
  114. Florquin S, Amraoui Z, Dubois C, Decuyper J, Goldman M. The protective role of endogenously synthesized nitric oxide in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. *J Exp Med* 1994; 180: 1153-1158.
  115. Kroncke KD, Fehsel K, Schmidt T, Zenke FT, Dasting I, Wesener JR, Bettermann H, Breunig KD, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing

- zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger -type yeast transcription activator LAC9. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 200: 1105-1110.
116. Billiard TR, Curran RD, Stuehr DJ, West MA, Bentz BG, Simmons RL. An L-arginine dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis. *J Exp Med* 1989, 169: 1467-1471.
  117. Stadler J, Curran RD, Ochoa JB. Effect of endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes in vitro and in vivo. *Arch Surg* 1991, 126: 186-191.
  118. Hutcheson IR, Whittle BJR, Boughton-Smith NK. Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Br J Pharmacol* 1990, 101: 815-820.
  119. MJS Miller, S Chotinaruemol, H Sadowska-Krowicka et al: Nitric oxide: The Jekyll and Hyde of gut inflammation. *Agents Actions* 1993; 39: C180-182
  120. AW Taylor-Robinson, FY Liew, A Severn, D Xu, S McSorley, P Garside, J Padron, RS Phillips: Regulation of immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol* 1994, 24: 980-984
  121. MB Grisham, GG Johnson, JR Lancaster: Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods in enzymology* 1996; 268: 237-246
  122. d'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, Smith B, Timpl R, Zardi L, Murphy G: Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 250: 751, 1997.
  123. Arthur MJP. Degradation of matrix proteins in liver fibrosis. *Path Res Pract* 1994; 190: 825-833.
  124. Fukuda Y, Imoto M, Koyama Y, Miyazawa Y, Nakano I, Hattori M et al. Immunohistochemical study on tissue inhibitors of metalloproteinases In normal and pathological human livers. *Gastroenterol Jpn* 1991; 26:37-41

125. Geisler S, Lichtinghagen R, Bxker KH, Veh RW. Differential distribution of five members of the matrix metalloproteinase family and one inhibitor (TIMP-1) in human liver and skin. *Cell Tissue Res* 1997; 289:173-183
126. Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-a and TGF-b1. *J Hepatol* 1999; 30: 48-60.
127. Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-a and TGF-b1. *J Hepatol* 1999; 30:48-60.
128. Arthur MJP. Matrix degradation in the liver: A role in injury and repair. *Hepatology* 1997; 26(4):1069-1071.
129. Lichtighagen R, Huegel O, Seifert T, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 and their inhibitors in peripheral blood cells of patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2000; 46:183-192.
130. Winwood PJ, Schuppan D, Iredale JP, Kawser CA, Docherty AJP, Arthur MJP. Kupffer cell-derived 95kDa type IV collagenase/gelatinase B: characterization and expression in cultured cells. *Hepatology* 1995; 22:304-315.
131. Milani S, Herbst H, Schuppan D, Grappone C, Pellegrini G, Pinzani S et al. Differential expression of matrix metalloproteinase 1 and 2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 1994; 144:528-537.
132. Benyon C R, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJP. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996; 110:821-831.
133. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 1987; 6:1899-1904.

134. Werb Z. Biochemical actions of glucocorticoids on macrophages in culture. Specific inhibition of elastase, collagenase and plasminogen activator secretion, and effects on other metabolic functions. *J Exp Med* 1978; 147:1695-1712.
135. Truden JL, Boros DL. Detection of  $\alpha$ 2-macroglobulin,  $\alpha$ 1-protease inhibitor and neutral protease-antiprotease complexes within the liver granulomas of schistosoma mansoni-infected mice. *Am J Pathol* 1988; 130:281-288.
136. Arthur MJP. Matrix degradation in the liver. *Semin Liver Dis* 1990; 10:47-55.
137. Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, Oshita M, Katayama K, Kato M. Circulating matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as serum markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Relationship to interferon response. *J Hepatol* 1997; 26:574-583.
138. Werb Z, Burleigh MC, Barrett AJ, Starkey PM: The interaction of  $\alpha$ 2-macroglobulin with proteinases. Binding and inhibition of mammalian collagenases and other metal proteinases. *Biochem J* 1974; 139:359-368.
139. Andus T, Ramadori G, Heinrich PC, Knittel T, Meywer Zum Buschenfelde KH. Cultured Ito cells of rat liver express the  $\alpha$ 2-macroglobulin gene. *Eur J Biochem* 1987; 168:641-646
140. Arthur MJP. Collagenases and liver fibrosis. *J Hepatol* 1995; 22(Suppl 2):43-48.
141. Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relatively to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996; 24:176-184.
142. Lichtinghagen R, Michels D, Haberkorn CI, Arndt B, Bahr M, Flemming P, Manns MP, Boeker KHW. Matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-7 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are closely related to fibroproliferative process in the liver during chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:239-247
143. Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999;19:129-140.

