

**ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΗΛΙΑΣ ΚΟΥΡΟΥΜΑΛΗΣ**

***ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗΣ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΙΣ
ΧΡΟΝΙΕΣ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΕΣ***

***ΠΑΠΑΚΥΡΙΑΚΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΤΟΥ ΚΥΡΙΑΚΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ ΕΙΔΙΚΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ***

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΠΙ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΑ

***ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002***

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Γενικό μέρος

Κεφάλαιο 1: Ανασκόπηση των υπο μελέτη παθολογικών οντοτήτων του ήπατος.

1. Χρονία ιογενής ηπατίτιδα.....	4
2. Πρωτοπαθής χολική κίρρωση.....	8
3. Ιογενής κίρρωση.....	10
4. Αλκοολική ηπατοπάθεια.....	13
5. Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα.....	14
6. Βιβλιογραφία.....	17

Κεφάλαιο 2 : Μηχανισμοί ηπατοκυτταρικού θανάτου.

1. Εισαγωγή.....	21
2. Ορισμοί βλάβης ηπατοκυττάρων.....	21
3. Κυτταρικοί, βιοχημικοί και μοριακοί μηχανισμοί κυτταρικής νέκρωσης.....	22
4. Δημιουργία και ρήξη φυσαλίδων πλασματικής μεμβράνης.....	23
5. Απώλεια της ενδοκυττάριας ιονικής ομοιόστασης.....	25
6. Οξειδωτικό στρες-προοξειδωτές και αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	29
7. Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και μείωση του ATP.....	34
8. Δράση υδρολασών.....	35
9. Δράση μεταλλοπρωτεασών.....	36
10. Μηχανισμοί νέκρωσης κυττάρων ήπατος σε κλινικές νόσους ήπατος.....	38
11. Αλκοολική ηπατοπάθεια.....	43
12. Νόσοι από συσσώρευση μετάλλων.....	44
13. Χολοστατική ηπατική νόσος.....	45
14. Ανοσοφλεγμονώδης ηπατική βλάβη.....	46
15. Βιβλιογραφία.....	50

Κεφάλαιο 3 : Απόπτωση και μηχανισμοί της.

1. Εισαγωγή.....	71
2. Καθορισμός του κυτταρικού θανάτου.....	72
3. Μορφολογία της απόπτωσης.....	73
4. Βιοχημεία της απόπτωσης.....	73
5. Γονιδιακοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί.....	74

6. Φαγοκυτταρικοί μηχανισμοί.....	80
7. Μεσολαβητικοί ρυθμιστικοί παράγοντες.....	81
8. Απόπτωση και παθογένεια των νόσων.....	81
9. Τεχνικές ανίχνευσης της απόπτωσης.....	84
10. Επίλογος.....	86
11. Βιβλιογραφία.....	88

Κεφάλαιο 4 : Απόπτωση και ηπατοπάθειες.

1. Εισαγωγή.....	96
2. Μορφολογική και βιοχημική άποψη για την απόπτωση στο ήπαρ.....	96
3. Βιοχημικοί προσανατολισμοί.....	99
4. Απόπτωση στην αλκοολική νόσο του ήπατος.....	102
5. Ηπατίτιδες.....	104
6. Χολοστατικές νόσοι του ήπατος.....	105
7. Νεοπλάσματα.....	106
8. Διάφορες άλλες καταστάσεις.....	106
9. Απόπτωση μετά από έκθεση του ήπατος σε εξωτερικούς παράγοντες.....	107
10. Συμπεράσματα.....	110
11. Βιβλιογραφία.....	111

Ειδικό μέρος

1. Σκοπός.....	120
2. Υλικά.....	120
3. Ασθενείς.....	121
4. Μέθοδος.....	122
5. Αποτελέσματα.....	130
6. Συζήτηση.....	142
7. Συμπεράσματα.....	156
8. Περίληψη.....	159
9. Φωτογραφίες.....	161
10. Επεξηγήσεις πινάκων και εικόνων.....	167
10. Πίνακες.....	170
11. Εικόνες.....	172
12. Βιβλιογραφία.....	182

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι ηπατοτρόποι ιοί Β, C, D και οι νεοπεριγραφέντες F και G, δεν θεωρούνται κυτταροτοξικοί και ο μηχανισμός καταστροφής των ηπατοκυττάρων στη χρόνια ηπατίτιδα, παραμένει άγνωστος. Τρεις πιθανοί μηχανισμοί καταστροφής είναι η απόπτωση, η καταστροφή μέσω κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων και η απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων από τα κύτταρα του Kupffer.

Έχουν περιγραφεί κάποια ογκογονίδια των οποίων οι πρωτείνες ενέχονται στο μηχανισμό της αποπτώσεως. Το ογκογονίδιο bcl-2 του χρωματώματος 18 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που λειτουργεί σαν αντιοξειδωτικό μέσο και παρεμποδίζει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο δηλαδή την απόπτωση. Η πρωτεΐνη εντοπίζεται σε περιοχές παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου όπως τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και η πυρηνική μεμβράνη. Επομένως αύξηση της εκφράσεως του ογκογονιδίου μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της αποπτώσεως ενώ μείωση μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της αποπτώσεως. Το ογκογονίδιο p-53 εντοπιζόμενο στο χρωματώμα 17, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη M.B 53 Kd που ενέχεται στην κυτταρική ανάπτυξη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύνδεση της πρωτεΐνης p53 με την bcl-2. Φαίνεται ότι η p-53 δρά ανταγωνιστικά προς την bcl-2 αυξάνοντας την απόπτωση. Για να γίνει αυτό πρέπει να σταθεροποιηθεί η πρωτεΐνη αυτή και να αυξηθεί ο χρόνος ημισείας ζωής της. Μια τέτοια σταθεροποίηση μπορεί να γίνει είτε με μεταλλαγή είτε με δέσμευση άλλων πρωτεϊνών που προέρχονται από κύτταρα ή από ιούς. Το ογκογονίδιο mdm-2 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία συνδεόμενη με την p-53 οδηγεί σε λειτουργική αδρανοποίηση της τελευταίας. Επομένως είναι πιθανόν η ισορροπία των ογκογονιδίων αυτών να καθορίζει το ρυθμό αποπτώσεως των ηπατοκυττάρων.

Η παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων από τα κύτταρα του Kupffer κατόπιν διεγερτικής δράσεως κυτταροκινών είναι επίσης ένας πιθανός μηχανισμός καταστροφής ηπατοκυττάρων.

Στην παρούσα μελέτη θα γίνει ανοσοιστοχημική μελέτη με τη χρήση της μεθόδου αλκαλικής φωσφατάσης-αντιαλκαλικής φωσφατάσης. Θα χρησιμοποιηθούν μονοκλωνικά αντισώματα κατά των πρωτεϊνών p-53, waf-1/p21, mdm-2 και bcl-2.

Επίσης θα μελετηθεί η υπερπαραγωγή ή η μειονεκτική παραγωγή μεταλλοπρωτεασών που παράγονται κυρίως από τα κύτταρα του Kupffer αλλά και τα κύτταρα του Ito σαν ένας δεύτερος πιθανός μηχανισμός καταστροφής των ηπατοκυττάρων.

Θερμά ευχαριστώ τον εμπνευστή της παρούσας μελέτης τον Καθηγητή Γαστρεντερολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης Κο Ηλία Κουρούμαλη του οποίου η συνεχής επίβλεψη και καθοδήγηση αποτέλεσε τον ακρογωνιαίο λίθο για την ολοκλήρωση της έρευνας και την εξαγωγή πολύτιμων συμπερασμάτων.