144. Greenwell P, Rojkind M. Accelerated development of liver fibrosis in CCl<sub>4</sub>-treated rats by the weekly induction of acute phaseresponse episodes: upregulation of alpha1(I) procollagen and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNAs. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1361:177-184.
145. Iredale JP, Goddard S, Murphy G, Benyon RC, Arthur MJ. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and interstitial collagenase expression in autoimmune chronic active hepatitis and activated human hepatic lipocytes. *Clin Sci (Colch)*1995; 89:75-81.
146. Murawaki Y, Yamamoto H, Kawasaki H, Shima H. Serum tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic liver disease and with hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 1993; 218:47-58.
147. Yata Y, Takahara T, Furui K, Zhang LP, Watanaba A. Expression of matrix metalloproteinase-13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in acute liver injury. *J Hepatol* 1999; 30:419-424.
148. Roeb E, Purucker E, Breuer B, Nguyen H, Heinrich PC, Rose JS et al. TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat. *J Hepatol* 1997; 27:535-544.
149. Haruta I, Tokushige K, Komatsu T, Ikeda I, Yamauchi K, Hayashi N. Clinical implication of vascular cell adhesion molecule-1 and very late activation antigen-4 interaction, and matrix metalloproteinase-2 production in patients with liver disease. *Can J Gastroenterol* 1999; 13: 721-727.
150. Muzzillo DA, Imoto M, Fukuda Y, Koyama Y, Saga S, Nagai Y, Hayakawa T. Clinical evaluation of serum tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in patients with liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1993; 8:437-441.
151. Ueno T, Tamaki S, Sugawara H, Inuzuka S, Torimura T, Sata M et al. Significance of serum tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in various liver diseases. *J Hepatol* 1996; 24:177-84.

152. Tsuchida T, Takahara T, Hioki O, Highuchi K, Watanabe A, Iwata K. Change of serum tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in fulminant hepatitis patients. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 1992; 89:1835.
153. Chisari FV: Hepatitis B virus transgenic mice: insights into the virus and the disease. *Hepatology* 1995, 22:1316-1325.]
154. Brieland JK, Flory CM, Jones ML, Miller GR, Remick DG, Warren JS, et al. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression and secretion in rat pulmonary alveolar macrophages by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleukin-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;12:104-109.
155. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM: Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 1996, 9:532-536.
156. Iwai H, Nagaki M, Naito T, Ishiki Y, Murakami N, Sugihara J et al.: Removal of endotoxin and cytokines by plasma exchange in patients with acute hepatic failure. *Crit Care Med* 1998, 26:873-876.
157. Nagaki M, Iwai H, Naiki T, Ohnishi H, Muto Y, Moriwaki H: High levels of serum interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  are associated with fatality in fulminant hepatitis. *J Infect Dis* 2000, 182:1103-1108.
158. Sekiyama KD, Yoshihara M, Thomson AW: Circulating proinflammatory cytokines (IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in fulminant hepatic failure and acute hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1994, 98:71-77.
159. Torre D, Zeroli C, Giola M, Ferrario G, Fiori GP, Bonetta: Serum levels of interleukin-1  $\alpha$ , interleukin-1  $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor in patients with acute viral hepatitis. *Clin Infect Dis* 1994, 18:194-198.

160. Berke G. Killing mechanisms of cytotoxic lymphocytes. *Current opinion in hematology* 1997; 4:32-40.
161. Orange J, Salazar-Mather T, Opal S, Biron C. Mechanisms for virus-induced liver disease: Tumor necrosis factor mediated pathology independent of natural killer and T cells during murine cytomegalovirus infection. *Journal of virology* 1997; 71:9248-9258.
162. Caselmann WH, Meyer M, Scholz S, Hofschneider PH, Koshy R. Type I interferons inhibit hepatitis B virus replication and induce hepatocellular gene expression in cultured liver cells. *Journal of infectious Diseases* 1992; 166:966-971.
163. Colucci G, Colombo M, Del Ninno E, Paronetto F. In situ characterization by monoclonal antibodies of the mononuclear cell infiltrate in chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1983; 85:1138-1145.
164. Scully LJ, Brown D, Lloyd C, Shein R, Thomas HC. Immunological studies before and during interferon therapy in chronic HBV infection: identification of factors predicting response. *Hepatology* 1990; 12: 1111-1117.
165. Lanzavecchia A. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Current Opinion in Immunology* 1996; 8: 348-354.
166. O'Garra A, Murphy K. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Current opinion in Immunology* 1994; 6: 458-466.
167. Berke G. Killing mechanisms of cytotoxic lymphocytes. *Current opinion in Hematology* 1997; 4: 32-40.
168. Milich DR, Sallberg M, Maruyama T. The humoral immune response in acute and chronic hepatitis B virus infection. *Seminars in immunopathology* 1995; 17: 149-166.
169. Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T, Cavalli A, Petit MA, Fiaccadori F. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *Journal of immunology* 1990; 145: 3442-3449.

170. Penna A, Chisari FV, Bertolotti A, Missale G, Fowler P, Giuberti T, Fiaccadori F, Ferrari C. Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A-2 restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Journal of experimental Medicine* 1991; 174: 1565-1570.
171. Nayersina R, Fowler P, Guilhot S, Missale G, Cerny A, Schlicht HJ, Vitiello A, Chesnut R, Person JL, Redeker AG et al. HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *Journal of Immunology* 1993; 150:4659-4671.
172. Milich DR, McLachlan A, Thornton GB, Hughes JL. Antibody production to the nucleocapsid and envelope of the hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site. *Nature* 1987; 329:547-549.
173. Milich DR. T- and B- cell recognition of hepatitis B viral antigens. *Immunology Today* 1988; 9:380-386.
174. Penna A, Del Prete G, Cavalli A, Bertolotti A, D'Elios M, Sorrentino R et al.: Predominant T helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis. *Hepatology* 1997, 25:1022-1027.
175. Bertolotti A, D'Elios MM, Boni C, De Carli M, Zignego A L, Durazzo M et al.: Missale G, Penna A, Fiaccadori F, Del Prete G, Ferrari C. Different cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and C virus infections. *Gastroenterology* 1997, 112:193-199.
176. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus Immunopathogenesis. *Annual Review of Immunology* 1995; 13:29-60.
177. Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV. The hepatitis B virus persists for decades after patients recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T lymphocyte response. *Nature Medicine* 1996; 2: 1104-1108.
178. Rehermann B, Lau D, Hoofnagle JH, Chisari FV. Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Clinical investigation* 1996; 97:1655-1665.



179. Guidotti LG, Chisari FV. To kill or to cure: Options in host defense against viral infection. *Current Opinion in Immunology* 1996; 8: 4768-483.
180. Ando K, Guidotti LG, Cerny A et al. CTL access to tissue antigen is restricted in vivo. *J Immunol.* 1994; 153:482-488.
181. Cavanaugh VJ, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 1997; 71:3236-3243.
182. Hyams KC. Risks of chronicity following acute hepatitis B infection: a review. *Clinical Infectious Diseases* 1995; 20: 992-1000
183. Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Maruyama T, Price J, Melhado I, Jirik F. Extrathymic expression of the intracellular hepatitis B core antigen results in T cells tolerance in transgenic mice. *Journal of Immunology* 1994; 152:455-466.
184. Jung MC, Diepolder HM, Pape GR. T cell recognition of hepatitis B and C viral antigens. *European Journal of Clinical Investigation* 1994; 24:641-650.
185. Reherman B, Fowler P, Sidney J, Person J, Redeker A, Brown M, Moss B, Sette A, Chisari FV. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *Journal of Experimental Medicine* 1995; 181:1047-1058.
186. Huang J, Kwong J, Sun EC, Liang TJ. Proteasome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein. *Journal of Virology* 1996; 70:5582-5591.
187. Carman WF, Trautwein C, van Deursen FJ, Colman K, Dornan E, Wasters J, Kliem V, Muller R, Thomas HC, Manns MP. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1996; 24:489-493.

188. David R Nelson and Johnson YN Lau. Pathogenesis of chronic hepatitis C virus infection. In Therapies for viral hepatitis. Edited by RF Schinazi, J-P Sommadossi and HC Thomas 1998 International Medical Press.
189. Bjorkander J, Cunningham-Rudles C, Lundin P, Olsson R, Soderstrom R, Hanson LA. Intravenous immunoglobulin prophylaxis causing liver damage in 16 of 77 patients with hypogammaglobulinaemia or IgG subclass deficiency. American Journal of Medicine 1988; 84: 107-111.
190. Diodati G, Bonetti P, Noventa F, Casarin C, Rugge M, Scaccabarozzi S, Tagger A et al. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant human interferon-2a: results of a randomized controlled clinical trial. Hepatology 1994; 19: 1-5.
191. Nagayoma R, Miyake K, Tsuda F, Okamoto H. IgM antibody to a hepatitis C virus core peptide (CP14) for monitoring activity of liver disease in patients with acute or chronic hepatitis C. Journal of Medical Virology 1994; 42:311-317.
192. Lau GKK, Lesniewski R, Johnson RG, Davis GL, Lau JY. Immunoglobulin M and A in chronic hepatitis C virus infection. Journal of Medical Virology 1994; 44:1-4.
193. Selby MJ, Choo QL, Berger K, Kuo G, Glazer E, Eckart M, Lee C, Chien D, Kuo C, Houghton M. Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. Journal of general Virology 1993; 74:1103-1113.
194. Pozzato G, Moretti M, Crovatto M, Modolo ML, Gennari D, Santini G. Lymphocyte subsets in HCV-positive chronic liver disease. Immunology Today 1994; 15:137-138.
195. Jarvis JN, Kaplan J, Fine N. Increase in CD5+ B-cells in juvenile rheumatoid arthritis. Relationship to IgM rheumatoid factor expression and disease activity. Arthritis and rheumatology 1992; 35:204.
196. D Drygiannakis, C Lionis, I Drygiannakis, G Pappas, E Kouroumalis. BMC Gastroenterology 2001, 1:4