Τις θερμές μου ευχαριστίες εκφράζω στη Λέκτορα του Πανεπιστημίου Κρήτης Κα Μαρία Τζαρδή η οποία με βοήθησε στην μελέτη των τομών στο μικροσκόπιο και την ανάγνωση των ανοσοιστοχημικών ευρημάτων, όπως και την Κα Έλλη Καρύδι για την εκπαίδευση που μου παρείχε στην ανοσοιστοχημική τεχνική. Ευχαριστώ ακόμα για την βοήθεια που μου προσέφερε τον Καθηγητή Ανατομίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και πρώην επίκουρο καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Κρήτης Κο Παναγιώτη Κανναβάρο , ως επίσης και τον Καθηγητή Κλινικής Ιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης Κο Δ.Σπαντίδο που υποστήριξε την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ

ΟΝΤΟΤΗΤΩΝ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

Χρόνια ιογενής ηπατίτιδα

Χρόνια ιογενής ηπατίτιδα καλείται η χρόνια φλεγμονή του ήπατος που συνεχίζεται χωρίς σημεία βελτίωσης για χρονικό διάστημα άνω των έξι μηνών. Υποψία της νόσου τίθεται μετά την ανεύρεση παθολογικών δοκιμασιών της ηπατικής λειτουργίας και τεκμηριώνεται μόνον από τη βιοψία ήπατος. Οφείλεται σε ηπατοτρόπους ιούς όπως ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV), ο ιός της ηπατίτιδας D (HDV), ο ιός της ηπατίτιδας C, και η ομάδα των μη Α-μη Ε ιών. Σπανίως ο μεγαλοκυτταροϊός και ο ιός της ερυθράς μπορούν να προκαλέσουν χρόνια ηπατίτιδα σε νεογνά και ανοσοκατασταλμένους.

Περίπου 300 000 000 άνθρωποι βρίσκονται σε στάδιο χρόνιας ιοφορίας, ενώ 250 000 άτομα πεθαίνουν κάθε χρόνο από ηπατοπάθεια από τον ιό Β.

Θετικό αυστραλιανό αντιγόνο σε ποσοστό >10% του πληθυσμού, παρατηρείται σε υπανάπτυκτες περιοχές όπως η Ν Α Ασία, η Κεντρική Αφρική και η Κίνα και η μετάδοση γίνεται κάθετα και οριζόντια στην παιδική ηλικία, ενώ σε χώρες όπως η Β Αμερική, και η Β ή Δ Ευρώπη θετικό αυστραλιανό αντιγόνο παρατηρείται σε ποσοστό <1% με μετάδοση κυρίως κατά την ενήλικη ζωή σε ομάδες υψηλού κινδύνου όπως οι χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών, ομοφυλόφιλοι, τρόφιμοι ιδρυμάτων και πολυμεταγγιζόμενοι. Η Ελλάδα και άλλες χώρες της λεκάνης της Μεσογείου μερικές χώρες της Α Ευρώπης, της Κεντρικής και Νοτίου Αμερικής παρουσιάζουν μέτρια ενδημικότητα (1-5%) (1,2,3).

Όσον αφορά τους μηχανισμούς βλάβης του ηπατοκυττάρου φαίνεται ότι ρόλο σχετικά με τη μετάπτωση ή όχι σε χρονιότητα της μόλυνσης από HBV, παίζει η ανοσολογική δραστηριότητα του ξενιστή και ιδιαίτερα η κυτταρική ανοσία (1,4). Ο ίδιος ο HBV δεν είναι κυτταροτοξικός. Είναι πολύ μεγαλύτερη η πιθανότητα μετάπτωσης μιας οξείας λοίμωξης σε χρόνια εάν είναι ήπια και ασυμπτωματική παρά σε μια βαρεία ηπατοκυτταρική βλάβη και έντονη συμπτωματολογία, αποτελέσματα ισχυρής ανοσολογικής αντίδρασης.

Με τα πιο πάνω εξηγείται και η μη ύπαρξη βλάβης του ήπατος σε φορείς αντιγονικών συστατικών του HBV σε χρόνια αντιγοναιμία. Φαίνεται ότι η πιθανότητα ύπαρξης χρόνιας ηπατίτιδας έχει σχέση με το ρυθμό αναδιπλασιασμού του λοιμογόνου τμήματος του ιού (πυρήνας) (2).

Άμεσες ενδείξεις που να αποδίδουν στην ανοσολογική απόκριση του ξενιστή την πρόκληση χρόνιας ηπατικής βλάβης είναι α) το ότι οι ασθενείς με διαταραχές του ανοσολογικού συστήματος (AIDS, ΧΝΑ κ.λ.π) δεν παρουσιάζουν ενεργό νόσο β) στους ασθενείς με κεραυνοβόλο ηπατίτιδα Β παρατηρείται υπέρμετρη ανοσοαπάντηση γ) η απουσία φλεγμονής του ηπατικού παρεγχύματος σε πολλούς χρόνιους φορείς παρά τον ενεργό πολλαπλασιασμό του ιού. Επίσης δ) παρατηρείται παρουσία φλεγμονώδους κυτταρικής διήθησης του ηπατικού παρεγχύματος σε ασθενείς με οξεία ή χρόνια φλεγμονή ενώ ε) μετά από διέγερση του ανοσολογικού συστήματος με λεβαμιζόλη ή ιντερφερόνη ή μετά τη διακοπή θεραπείας με κορτικοειδή παρατηρείται έξαρση της ηπατοκυτταρικής νέκρωσης (5).

Πρόσφατα, επιβεβαιώθηκε η παρουσία ειδικών στο HBsAg κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων στις φλεγμονώδεις διηθήσεις του ήπατος ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β. Πιστεύεται ότι τα IgG anti-core αντισώματα που βρίσκονται σε υψηλούς τίτλους σε ηπατική φλεγμονή, καλύπτουν τα HBsAg στην ηπατοκυτταρική μεμβράνη και δυσκολεύουν έτσι την αναγνώριση των μολυνθέντων ηπατοκυττάρων από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (5,6).

Η παροδική υποκλινική νόσηση, αποτελεί το συχνότερο επακόλουθο της λοίμωξης από HBV. 15-20% των ασθενών με χρόνια ηπατοπάθεια θα μεταπέσει σε κίρρωση του ήπατος. Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα μπορεί να αναπτυχθεί και σε ασυμπτωματικούς φορείς αλλά και σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα και κίρρωση (7,8).

Η ηλικία το φύλο και η ύπαρξη ανοσοκαταστολής παίζουν σημαντικό ρόλο στην μετάπτωση της οξείας ηπατίτιδας σε κίρρωση. Ενώ το 90% των νεογνών που μολύνονται καθίστανται φορείς, μόνο το 10% εξακολουθεί να είναι στην ενηλικίωση HBsAg (+), και οι γυναίκες αρνητικοποιούνται σε μεγαλύτερο βαθμό από τους άνδρες (9,10,11,12).

Το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα είναι πλήρως ασυμπτωματικό ενώ συμπτώματα και σημεία παρουσιάζονται μετά την εγκατάσταση κίρρωσεως. Κακουχία, καταβολή, ηπατοσπληνική διόγκωση και αραχνοειδή αγγειώματα

αποτελούν τα συχνότερα συμπτώματα σε χρόνιους φορείς. 10-30% των ασθενών μπορεί να παρουσιάζουν ίκτερο, εγκεφαλοπάθεια, ασκίτη αιμορραγία από το πεπτικό, ενώ πολύ συχνά παρατηρούνται εξωηπατικές εκδηλώσεις λόγω ανοσοσυμπλεγμάτων όπως αγγειίτιδα, μυοκαρδίτιδα, σπειραματονεφρίτιδα, αρθρίτιδα, σύνδρομο Guilen Barre κ.λ.π. Τα πιο πάνω παρατηρούνται και σε ασθενείς με λοίμωξη HCV και HDV. 86% των ασθενών με HBV ηπατοπάθεια παρουσιάζουν πενταετή επιβίωση ενώ το ποσοστό μειώνεται στο 55% όταν παρατηρηθούν ευρήματα κίρρωσεως.

Ο HDV μολύνει το 5% των φορέων του HBsAg παγκοσμίως και ακολουθεί τους ίδιους τρόπους μετάδοσης αν και η γεωγραφική κατανομή της ενδημικότητας δεν ακολουθεί πιστά τον HBV **(13)**.

Ένας ασυμπτωματικός φορέας του ιού B γίνεται συμπτωματικός όταν μολυνθεί με ιό Δέλτα. Ο ιός Δέλτα με την είσοδο του τροποποιεί το ρυθμό πολλαπλασιασμού του ιού B, αρνητικοποιεί συνήθως το HBV-DNA και το HBcAg και σπανίως καταλήγει σε κάθαρση και του HBsAg που συνεπάγεται και ίαση από τον ιό Δέλτα. **(14)**. Η κατάληξη σε κίρρωση είναι πολύ συχνή σε περίπτωση επιλοίμωξης, με ποσοστό 50-70% βραδέως εξελισσόμενο, ενώ 20-25% έχουν ταχεία εξέλιξη. Μόνο 20% έχει καλοήγη πορεία **(15)**. Σε συνλοίμωξη το ποσοστό μετάπτωσης σε χρονιότητα είναι μικρότερο του 10% επειδή οι περισσότερες περιπτώσεις HBV λοίμωξης στους ενήλικες είναι αυτοπεριοριζόμενες και ο HDV δεν προκαλεί λοίμωξη μετά την απομάκρυνση του HBsAg.

Οι μεταγγίσεις αίματος και παραγώγων του όπως και η παρεντερική λήψη ναρκωτικών ουσιών αποτελούν τους κυριότερους γνωστούς τρόπους μετάδοσης της ηπατίτιδας C. Μεγάλο μέρος όμως των μολυνθέντων, ουδένα γνωστό παράγοντα παρουσιάζει. Το μεγάλο ενδιαφέρον για την ηπατίτιδα C οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι η λοίμωξη αυτή που είναι συχνή σε όλα τα γεωγραφικά διαμερίσματα του κόσμου σχετίζεται με νοσηρότητα και θνητότητα αφού στη φυσική εξέλιξη περιλαμβάνεται η ανάπτυξη κίρρωσης και ηπατοκυτταρικού καρκίνου **(16,17,18)**.

Το 70-90% των ασθενών που μολύνονται με τον HCV μεταπίπτει σε χρονιότητα - χρόνια ηπατίτιδα. Κάτω από το 20% παρουσιάζουν πλήρη ίαση με φυσιολογικές βιοχημικές εξετάσεις και απουσία ιστοπαθολογικών βλαβών στο ήπαρ με παράλληλη εξαφάνιση των δεικτών πολλαπλασιασμού του HCV. Το 20% παρουσιάζουν χρόνια ιαμία. Το 20% από αυτούς παρουσιάζει φυσιολογικό βιοχημικό έλεγχο και ιστολογική εξέταση, ενώ ένα 60% από αυτούς παρουσιάζουν ιστολογικές αλλοιώσεις

χρονίας ηπατίτιδας ποικίλης βαρύτητας και εξελιξιμότητας προς κίρρωση και ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Στο 20-25% των ασθενών με ηπατίτιδα C θα αναπτυχθεί κίρρωση μετά από 20 περίπου χρόνια από την αρχική έκθεση στον ιό και μετά από 25-30 χρόνια αναπτύσσεται ηπατοκυτταρικός καρκίνος σε ένα ποσοστό 3-4% κατά έτος παρακολούθησης, τουλάχιστον στην Ιαπωνία, ενώ στην Ευρώπη φαίνεται ότι το ποσοστό είναι σαφώς μικρότερο **(19)**.

Η μακροχρόνια διαδρομή και η ασυμπτωματική πορεία προσδίδουν στη χρόνια HCV ηπατίτιδα καλοήγη πρόγνωση. Πράγματι η θνητότητα από ηπατική ανεπάρκεια κατά την πρώτη 20ετία είναι χαμηλή χωρίς να επηρεάζει ουσιαστικά το προσδόκιμο επιβίωσης **(20)**. Σε πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε σε ασθενείς με αντιρροπούμενη κίρρωση ότι άρση της αντιρρόπησης συμβαίνει στο 17% και ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου στο 8% των περιπτώσεων κατά τη διάρκεια μέσου χρόνου παρακολούθησης 5 ετών. Η 5ετής και 10ετής επιβίωση σε αυτούς τους ασθενείς ήταν 91% και 76% αντίστοιχα **(21)**.

Τα δεδομένα αυτά υπογραμμίζουν τη σημασία της ηλικίας του ασθενούς που εξετάθη στη λοίμωξη αφού παρά τη μακροχρόνια διαδρομή το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών που νόσησαν από χρόνια ηπατίτιδα σε νεαρή ηλικία θα είναι ελαττωμένο. Αυτό γίνεται εμφανές και από το γεγονός ότι το 15-25% των ηπατικών μεταμοσχεύσεων γίνονται σε ασθενείς με HCV – κίρρωση **(22)**.

Από άποψη κατανομής και βαρύτητας φλεγμονής του ηπατικού παρεγχύματος η χρόνια ιογενής ηπατίτιδα παλαιότερα διαχωριζόταν σε τέσσερις ιστολογικούς τύπους, τη χρόνια ενεργό ηπατίτιδα, τη χρόνια εμμένουσα, τη χρόνια λοβιακή και τη χρόνια διαφραγματική. Η χρόνια ενεργός ηπατίτιδα αποτελεί προοδευτικά εξελισσόμενη φλεγμονώδη ηπατοκυτταρική βλάβη, που καταλήγει πολύ συχνά σε κίρρωση. Σήμερα ομιλούμε περί χρονίας ηπατίτιδος με βαθμίδες ως προς τη φλεγμονή (grading) και την ίνωση (staging). Η φλεγμονώδης δραστηριότητα στη χρόνια ηπατίτιδα διαβαθμίζεται σε τρεις βαθμίδες, την ήπια, τη μέτρια και τη σοβαρή. Οι ήπιας δραστηριότητας χρόνια ηπατίτιδα, η οποία αντιστοιχεί στην παλιά χρόνια εμμένουσα ηπατίτιδα, χαρακτηρίζεται από περιπυλαία διαβρωτική νέκρωση, περιορισμένη σε μικρό τμήμα της περιπυλαίας περιοχής χωρίς να προσβάλλονται όλα τα πυλαία διαστήματα. Η μετρίου δραστηριότητας χρόνια ηπατίτιδα χαρακτηρίζεται από διάβρωση στις περιπυλαίες ζώνες με προσβολή όμως ουσιωδών τμημάτων της περιμέτρου των σε όλα τα πυλαία διαστήματα. Η σοβαρής δραστηριότητας χρόνια

ηπατίτιδα, χαρακτηρίζεται από διαβρωτική νέκρωση με κατανομή όπως αυτή που περιγράφηκε για της μέτριας δραστηριότητας και επιπρόσθετα από περιδιαφραγματική διαβρωτική νέκρωση και/ή από διάχυτο γεφυροποιό νέκρωση που μπορεί να συνυπάρχει με διαβρωτική φλεγμονή **(23,24)**.

Πρωτοπαθής χολική κίρρωση

Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση είναι σπάνια ηπατική νόσος με προϊούσα εξέλιξη και χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή και ινώδη απόφραξη των ενδοηπατικών χοληφόρων σωληναρίων.