197. Lenzi M, Cassani F, Ballardini G, Bianchi FB, Mishiro S, Unoura M, Kaneko S, Kobayashi K. Anti-HCV, anti-Gor and aytoimmunity. *Lancet* 1992; 339:871-872.
198. Lau JYN, Mizokami M, Davis G, Kolberg JA, Urdea M, Orito E, Polito A, DiNello R, Quan S. Relationship between the presence of circulating anti-GOR and hepatitis C viremia/genotype. *Journal of Hepatology* 1995; 22:707.
199. Botarelli P, Brunetto MR, Minutello MA, Calvo P, Unutmaz D, Weiner AJ, Choo QL et al. T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* 1993; 194:580-587.
200. Lechmann M, Ihlenfeldt HG, Braunschweiger I, Giers G, Jung G, Matz B, Kaiser R, Sauerbruch T, Spengler U. T and B cell responses to different hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C infection and in healthy anti-hepatitis C virus-positive blood donors without viremia. *Hepatology* 1996; 24:790-795.
201. Hoffman RM, Diepolder HM, Zachoval R, Zweibel FM, Jung MC, Scholz S, Nitscho H, Riethmuller G, Pape GR. Mapping of immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *Hepatology* 1995; 21:632-638.
202. Cooper S, Erickson A, Chein D, Weiner A, Houghton M, Parham P, Walker C. CD8+ CTL directed against multiple hepatitis C viral proteins early in the course of infection correlate with immunity and endure following viral clearance. USD-Japan Hepatitis Joint Panel Meeting, Pacific Grove, California, USA, 1998.
203. Onjii M, Kikuchi T, Kumon I, Mamusoto T, Ndano S, Kajino K, Horikee N, Ohta Y. Intrahepatic lymphocyte subpopulations and HLA class I antigen expression by hepatocytes in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1992; 39:340-343.
204. Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, Dienstag J, Houghton M, Ralston R, Walker BD. Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *Journal of Immunology* 1992; 149:3339-3344.

205. Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N, Choo QL, Houghton M, Ralston R, Walker BD. Hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV. *Journal of virology* 1993; 67:7522-7532.
206. Nelson DR, Bhardwaj B, Lau Jyn. HCV specific CTL: evidence for intrahepatic compartmentalization and participation in disease pathogenesis. *Hepatology* 1997; 26: 361A.
207. Fang JWS, Gonzalez-Peralta RP, Gottschall JA et al. Hepatic expression of c-Fas and apoptosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1994; 20:250A.
208. Hiramatsu N, Hayashi N, KatayamaK, Mochizuki K, Kawanishi Y, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994; 19: 1354-1359.
209. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B et al. Fas and perforin pathway as major mechanisms of T cell mediated cytotoxicity. *Science* 1994; 265:528-530.
210. Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. *Current topics Microbiology and Immunology* 1996; 206:149
211. Orland JR, Wright TL, Cooper S. Acute viral hepatitis C. *Hepatology* 2001; 33:
212. Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C infection. *Lancet* 1995; 346:1006-1007.
213. Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC: Detection of type-2 like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997, 25:449-458.
214. Bertoletti A, D'Elios MM, Boni C, De Carli M, Zignego A L, Durazzo M et al.: Missale G, Penna A, Fiaccadori F, Del Prete G, Ferrari C. Different cytokine profiles

- of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and C virus infections. *Gastroenterology* 1997, 112:193-199.
215. Napoli J, Bishop A, McGuinness P, Painter DM, McCaughan GW. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996; 24: 759-765.
216. Cacciarelli TV, Martinez OM, Gish RG, Villanueva JC, Krams SM. Immunoregulatory cytokines in hepatitis C virus infection: pre-and post-treatment with interferon alpha. *Hepatology* 1996;24:6-9.
217. Reiser M, Marousis CG, Nelson DR, Lauer G, Gonzalez-Peralta RP, Davis GL, Lau JYN. Serum interleukin 4 and interleukin 10 in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology* 1997; 26:471-478.
218. Kuzushita N, Hayashi N, Katayama K, Hiramatsu N, Yasumaru M, Murata H, Shimizu Y, Yamazaki T, Fushimi H, Kotoh K, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Increased frequency of HLA DR13 in hepatitis C virus carriers with persistently normal ALT levels. *Journal of Medical Virology* 1996; 48:1-7.
219. Peano G, Menardi G, Ponzetto A, Fenoglio LM. HLA-DR5 antigen. A genetic factor influencing the outcome of hepatitis C virus infection? *Archives of internal Medicine* 1994; 154: 2733-2736.
220. Kuzushita N, Hayashi N, Moribe T, Katayama K, Kanto T, Nakatani S, Kaneshige T, Tatsumi T, Ito A, Mochizuki K, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Influence of HLA haplotypes on clinical courses of individuals infected with hepatitis C virus. *Hepatology* 1998; 27:240-244.
221. Bamber M, Murray AK, Weller IVD et al. Clinical and histological features of a group of patients with sporadic non-A, non-B hepatitis. *Journal of Clinical Pathology* 1981; 34:1175.
222. Dotzauer A, Gebhardt U, Bieback K, Gottke U, Kracke A, Mages J, Lemon SM, Vallbracht A. Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of

- hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. *J Virol* 2000 Dec; 74(23): 10950-10957.
223. Silberstein E, Dveksler G, Kaplan GC. Neutralization of hepatitis A virus (HAV) by an immunoadhesin containing the cystein-rich region of HAV cellular receptor-1. *J Virol* 2001; 75(2): 717-725.
224. Cuthbert JA. Hepatitis A: old and new. *Clin Microbiol Rev* 2001 Jan;14(1):38-58.
225. Czaja MJ, Flanders KC, Biempica L, Klein C, Zern MA, Weiner FR. Expression of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1 in acute liver injury. *Growth Factors* 1989; 1: 219-226.
226. S Hiramatsu, J Kojima, TT Okada, K Ohmori: The serum protein profile in chronic hepatitis, cirrhosis and liver cancer. *Acta Hepatogastroenterol* 1976; 23: 177-182.
227. Cribier B, Schmitt C, Rey D, Lang JM, Kim A, Stoll-Keller F: Production of cytokines in patients infected by hepatitis C virus. *J Med Virol* 1998, 55:89-91.
228. Rossol S, Marinos G, Carucci P, Singer MV, Williams R, Naoumov NV Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1997, 99:3025-3033.
229. Fan XG, Liu WE, Li CZ, Wang ZC, Luo LX, Tan DM et al.: Circulating Th1 and Th2 cytokines in patients with hepatitis C virus infection. *Mediators Inflamm* 1998, 7:295-297.
230. Gett AV, Hodgkin PD: Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:9488-9493.
231. Spellberg B, Edwards JE Jr: Type1/type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2001, 32:76-102.
232. Di Marco R, Xiang M, Zacccone P, Leonardi C, Franco S, Meroni P et al.: Concanavalin A-induced hepatitis in mice is prevented by interleukin (IL)-10

- and exacerbated by endogenous IL-10 deficiency. *Autoimmunity* 1999, 31:75-83.
233. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW et al.: IL-10 acts on the antigen presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991, 146:3444-3451.
234. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995; 96: 2304–2310.
235. Mark E, Stearns ME, Rhim J, Wang M. Interleukin 10 (IL-10) Inhibition of Primary Human Prostate Cell-induced Angiogenesis: IL-10 Stimulation of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 and Inhibition of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2/MMP-9 Secretion. *Clin Ca Res* 1999; 189: 189–196.
236. Kossakowska E A, Edwards R D, Prusinkiewicz C et al. Interleukin-6 Regulation of Matrix Metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP-1) Expression in Malignant Non-Hodgkin's Lymphomas. *Blood* 1999; 94: 2080-2089.
237. Mtairag El M, Chollet-Martin S, Oudghiri M, Laquay N, Jacob MP, Michel JB et al. Effects of interleukin-10 on monocyte/ endothelial cell adhesion and MMP-9/ TIMP-1 secretion. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 882–890.

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ



## **ΣΚΟΠΟΣ**

Βαρύνουσα σημασία στην καταστροφή του ηπατοκυττάρου κατά την διάρκεια οξείας ιογενούς ηπατίτιδος έχει δοθεί στην κυτταρική ανοσία, ενώ άλλοι μηχανισμοί ηπατοκυτταρικής καταστροφής δεν έχουν επακριβώς μελετηθεί.

Σκοπός της παρούσης μελέτης αποτελεί η ανίχνευση νέων επιπρόσθετων μοντέλων καταστροφής του ηπατοκυττάρου, διαμέσου παραγωγής χυμικών παραγόντων, κατά την διάρκεια οξείας ιογενούς ηπατίτιδος. Η υπόθεση που θα ελεγχθεί βασίζεται στο γεγονός ότι αντιγόνα των ιών της ηπατίτιδος Α, Β, και C παρουσιάζονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (κυρίως κύτταρα Kupffer) στα T CD4+ λεμφοκύτταρα προκαλούν την παραγωγή μιας σειράς κυτταροκινών που οδηγούν στην ενεργοποίηση της πρωτογενούς και επίκτητης ανοσιακής απάντησης.

Μελετήσαμε τα τρία σκέλη της ανοσολογικής απάντησης διαμέσου της μέτρησης στον ορό των κυτταροκινών που συνδέονται με αυτές καθώς και ορισμένων από τους χυμικούς παράγοντες που θεωρούμε ότι μετέχουν στις φλεγμονώδεις διεργασίες. Αναλυτικότερα:

**Πρωτογενή ανοσολογική απάντηση:** *Κυτταροκίνες (IL-1, IL6, TNF-α) , πρωτείνες οξείας φάσεως (CRP, C3,σερουλοπλασμίνη CER, α1 αντιθρυψίνη AAT, αιποσφαιρίνη HAP), αναστολείς των πρωτεολυτικών ενζύμων (AAT, α2 μακροσφαιρίνη AMG),*

**Τύπου 1 ανοσολογική απάντηση:** *Κυτταροκίνες (IL-2, IL12, IFN- γ)*

**Τύπου 2 ανοσολογική απάντηση:** *Κυτταροκίνες (IL-4, IL10), κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα.*

**Μονοξειδίο του αζώτου (NO) και TGF-β**

**Μεταλλοπρωτεάσες και ιστικοί αναστολείς αυτών**

## **ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

Από το 1995-1997 19 ασθενείς με οξεία ιογενή ηπατίτιδα συμπεριελήφθησαν στην μελέτη (12 άνδρες, 7 γυναίκες) μέσης ηλικίας 29.95 ετών (από 16-65 ετών). 2 ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Α, 2 ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα C και 15 ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β.