Ο επιπολασμός της κυμαίνεται από 3,7-14,4 περιπτώσεις ανά 100000 κατοίκους και η επίπτωση της από 5.8-15 περιπτώσεις ανά 1000000 κατοίκους ανά έτος. Ενίοτε φτάνει το 2% των θανάτων που οφείλονται σε κίρρωση **(25,26)**.

Το αίτιο της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης παραμένει άγνωστο, διάφορες παρατηρήσεις όμως υποδηλώνουν εμπλοκή ανώμαλης ανοσοαπάντησης σε διάφορους παράγοντες. Οι αποδείξεις είναι έμμεσες.

Η αναλογία γυναικών προς άνδρες είναι εννέα προς ένα, και υπάρχει αυξημένη επίπτωση αυτοαντισωμάτων όπως αντιμιτοχονδριακών, αντιθυρεοειδικών, και αντιπυρηνικών αντισωμάτων. Το 40% των ασθενών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση παρουσιάζουν κοκκιώματα στο ήπαρ ή στους εγγύς λεμφαδένες. Η λειτουργία των κατασταλτικών λεμφοκυττάρων είναι επηρεασμένη και πολλοί είναι ανεργικοί στη φυματίνη με διαταραγμένη μεταμόρφωση των λεμφοκυττάρων σε απάντηση φυτοαιμοσυγκολλητίνης. Συχνά συνυπάρχει με άλλες αυτοάνοσες νόσους όπως θυρεοειδίτιδα, ρευματοειδής αρθρίτιδα, συν. Sjogren και σκληροδερμία. Στο 80-90% των ασθενών παρατηρούνται υψηλά επίπεδα IgM του ορού και κρυοπρωτείνες αποτελούμενες από ανοσοσυμπλέγματα ικανά να ενεργοποιούν την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος **(27,28,29)**.

Η προοδευτική καταστροφή των μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων οδηγεί σε χολόσταση που οφείλεται σε μείωση των χοληφόρων πόρων εντός του ήπατος. Η ακολουθούμενη κατακράτηση χολικών οξέων, χολερυθρίνης, χαλκού και άλλων ουσιών που εκκρίνονται και απεκκρίνονται από το ήπαρ εντός της χολής οδηγούν σε περαιτέρω βλάβη των ηπατοκυττάρων, κνησμό, υπερλιπιδαιμία, σχηματισμό ξανθωμάτων, δυσαπορρόφηση λίπους και λιποδιαλυτών βιταμινών A, D, E και K και ασβεστίου. Η δυσαπορρόφηση βιταμίνης D και ασβεστίου οδηγούν σε

οστεομαλακία, η οστεοπόρωση όμως που είναι η βασικότερη διαταραχή των οστών δεν μπορεί ακόμα να ερμηνευτεί (25,26).

Ο κνησμός μπορεί να παρουσιαστεί στο τρίτο τρίμηνο της κύησης και να επιμείνει μετά τον τοκετό. Στην κλινική εξέταση διαπιστούται ηπατομεγαλία και αυξημένη χρώση του δέρματος. Ο ίκτερος παρουσιάζεται αργότερα στην πορεία της νόσου. Μερικές φορές παρατηρείται δακτύλιος Kayser-Fleischer.

Η αιμορραγία από κίρσους οισοφάγου μπορεί να προκύψει πριν παρουσιαστούν τα προηγούμενα συμπτώματα. Τα ξανθώματα αναπτύσσονται στο 10% των ασθενών και ανευρίσκονται στις παλάμες των χεριών και τα πέλματα, κατά μήκος των εκτατικών επιφανειών των αγκώνων και των γονάτων στους τένοντες των ποδοκνημικών και των καρπών και τους γλουτούς .

Τα συμπτώματα από τα οστά είναι κυρίως οστικός πόνος, αυτόματη συμπίεση των σπονδυλικών σωμάτων και γραμμοειδή κατάγματα των πλευρών .

Εργαστηριακά παρατηρείται αρχικά διπλασιασμός έως πενταπλασιασμός των τιμών της αλκαλικής φωσφατάσης και της 5'-νουκλεοτιδάσης του ορού καθώς και της γ-Gt. Οι τρανσαμινάσες είναι ηπίως αυξημένες. Η αλβουμίνη του ορού, η γ-σφαιρίνη και ο χρόνος προθρομβίνης είναι φυσιολογικά εκτός από μια αύξηση της IgM. Η χολερυθρίνη είναι στην αρχή φυσιολογική και αυξάνεται στη συνέχεια. Ο ορός είναι πάντα διαυγής και ουδέποτε γαλακτώδης παρά τις πολύ υψηλές τιμές χοληστερόλης. Τα αντιμιτοχονδριακά αντισώματα είναι αυξημένα στο 80-95% και στρέφονται κατά της γαλακτικής αφυδρογονάσης και άλλων ενζύμων που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια . Η σερουλοπλασμίνη του ορού είναι αυξημένη (29,30,31).

Η πρωϊμότερη αναγνωρίσιμη βλάβη (**στάδιο 1**) ονομάζεται χρόνια μη διαπυητική καταστροφική χολαγγειίτιδα. Χαρακτηρίζεται από καταστροφή των μικρών και μεσαίων χοληφόρων σωληναρίων, απο πυκνή διήθηση οξέων και χρόνιων κυττάρων φλεγμονής, ήπια ίνωση και ευκαιριακά στάση της χολής. Μερικές φορές περισωληναριακά κοκκιώματα και λεμφοθυλάκια βρίσκονται συνδεδεμένα με προσβεβλημένους χοληφόρους πόρους. Στο **στάδιο 2** οι αλλοιώσεις είναι πλέον εκτεταμένες αλλά λιγότερο ειδικές. Ο αριθμός των χοληφόρων εντός των πυλαίων διαστημάτων είναι μειωμένος και αυξάνεται ο αριθμός των άτυπων πτωχά σχηματισμένων χοληφόρων πόρων με ανώμαλα διαμορφωμένους αυλούς. Παρατηρείται διάχυτη πυλαία ίνωση και διήθηση από μονοπύρηννα εντός των πυλαίων.

Η χολόσταση στα στάδια 1 και 2 είναι περιπυλαία παρά περικεντρική. Στο **στάδιο 3** παρατηρείται μείωση των ενδολοβιακών πόρων, απώλεια ηπατικών κυττάρων και επέκταση της περιπυλαίας ίνωσης σε δίκτυο οζιδίων από συνδετικό ιστό μεταξύ πυλαίων διαστημάτων. Το **στάδιο 4** αντιπροσωπεύει το τελικό στάδιο της διαταραχής αυτής με σαφή κίρρωση και αναγεννητικούς όζους. Είναι δύσκολο να διαχωριστεί το στάδιο 4 της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης από άλλους τύπους κίρρωσης (32).

Η διάγνωση τίθεται με την χρόνια χολόσταση και την παρουσία των αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων. Η βιοψία ήπατος θα το επιβεβαιώσει.

Η μέση επιβίωση ασθενών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση σταδίου 4 κυμαίνεται από 7-11 χρόνια. Οι ασυμπτωματικοί ασθενείς έχουν εξαιρετικά μακρό χρόνο επιβίωσης. Χολερυθρίνη ορού >10mg%, μειωμένη λευκωματίνη ορού, ασκίτης και συμπτωματική πυλαία υπέρταση υποδηλώνουν φτωχή πρόγνωση. Η μεταμόσχευση ήπατος ενδείκνυται σε ασθενείς με ηπατική ανεπάρκεια τελικού σταδίου.