Αιμοληψία εγένετο κατά την πρώτη και τρίτη ημέρα της εισόδου των ασθενών στην Γαστρεντερολογική Κλινική, το πρωί στις 8π.μ. και το απόγευμα στις 6 μ.μ. Ακολούθησαν οι

μετρήσεις στον ορό των ασθενών και σε κατεψυγμένο ορό 15 αιμοδοτών (8 άνδρες), ηλικίας από 18-45 ετών.

## ΜΕΘΟΔΟΣ

Οι μετρήσεις των κυτταροκινών έγιναν με εμπορικά διαθέσιμη ELISA. Οι μετρήσεις των πρωτεϊνών οξειάς φάσεως έγιναν με νεφελομετρία. Τα ανοσοσυμπλέγματα μετρήθηκαν επίσης με εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια σε νεφελόμετρο. Οι μετρήσεις των μεταλλοπρωτεασών έγιναν με δύο μεθόδους Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), και Gelatin zymography. Για τον προσδιορισμό της συστηματικής παραγωγής του NO, μετρήθηκε η συγκέντρωση στον ορό των δειγμάτων των ολικών νιτρικών (nitrite, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) και νιτρωδών (nitrate, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δεν ανιχνεύθηκε ημερήσια διακύμανση ή διαφορές ανάμεσα στην πρώτη και Τρίτη ημέρα νοσηλείας στις συγκεντρώσεις του ορού των κυτταροκινών, πρωτεϊνών οξειάς φάσεως, μεταλλοπρωτεασών και αναστολέων, NO και ανοσοσυμπλεγμάτων. Έτσι αναλύθηκε η μέση τιμή για τον κάθε ασθενή.

*Κυτταροκίνες της επίκτητης ανοσίας:* Οι τιμές στον ορό του TNF-α, IL-6, IL-1β βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένες στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$  και  $p < 0.01$  αντίστοιχα). *Th1 κυτταροκίνες:* Η IL-2 βρέθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ( $p < 0.0001$ ). Οι τιμές της IL-12 και της IFN-γ βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερες στους ασθενείς από την ομάδα ελέγχου ( $p < 0.05$  και  $p < 0.0001$  αντίστοιχα). *Th2 κυτταροκίνες:* Οι ασθενείς βρέθηκαν να έχουν υψηλότερες IL-4 και IL-10 τιμές σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $p < 0.001$  και  $p < 0.001$  αντίστοιχα). *TGF-β:* Τα επίπεδα στον ορό του TGF-β στους ασθενείς βρέθηκαν αυξημένα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $P < 0.05$ ). *Πρωτεΐνες οξειάς φάσεως:* Οι τιμές των CRP, AAT και C3 ήταν σημαντικά αυξημένες στους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ , και  $p < 0.01$ ). Οι τιμές της CER βρέθηκαν αυξημένες αλλά χωρίς σημαντική διαφορά. Σε αντίθεση η HAP βρέθηκε σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $p < 0.001$ ). *Ανοσοσυμπλέγματα (CIC):* Τα CIC στους ασθενείς είχαν μέση

τιμή μεγαλύτερη στους ασθενείς από την ομάδα ελέγχου ( $p < 0.001$ ). Η θετική συσχέτιση των CIC με τον παράγοντα του συμπληρώματος C3 πιθανόν εν μέρει να εξηγεί την απουσία επιπλοκής από νόσο ανοσοσυμπλεγμάτων μια που η σύνδεση τους με το συμπλήρωμα τα διατηρεί διαλυτά. *Μονοξείδιο του αζώτου (NO)*: Τα επίπεδα στον ορό των νιτρικών (nitrites  $\text{NO}_2^-$ ) και νιτρωδών (nitrates  $\text{NO}_3^-$ ) βρέθηκαν υψηλότερα στους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $p < 0.001$ ). *MMPs*: Η μέση τιμή συγκέντρωσης στον ορό όλων των MMPs ήταν μειωμένη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (MMP-1  $P < 0,05$ , MMP-3  $P < 0,05$ , MMP-2  $P < 0,001$ , και η MMP-9  $P < 0,05$ ). *TIMPs*: Δεν υπήρχε διαφορά στην συγκέντρωση του TIMP-1 ανάμεσα στους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες. ( $P = 0,984$ ). Αντιθέτως η τιμή του TIMP-2 και της ήταν στατιστικά αυξημένη στους ασθενείς έναντι των υγιών μαρτύρων ( $P < 0,001$ ). Και στην Zymography οι δύο γελατινάσες MMP-2 και MMP-9 έδειξαν μειωμένες τιμές στους ασθενείς από την ομάδα ελέγχου (και στις δύο περιπτώσεις  $P < 0,001$ ). *AMG*: Η AMG βρέθηκε αυξημένη στους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $P < 0.001$ ). Στους ασθενείς δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ MMP-1, MMP-3, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 ELISAs, MMP-2, MMP-9 Zymography και στα επίπεδα των τρανσαμινασών. Η αρνητική συσχέτιση της AMG με τις τρανσαμινάσες που παρατηρήθηκε οδηγεί στην υπόθεση ότι πιθανόν όσο αυξάνεται η AMG και κατά συνέπεια αναστέλλονται οι MMPs (όντως μία σημαντική αρνητική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της AMG και της MMP-1), τόσο μειώνεται η ηπατοκυτταρική καταστροφή. Η θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο αυξημένων αναστολέων AMG και TIMP-2 θέτουν υπόνοια κοινού ελέγχου παραγωγής των δύο αυτών αναστολέων την συγκεκριμένη χρονική στιγμή κάτι που δεν συμβαίνει με τον TIMP-1. Τα επίπεδα του τελευταίου παρά το ότι δεν βρέθηκαν αυξημένα εντούτοις παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με τις MMP-9, Z-MMP-9 και την Z-MMP-2. Εξ' άλλου οι τρεις αυτές MMPs είναι και οι μόνες από τις MMPs που σχετίζονται θετικά μεταξύ τους. Ανάλυση των συγκεντρώσεων MMPs και TIMPs σε σχέση με τον ιό ή την έκβαση της νόσου δεν έδειξε σημαντικές συσχετίσεις.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της υποομάδας των 15 ασθενών με οξεία ηπατίτιδα Β με την ομάδα ελέγχου δεν βρέθηκαν περαιτέρω διαφορές. Επίσης αναλύθηκαν τα αποτελέσματα των