Κίρρωση

Ως κίρρωση ορίζεται η ίνωση του ήπατος η οποία καταλαμβάνει ολόκληρο το όργανο και χαρακτηρίζεται από την παρουσία αναγεννητικών όζων. Η παραπάνω τριάδα είναι απαραίτητη προϋπόθεση για να τεθεί η διάγνωση της πάθησης. Διαφορική διάγνωση πρέπει να γίνεται πάντοτε από την οζώδη αναγεννητική υπερπλασία, την εστιακή οζώδη υπερπλασία και τη συγγενή ηπατική ίνωση.

Η νέκρωση των ηπατικών κυττάρων και η ανάπτυξη στη συνέχεια συνδετικού ιστού είναι οι μηχανισμοί της παθολογικής αυτής οντότητας. Ευθύς μετά τη νέκρωση των ηπατοκυττάρων ακολουθεί σύμπτωση των λοβίων και ανάπτυξη στη θέση των νεκρωμένων κυττάρων νέου κολλαγόνου συνδετικού ιστού και δημιουργία ινωδών διαφραγμάτων. Τα ηπατοκύτταρα αναγεννώνται κατά μήκος των δοκίδων του λοβίου, σε διπλούς ή τριπλούς στίχους, ενώ καταργείται η διαδοχή πυλαίου διαστήματος-κεντρικής φλέβας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία όζων και την εγκατάσταση της τυπικής εικόνας της κίρρωσης. Ενώ στην αρχή η ίνωση είναι αντιστρεπτή στη συνέχεια εγκαθίσταται μόνιμα με ανάπτυξη πολλών νεόπλαστων χολαγγείων μέσα στα ινώδη διαφράγματα. Η ανάπτυξη ινωδών διαφραγμάτων μεταξύ πυλαίου διαστήματος-κεντρικής φλέβας αποτελούν το ανατομικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη πυλαίο-συστηματικής επικοινωνίας μέσα στο ήπαρ. Με την

παράκαμψη του αίματος από την πυλαία κυκλοφορία, το φυσιολογικό παρέγχυμα αιματούται ανεπαρκώς με συνέπεια την περαιτέρω ηπατοκυτταρική νέκρωση **(33)**.

Η συνήθης διαδικασία που οδηγεί σε κίρρωση είναι βραδεία, πράγμα που σημαίνει ότι από μόνη της η ηπατοκυτταρική νέκρωση δεν αρκεί για να οδηγήσει σε κίρρωση.

Η ταξινόμηση μπορεί να είναι είτε αιτιολογική είτε μορφολογική. Η πρώτη υπερέχει της δεύτερης και μπορεί να οφείλεται σε,

α)χολόσταση. Συχνές αιτίες χολόστασης είναι η πρωτοπαθής και η δευτεροπαθής χολική κίρρωση ως επίσης η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα .

β)αυτοάνοση ηπατίτιδα

γ)ιογενή ηπατίτιδα (B,C,D)

δ)αλκοόλ

ε)μεταβολικά νοσήματα όπως η αιμοχρωμάτωση, η νόσος του Wilson, η ένδεια α1-αντιθρυψίνης, η γαλακτοζαιμία, η τυροσιναιμία, οι γλυκογονώσεις τύπου IV και η α-βητα-λιποπρωταϊναιμία

στ) νόσος Rendu-Osler

ζ) φάρμακα όπως η μεθοτρεξάτη, η ισονιαζίδη, η α-μεθύλντόπα και η αμιοδαρόνη

η) εντερική παράκαμψη

θ) σαρκοείδωση

ι) απόφραξη ηπατικών φλεβών όπως το συν.Budd Chiari και η καρδιακή ανεπάρκεια .

Η παθολογοανατομική εικόνα δεν αποδεικνύει συνήθως το αίτιο, και σε μερικές περιπτώσεις παρά τον λεπτομερή έλεγχο μπορούμε να καταλήξουμε στη διάγνωση της κρυπτογενούς κίρρωσης .

Μορφολογικά η κίρρωση ταξινομείται σε μικροοζώδη, μεγαλοοζώδη και μικτό τύπο. Η μικροοζώδης κίρρωση που χαρακτηρίζεται από όζους διαμέτρου συνήθως < 3mm οφείλεται συνήθως σε δευτερογενή χολική κίρρωση, αιμοχρωμάτωση, και συν.Budd Chiari ως επίσης σε αλκοόλ, ενώ η μεγαλοοζώδης χαρακτηρίζεται από όζους μεγαλύτερους των 3mm σε διάμετρο και οφείλεται στη διακοπή της λήψης αλκοόλ, σε ιογενή ηπατίτιδα και στη νόσο του Wilson .

Οι μηχανισμοί που διατηρούν την ομοιοστασία μεταξύ των ηπατοκυττάρων και του υποστρώματος φαίνεται ότι όταν διαταράσσονται οδηγούν στην ηπατική ίνωση με την εμπλοκή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων τα οποία ελέγχουν τον μεταβολισμό του κολλαγόνου **(34,35,36)** .

Περίπου το 50% των ασθενών ανακαλύπτουν τυχαία την πάθηση τους. Οι υπόλοιποι με την προοδευτική εγκατάσταση των βλαβών οδηγούνται συνήθως σε ηπατοκυτταρική ανεπάρκεια και πυλαία υπέρταση με τις επιπλοκές τους όπως ο ίκτερος, ο ασκίτης, η ηπατική εγκεφαλοπάθεια και η αιμορραγία από το γαστρεντερικό σωλήνα. Η κίρρωση στην περίπτωση αυτή χαρακτηρίζεται μη αντιρροπούμενη ενώ όταν δεν υπάρχουν επιπλοκές, χαρακτηρίζεται αντιρροπούμενη. Επιπλοκές της κίρρωσεως είναι κήλη στο κοιλιακό τοίχωμα λόγω ασκίτη, πληκτροδακτυλία και υπερτροφική οστεοαρθροπάθεια (χολική κίρρωση), αύξηση μεγέθους των παρωτίδων (αλκοολικοί), χολολιθίαση, ηπάτωμα, ισχαιμία φλοιού του νεφρού και ηπατονεφρικό σύνδρομο, μικροβιακές λοιμώξεις εντερικής προέλευσης, σηψαιμία και αυτόματη βακτηριακή περιτονίτιδα.

Η κίρρωση δεν είναι αντιστρεπτή. Παρουσιάζει προϊούσα εξέλιξη και στην καλύτερη περίπτωση παραμένει στάσιμη. Έχει πολύ μεγάλη σημασία η πρόγνωση της, κυρίως για τους ασθενείς που θα υποβληθούν σε μεταμόσχευση. Κακή πρόγνωση παρουσιάζουν οι ασθενείς με υποπροθρομβιναιμία που επιμένει μετά από χορήγηση βιταμίνης K και συνοδεύεται από εκχυμώσεις, εμφανή ασκίτη, υψηλή αλκαλική φωσφατάση και χολερυθρίνη, αλβουμίνη ορού κάτω των 2.5 gr, νάτριο ορού <120 mEq/L, αιμορραγία από το γαστρεντερικό, μεγάλη ηλικία, επίμονη λήψη αλκοόλ και κακή θρέψη του ασθενούς. Γενικότερα όμως ασθενείς που μετέπεσαν σε μη αντιρροπούμενη κίρρωση λόγω κάποιου επιβαρυντικού παράγοντα που μπορεί να αντιμετωπισθεί, έχουν καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία από τους ασθενείς που μετέπεσαν σε μη αντιρροπούμενη κίρρωση αυτόματα.

Το 10% των ασθενών με αντιρροπούμενη κίρρωση μεταπίπτει σε μη αντιρροπούμενη κάθε χρόνο. Αυτοί παρουσιάζουν εξαετή επιβίωση 21% ενώ αυτοί που παραμένουν σε αντιρροπούμενη παρουσιάζουν 54% εξαετή επιβίωση (37).

Αλκοολική ηπατοπάθεια

Η κατανάλωση 40gr αλκοόλ ημερησίως είναι επικίνδυνη ποσότητα για ανάπτυξη κίρρωσης ενώ στις γυναίκες ακόμα και τα 20gr μπορούν να είναι επικίνδυνα. Διάφοροι γενετικοί ή και περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι εκείνοι που θα καθορίσουν το ποσοστό εκείνο των ατόμων με αυτή την κατανάλωση οινοπνεύματος που θα αναπτύξουν ηπατοπάθεια **(38,39)**.

Το ήπαρ είναι το όργανο στόχος για τους χρήστες αλκοόλ επειδή αυτό μεταβολίζει την αλκοόλη μέσω οξείδωσης. Ένα ενδιάμεσο προϊόν του μεταβολισμού της είναι η ακεταλδεύδη η οποία είναι πολύ τοξική, προκαλεί αποπολυμερισμό των πρωτεϊνών και παράγει τροποποιημένα αντιγόνα στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων επηρεάζοντας τη μορφή και τη λειτουργία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Επιπρόσθετα έχουμε αναγωγή του NAD, αύξηση του λόγου NAD/NADH και αλλαγή του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του ήπατος. Το υδρογόνο που παράγεται για καύσιμη ύλη αντικαθιστά τα τριγλυκερίδια με αποτέλεσμα τη συσσώρευση τους και την ανάπτυξη λιπώδους ήπατος. Οι μεγάλες ανάγκες παράλληλα του ηπατοκυττάρου σε οξυγόνο για την οξείδωση του NADH, προκαλεί μεγάλη διαφορά στη συγκέντρωση του οξυγόνου κατά μήκος των κολποειδών με μεγάλη ένδεια οξυγόνου στη ζώνη 3 όπου παρατηρείται νέκρωση **(38,40,41)**.

Τα κλινικά σύνδρομα της αλκοολικής ηπατοπάθειας είναι το λιπώδες ήπαρ, η οξεία αλκοολική ηπατίτιδα και η κίρρωση. Στο λιπώδες ήπαρ το λίπος παρουσιάζεται σαν ένα μεγάλο κενोटόπιο στο ηπατοκύτταρο και δημιουργεί την εικόνα που είναι γνωστή ως ‘‘δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου’’. Μπορεί όμως να παρουσιάζουν και αφρώδη εμφάνιση ως αποτέλεσμα των πολλών κενοτοπίων.

Στην οξεία αλκοολική ηπατίτιδα παρατηρείται εξοίδηση του πρωτοπλάσματος των ηπατοκυττάρων, λιπώδης διήθηση και νέκρωση, φλεγμονώδης διήθηση του παρεγχύματος από πολυμορφοπύρρηνα και αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου ενδολοβιακά. Γύρω από την ηπατική φλέβα κυρίως αλλά και σε ολόκληρο το λόβιο παρατηρούνται πυκνές πρωτεϊνικές συσσωρεύσεις στο πρωτόπλασμα του ηπατοκυττάρου. Ύφεση των ανωτέρω οδηγεί σε ίνωση γύρω από τα πυλαία διαστήματα και τις τελικές ηπατικές φλέβες.

Η κίρρωση μπορεί να είναι η πρώτη διάγνωση του αλκοολικού. Είναι τυπικά μικροοζώδης και επειδή το αλκοόλ αναστέλλει την αναγεννητική ικανότητα των

ηπατοκυττάρων, ο σχηματισμός όζων γίνεται βραδέως. Μπορεί να συνυπάρχουν στοιχεία λιπώδους διήθησης και αλκοολικής ηπατίτιδας. Με τη διακοπή του αλκοόλ η μικροοζώδης κίρρωση μετατρέπεται σε μεγαλοοζώδη λόγω της αποκατάστασης της αναγεννητικής ικανότητας των ηπατοκυττάρων. Σε ένα 5-15% αυτών εμφανίζεται ηπατοκυτταρικός καρκίνος (42).

Μη αλκοολική στεατοηπατίτις

Μη αλκοολική στεατοηπατίτις ορίζεται η ηπατίτιδα που έχει ιστολογικά ευρήματα ταυτόσημα με την αλκοολική ηπατίτιδα παρά την απουσία ιστορικού αλκοολισμού (43). Παρουσιάζει παγκόσμια κατανομή και διαπιστώνεται σε ποσοστό 1,2 % έως 9% των ασθενών που υποβάλλονται σε βιοψία ήπατος(44).

Τα κριτήρια διάγνωσης της νόσου είναι (45):

- 1) μακροφουσαλιδώδης ή μικροφουσαλιδώδης λιπώδης εκφύλιση του ήπατος με ενδολοβιακή ή πυλαία φλεγμονή με ή χωρίς σωματίδια του Mallory, ίνωση ή κίρρωση
- 2) πειστικό ιστορικό ασήμαντης κατανάλωσης αλκοόλ με αρνητική εξέταση αίματος για την παρουσία αιθανόλης και
- 3) απουσία ορολογικής ένδειξης για ιογενή ηπατίτιδα.

Καταστάσεις που σχετίζονται με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα είναι, η παχυσαρκία, ο διαβήτης και η υπεργλυκαιμία, η υπερλιπιδαιμία, η ταχεία απώλεια βάρους, η οξεία ασιτία, η ολική παρεντερική διατροφή, η παράκαμψη νήστιδος, η γαστροπλαστική και η παθολογική παχυσαρκία, η εκτεταμένη εκτομή λεπτού εντέρου, φάρμακα όπως η αμιοδαρόνη, Perhexiline maleate, γλυκοκορτικοειδή, συνθετικά οιστρογόνα, ταμοξιφαίνη κ.α. Επίσης διάφορες άλλες καταστάσεις όπως η εκκολπωμάτωση νήστιδος με υπερανάπτυξη μικροβίων, η λιποδυστροφία, η α-βηταλιποπρωτεϊναιμία, η νόσος Weber-Cristian, εμπύρετα νοσήματα, ενώ η πιθανότητα να οφείλεται σε άγνωστο μέχρι σήμερα ιό δεν μπορεί να αποκλεισθεί.

Η παθογένεια της είναι πολυπαραγοντική. Έχουν ενοχοποιηθεί μεταβολές των προσλαμβανομένων αμινοξέων, υπεργλυκαιμία, ανισορροπία αναβολικών και καταβολικών ορμονών στο αίμα της πυλαίας φλέβας και ενδοτοξιναιμία από σήψη ή βακτηριδιακή μετακίνηση, που σχετίζεται με την ασιτία. Θεωρείται ότι καθένας από τους παραπάνω παράγοντες μπορεί να τροποποιήσει το μεταβολισμό προς όφελος της

λιπογένεσης παρά της λιπόλυσης. Διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα ελευθέρων λιπαρών οξέων σε ηπατικό ιστό παχυσάρκων ασθενών και αυτή η συσσώρευση μπορεί να ευθύνεται για την ηπατική δυσλειτουργία επειδή τα λιπαρά οξέα μπορούν να προκαλέσουν βλάβη βιολογικών μεμβρανών (45).

Τα φάρμακα μπορούν να αναστείλουν τη β-οξειδωση δεσμεύοντας το συνένζυμο A, αναστέλλοντας τα μιτοχondριακά ένζυμα της β-οξειδωσης, διαταράσσοντας τη μιτοχondριακή δομή και λειτουργία, προκαλώντας πρόωρη οξειδωτική γήρανση του μιτοχondριακού DNA και αναστέλλοντας την αναπαραγωγή του μιτοχondριακού DNA ή τη μεταγραφή του. Τα λιπαρά οξέα τα οποία οξειδώνονται έτσι ελλιπώς από τα μιτοχόνδρια, μετατρέπονται κυρίως σε τριγλυκερίδια τα οποία συσσωρεύονται στο ηπατοκύτταρο, αλλά ένα μέρος τους παραμένει ως μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα που συμβάλλουν στην τοξική βλάβη των μιτοχondρίων και στη βαρύτητα της μικροφουσαλιδώδους στεατοηπατίτιδας (46).