16 ασθενών που παρουσίασαν ίαση (14 ασθενείς με ηπατίτιδα Β και 2 ασθενείς με ηπατίτιδα Α) και συγκρίθηκαν με τους 2 ασθενείς με ηπατίτιδα C και τον 1 ασθενή με ηπατίτιδα Β που ανέπτυξαν χρονιότητα. Παρά το ότι εξ' αιτίας του μικρού αριθμού και της ετερογένειας της δεύτερης ομάδας δεν μπορούν να στηριχθούν κατηγορηματικά συμπεράσματα, παρατηρήθηκε μία σημαντικά αυξημένη μέση τιμή της AAT ( $p < 0.05$ ) στην ομάδα αυτή σε σχέση με την πρώτη ομάδα των ιαθέντων ασθενών.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### **Στο ικτερικό στάδιο της αυτοπεριοριζόμενης οξείας ηπατίτιδας:**

Οποιοσδήποτε διακυμάνσεις της ανοσολογικής απάντησης κατά την διάρκεια οξείας μη-επιλεγμένης ιογενούς ηπατίτιδας επισυμβαίνουν σε χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από 3 ημέρες, ενώ ούτε ημερήσια διακύμανση παρατηρείται. Το προφίλ της ανοσολογικής απάντησης των ασθενών μας με την μικρή αύξηση των προφλεγμονωδών και την επικράτηση των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών αντανακλά την ήπια πορεία της νόσου και την τελική της έκβαση. Χυμικοί παράγοντες κυρίως της αρχέγονης ανοσολογικής απάντησης όπως οι κυτταροκίνες, οι πρωτεΐνες οξείας φάσεως, το μονοξειδίο του αζώτου, οι μεταλλοπρωτεάσες και οι αναστολείς τους συμμετέχουν ενεργά στο στάδιο αυτό της νόσου. Η αυξημένη τιμή των αναστολέων των μεταλλοπρωτεασών έχει να κάνει με την αδρανοποίηση των μεταλλοπρωτεασών και την διακοπή της επεξεργασίας της εξωκυτταρίου θεμελίου ουσίας μετά τον έλεγχο της ιικής λοιμώξεως. Η ανίχνευση μιας επικρατούσης ανοσολογικής απάντησης τύπου 2 στο στάδιο αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα χρονιότητα. Η χρησιμότητα της AAT ως προγνωστικού δείκτη επερχόμενης χρονιότητας και ο ρόλος του μονοξειδίου του αζώτου στον καθορισμό της ανοσολογικής απάντησης χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

# ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAT =  $\alpha$ 1-antitrypsin

ACTH = Adrenocorticotrophic hormone

Ag = Antigen

AIDS = Acquired immuno deficiency syndrome

AMG = Alpha 2 macro globulin

ANA = Antinuclear antibody

anti-HCV = Hepatitis C virus antibody

anti-LKM = Liver kidney microsome antibody

anti-NS4 = Non-structural 4 antibody

APC = Antigen presenting cell

APRIL = A proliferation-inducing ligand

bFGF = Basic fibroblast growth factor

BSF-2 = B cell stimulating factor-2

c-AMP = Cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate

CD40L = CD40 ligand

CIC = Circulating immuno complexes

cNOS = Constitutive nitric oxide synthase

Con A = Concavalin A

CRP = C reactive protein

CTL = Cytotoxic T lymphocyte

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assays

ECDGF = Embryonal carinoma-derived growth factor

ENA-78 = Epithelial-neutrophil activating protein

EGF = Epidermal growth factor

FSH = Folliculo stimulating hormone

GCP-2 = Granulocyte chemotactic protein-2

G-CSF = Granulocyte colony-stimulating factor

GM-CSF = Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

GH = Growth hormone

GR $\alpha,\beta,\gamma$  = Growth-related gene products  $\alpha,\beta,\gamma$

havcr-1 = Hepatitis A virus cellular receptor-1

HBsAb = Hepatitis B surface antibody

HBsAg = Hepatitis B surface antigen

HbeAg = Hepatitis B envelope antigen

HBx = Hepatitis B

HBV = Hepatitis B virus

HCV = Hepatitis C virus

ICAM-1 = Intracellular adhesion molecule-1

IgA = Immunoglobulin A

IgE = Immunoglobulin E

IgM = Immunoglobulin M

IGF-I = Insulin growth factor-I

IL-1 $\alpha$  = Interleukin-1 $\alpha$

IL-1b = Interleukin-1b

IL-1RA = Interleukin-1 receptor antagonist

IL-1RI = Interleukin-1 receptor I

IL-1RII = Interleukin-1 receptor II

IL-2 = Interleukin-2

IL-2R = Interleukin-2 receptor

IL-4 = Interleukin-4

IL-6 = Interleukin-6

IL-6R = Interleukin-6 receptor

IL-7 = Interleukin-7

IL-10 = Interleukin-10

IL-11 = Interleukin-11

IL-12 = Interleukin-12

IL-13 = Interleukin-13

IL-15 = Interleukin-15

IL-16 = Interleukin-16

IL-17 = Interleukin-17

IL-17R = Interleukin-17 receptor

IL-18 = Interleukin-18

IFN- $\alpha$  = Interferon- $\alpha$

IFN- $\beta$  = Interferon -  $\beta$

IFN- $\gamma$  = Interferon -  $\gamma$

iNOS = Inducible nitric oxide synthase

IP-10 = Interferon- $\gamma$  inducible protein-10

iNOS = Inducible nitric oxide synthase

KDa = Kilo Dalton

LAK = Lymphokine activated killers

LPB = Lipopolysaccharide binding protein

LPS = Lipopolysaccharide

MAF = Macrophage activating factor

MBP = Mannose binding protein

MCP = Monocyte chemoattractant protein

MCP-1 = Monocyte chemoattractant protein-1

MCP-2 = Monocyte chemoattractant protein-2

MCP-3 = Monocyte chemoattractant protein-3

M-CSF = Macrophage colony-stimulating factor

MHC I = Major histocompatibility complex I

MHC II = Major histocompatibility complex II

MIG = Monokine induced by IFN- $\gamma$



MIP-1 = Macrophage inflammatory protein-1  
MIP-1 $\alpha$  = Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$   
MIP-1 $\beta$  = Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$   
MMP-1 = Matrix metalloproteinase-1  
MMP-3 = Matrix metalloproteinase-3  
MMP-10 = Matrix metalloproteinase-10  
MMP-13 = Matrix metalloproteinase-13  
MMP-2 = Matrix metalloproteinase-2  
MMP-9 = Matrix metalloproteinase-9  
MMPs = Matrix metalloproteinases  
MT- MMPs = Trans membrane matrix metalloproteinases  
NF- $\kappa$ B = Nuclear factor  $\kappa$ B  
NGF = Nerve growth factor  
NO = Nitric oxide  
NO<sub>3</sub> = Nitrates  
NO<sub>2</sub> = Nitrites  
NK = Natural killer  
NOS = Nitric oxide synthase  
NS4 = Non structural 4  
NS5 = Non structural  
PAF = Platelet activating factor  
PCR = Polymerase chain reaction  
PF-4 = Platelet factor 4  
PG = Prostaglandin  
PGE<sub>2</sub> = Prostaglandin E2  
PGI<sub>2</sub> = Prostacycline  
PHA = Phytoemaglutinin

PDGF = platelet derived growth factor

PWM = Pokweed mitogen

PIIIP = Procollagen type III peptide

RANKL = Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand

RANTES = Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

SE = standard error

sIL-6R = Soluble interleukin-6 receptor

TBP = Thyroxin binding protein

TGF- $\beta$  = Transforming growth factor-  $\beta$

T<sub>H</sub>1 = T helper cell type 1

T<sub>H</sub>2 = T helper cell type 2

TIMP-1 = Tissue inhibitor of metalloproteinase-1

TIMP-2 = Tissue inhibitor of metalloproteinase-2

TIMPs = tissue inhibitors of mettaloproteinases

TNF-RI = Tumor necrosis factor receptor-I

TNF-RII = Tumor necrosis factor receptor-II

TNF- $\alpha$  = Tumor necrosis factor- $\alpha$

TACE = TNF- $\alpha$  converting enzyme

tPA = Tissue plasminogen activator

TRAIL = TNF-related apoptosis-inducing ligand

TRF = T cell replacing factor

TSH = Thyroid-stimulating hormone

TWEAK = TNF-like and weak inducer of apoptosis

uPA = Urokinase plasminogen activator

VCAM = Vascular cell adhesion molecule-1