Άλλοι παράγοντες που ενοχοποιούνται στην παθογένεια της στεατοηπατίτιδας είναι :

α) η ενεργοποίηση ορισμένων μικροσωμιακών ενζύμων όπως το κυτόχρωμα P450 2E1 (Cyp2E1), το οποίο μεταβολίζει την αιθανόλη και άλλα υποστρώματα σε αντιδραστικούς μεταβολίτες που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στις ηπατικές μεμβράνες και να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο, β) ενδοτοξιναιμία με συνακόλουθη υπερπαραγωγή κυτταροκινών, όπως ο παράγων νέκρωσης των όγκων (TNF-α) και οι ιντερλευκίνες-6 και -8, οι οποίες έχουν ενοχοποιηθεί για την εξέλιξη της ιστολογικής ηπατικής βλάβης σε ασθενείς με στεατοηπατίτιδα. Η άποψη ότι η ενδοτοξιναιμία και η παραγωγή κυτταροκινών συμβάλλουν στην εξέλιξη της NASH μετά από παράκαμψη της νήστιδας ενισχύεται από το γεγονός ότι θεραπεία με μετρονιδαζόλη βελτιώνει την ηπατική νόσο σε αυτήν και σε ορισμένες άλλες περιπτώσεις, όπως η στεατοηπατίτιδα που σχετίζεται με ολική παρεντερική διατροφή (47).

Στις περισσότερες περιπτώσεις η νόσος είναι ασυμπτωματική. Συμπτώματα που μπορούν να παρουσιαστούν είναι ακαθόριστη κοιλιακή δυσφορία, άλγος στο δεξιό υποχόνδριο η εύκολη κόπωση και κακουχία. Η ασυμπτωματική ηπατομεγαλία είναι το συχνότερο κλινικό εύρημα. Εργαστηριακά ανευρίσκονται αυξημένες τιμές ALT και AST στο πλάσμα κατά δυο η τρεις φορές. Η ALT αντίθετα με την αλκοολική ηπατίτιδα είναι συνήθως υψηλότερη από την AST (45,48). Η αλκαλική φωσφατάση είναι υψηλή σε λιγότερους από τους μισούς ασθενείς, η χολερυθρίνη σπανίως, ενώ η

λευκωματίνη του ορού και ο χρόνος προθρομβίνης σχεδόν πάντα φυσιολογικά. Η φερριτίνη του ορού είναι συνήθως υψηλή. Τα λιπίδια του ορού είναι παθολογικά (υπερχοληστεριναιμία και υπερτριγλυκαιριδαιμία) και το σάκχαρο αίματος υψηλό σε ποσοστό 25%-75% των ασθενών με στεατοηπατίτιδα.

Η διάγνωση της NASH μπορεί να επιβεβαιωθεί μόνο σε ασθενείς που δεν καταναλώνουν σημαντικές ποσότητες αλκοόλ.

Η στεατοηπατίτις ορίζεται ιστολογικά από το συνδυασμό στεατώσεως, ηπατοκυτταρικής βλάβης και νέκρωσης, φλεγμονώδους διήθησης και ίνωσης, που αναπτύσσεται σε έδαφος στεατώσεως. Οι πρώιμες βλάβες ανευρίσκονται στην κεντρολοβιακή περιοχή αλλά, καθώς η νόσος εξελίσσεται, οι βλάβες επεκτείνονται κατά μήκος του λοβίου, καταστρέφοντας τελικά τη φυσιολογική ηπατική αρχιτεκτονική, με τελική κατάληξη την κίρρωση (49). Η βιοψία δεν οδηγεί σε διαφορική διάγνωση αλκοολικής και μη-αλκοολικής στεατοηπατίτιδας με βεβαιότητα. Η στεατοηπατίτιδα παρουσιάζει ηπιότερες ιστολογικές βλάβες (50). Γενικά η βιοψία ήπατος είναι η μόνη εξέταση που μπορεί να αναγνωρίσει με βεβαιότητα και να ποσοτικοποιήσει την ηπατική νέκρωση, φλεγμονή και ίνωση, δηλαδή είναι η πιο ευαίσθητη και εξειδικευμένη εξέταση για την σταδιοποίηση της στεατοηπατίτιδας και την παροχή σημαντικών πληροφοριών για την πρόγνωση.

Γενικά η πορεία και η εξέλιξη της νόσου είναι βραδεία, ενώ δυνατόν και να μην εξελιχθεί προς βαρύτερες ιστολογικές βλάβες. Οι μισοί ασθενείς αναπτύσσουν εξελισσόμενη ίνωση και το ένα έκτο αναπτύσσει κίρρωση χωρίς να υπάρχουν κλινικά, εργαστηριακά ή ιστολογικά χαρακτηριστικά που μπορούν να προβλέψουν την εξέλιξη της νόσου ή να διαχωρίσουν ασθενείς με ή χωρίς επιδεινούμενη ηπατική νόσο, γιατί και συνιστάται ο περιοδικός κλινικοεργαστηριακός έλεγχος ασθενών με στεατοηπατίτιδα επί μακρόν (44).

Βιβλιογραφία

- 1) Realdi G, Albertia A, Rugg M et al: Long term follow-up of acute and chronic non A, non B post transfusion hepatitis:Evidence of progression to liver cirrhosis. Gut 1982,23:270-275.
- 2) Zuckerman A J, Thomas H C: Viral hepatitis. Scientific basis and clinical management. Churchill Livingstone, London 1993;1-21.
- 3) Rodriguez M, Riestra S, San Roman F , et al: Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in prospectively followed acute non-A, non-B hepatitis from different epidemiological categories. Liver 1991,11:129-133.
- 4) Rizzetto M. Viral infections of the liver. In Oxford Textbook of Clinical Hepatology, Birtcher J, Benhamou J-P,McIntyre N, Rizzetto M, Rodes J (eds). Second edition, Oxford Medical Publications, Oxford University Press 1999, 827-922.
- 5) Boyer JL, Reuben A: Chronic hepatitis. In Schiff L, Schiff ER: Diseases of the liver. JB Lippincott Company, Philadelphia 1993, P586-637.
- 6) Hoofnagle JH, Dr Bisceglie AM: serological diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. Seminars in Liver disease, 1991,11:73.
- 7) Fattovich G, Rugg M, Brolo L, et al: Clinical virology and histology out-come following seroconversion from HbeAg to anti-Hbe in chronic hepatitis type B. Hepatology 1986, 6:167-172.
- 8) Fattovich G, Brolo CM, Giustina G, et al: Longterm follow-up of anti Hbe possitive chronic active hepatitis B. Hepatology 1988,6:1651-4.
- 9) Lok ASF, Lai CL, A longitudinal follow up of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive Chinese children. Hepatology 1988;8: 1130-1133.
- 10) Fattovich G, Giusina G, Schalm SW et al: Occurrence of hepatocellular carcinoma and decompensation in western European patients with cirrhosis type B. Hepatology 1995;21:77-82.
- 11) McMahon BJ, Alberts SR, Wainwright RB, Bulkow L et al. Hepatitis B-related sequelae: prospective study in 1400 hepatitis B surface antigen-positive Alaska native carriers. Arch Intern Med 1990;150:1051-1054.

- 12) De Jongh FE, Janssen HLA, et al. Survival and prognostic indicators in hepatitis B surface antigen positive cirrhosis of the liver. *Gastroenterology* 1992;103:1630-1635.
- 13) Rizzetto M, Durazzo M: Hepatitis delta virus (HDV) infections. Epidemiological and clinical heterogeneity. *J Hepatol* 1991,13 (Suppl.4):S116-S118.
- 14) Smedile A, Rosina G, Saracco E et al. HDV replication modulates pathogenesis of HDV in chronic hepatitis D. *Hepatology* 1991;13:413-416.
- 15) Rizzetto M, Verme G. Delta hepatitis: present status. *J Hepatol* 1985;1:187-193.
- 16) Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, et al :The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
- 17) Esteban JI, Gonzalez A, Hernandez JM, et al: Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. *N Engl J Med* 1990, 323:1107-1112.
- 18) Rakela J, Redeker AG. Chronic liver disease after viral non-A, nonB hepatitis. *Gastroenterology* 1977, 77:1200-1202.
- 19) Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, et al . Inter relations of blood transfusion NonA, nonB hepatitis and hepatocellular carcinoma. Analysis by detection of antibodies to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990,12:671-5.
- 20) Seef EL, Buskel-Bales BSI, Wpight ECL et al. Long term mortality after transfusion associated NonA, NonB hepatitis. *N Engl J Med* 1992;327:1906-1911.
- 21) Fattouch G, Giustina G, Degos F ,et al. Morbidity in cryptogenic C (type C) compensated cirrhosis; a multicenter study. *Hepatology* 1995,22,4,pt2:350A.
- 22) Poterucha JJ, Gross JB. Hepatitis C after liver transplantation (editorial). *Gastroenterology* 1995,108:1314-7.
- 23) Ishac K, Baptista A, Bianchi L et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22:696-699.
- 24) Πατσιαούρα Κ. Νέα ταξινόμηση της χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας. *Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα-Επίκαιρα θέματα γαστρεντερολογίας* 1995'143-152.
- 25) Kaplan MM: Primary biliary cirrhosis. *N Eng J Med* 316:521,1987.
- 26) Kaplan MM. Primary biliary cirrhosis. Schiff L, Schiff E Eds. IN: *Diseases of the liver 7th edition* Philadelphia: Lip-pincott Co, 1993:377-390.
- 27) Peters M, Verlug , Gershwin MR, et al .Immunology and the liver *Hepatology* 1991, 13:977-93.

- 28) Beswick DR et al: Asymptomatic primary biliary cirrhosis: A progress report on long-term follow up and natural history. *Gastroenterology* 89: 267,1985. Yeaman SJ et al. PBC : Identification of two major M2 mitochondria autoantigens. *Lancet* 1:1067,1988.
- 29) Manns MP, Luttig B, et al. Autoimmune diseases: The liver. In: *The Autoimmune Diseases* (3rd Ed), Academic Press 1988, p.511-44.
- 30) Baum H, Berg PA. The complex nature of mitochondrial antibodies and their relation to PBC. *Semin Liver Dis* 1981;1:309-21.
- 31) Gershwin ME, Mackay IR, et al. Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1987; 138:3525-31.
- 32) Portmann B, MacSween RNM. Diseases of the intrahepatic bile ducts. In: MacSween RNM, Anthony PP, et al (eds). *Pathobiology of the Liver* 3th Edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994: 477-512.
- 33) Conn HO and Atterbury CE: Cirrhosis. In Schiff I and Schiff ER eds . *Disease of the Liver*. 6th ed. Philadelphia: JB Lippincott Co 1987, 725-864.
- 34) Everhart JE, Hoofnagle JH. Hepatitis B-related end-stage liver disease. *Gastroenterology* 1992;103:1692-4.
- 35) Pagliaro L, D'Amico G, Pasta L, et al. Portal hypertension in cirrhosis: natural history. In: Bosch J, Groszmann R (eds). *Portal hypertension: Pathophysiology and Treatment*. Black-well scientific, Cambridge, MA 1994: 72-92.
- 36) Gentilini P, Laffi G, LaVilla G, et al: Long course and prognostic factors of virus-induced cirrhosis of liver. *Am J Gastroenterol* 1997;92:66-72.
- 37) Propst A, Propst T, Zangeri G, et al. Prognosis and life expectancy in chronic liver disease. *Dig Dis Sci* 1995; 40:1805-15.
- 38) Lebiack WK: Cirrhosis in the alcoholic and the relation to the volume of alcohol abuse. *Ann NY Acad* 1975,252,185.
- 39) Morgan MY: The epidemiology of alcoholic liver disease in the U.K. In "Alcoholic Liver Disease", ed. P. Hall, Edward Arnold, London 1985, p 193.
- 40) Lieber CS: Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues. *N Engl J Med* 1988, 319,1639.

- 41) Khoruts A, Stanke L, McClain CJ et al: Circulating tumor necrosis factor, interleukin 1 and interleukin 6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 1991,13,267.
- 42) Sherlock S: Alcoholic hepatitis. *Alcohol* 1990, 25,189
- 43) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonoalcoholic steatohepatitis : Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* . 1980;55:434-8.
- 44) Sheth SG, Gordon FD, Chorpa S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997;126:137-145.
- 45) Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990;11:74-80.
- 46) Berson A, Fromenty B, Letteron P, Pessayre D. Drug –induced steatosis and steatohepatitis:from mitochondria dysfunction to lipid peroxidation. In: Arroyo V, Bosch J, Bruguera M, Rodes J,eds. *Therapy in liver diseases ;The pathophysiological basis of therapy*. Masson, 1997;261-273.
- 47) Diehl AM. Nonalcoholic steatohepatitis-clinical.In: Bloomer JR, Goodman ZD, Ishak KG, eds. *Clinical and pathological correlations in liver disease :Approaching the next millennium*.Annual postgraduated course of the AASLD. 1998:284-290.
- 48) Bacon BR, Farahvash, MJ,Janney CG, et al.Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology*. 1994;107:1103-9.
- 49) Hall PD. Pathological spectrum of alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol. Suppl*. 1994;2:303-313.
- 50) Lee RG. Alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis-pathology. In: Bloomer JR, Goodman ZD, Ishak KG eds. *Clinical and pathological correlatios in liver disease: Approaching the next millennium*. Annual postgraduate course of the AASLD. 1998:274-283.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ

Εισαγωγή

Η βλάβη των ηπατοκυττάρων, είναι συχνή στην κλινική πράξη. Τα επίπεδα των τρανσαμινασών μετρώνται για να ελέγξουν την ύπαρξη ηπατοπάθειας αλλά δεν μπορούν να αξιολογήσουν την έκταση της βλάβης των ηπατοκυττάρων. Άρα η γνώση των μηχανισμών της βλάβης των ηπατοκυττάρων είναι σημαντική στην κλινική πράξη, γιατί τα τελευταία χρόνια έχει τραβήξει το ενδιαφέρον για την έρευνα.

Σε αυτό το κεφάλαιο γίνεται εστίαση σε πρόσφατες πληροφορίες, που αφορούν τους άμεσους πρωτοπαθείς ενδοκυττάρους, βιοχημικούς και μοριακούς μηχανισμούς που προκαλούν νέκρωση των ηπατοκυττάρων.

Ορισμοί βλάβης ηπατοκυττάρων

Η θανατηφόρα κυτταρική βλάβη, είναι μη αναστρέψιμη διαδικασία, που προκαλείται είτε με νέκρωση είτε με απόπτωση. Η κυτταρική νέκρωση ορίζεται σαν η βλάβη, που προκαλεί μη αναστρέψιμη απώλεια των μεταβολικών λειτουργιών του κυττάρου και της δομικής ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης. Η απώλεια της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης (κυτταρόλυση) είναι το κύριο χαρακτηριστικό της κυτταρικής νέκρωσης (1-3).

Η απόπτωση, ορίζεται καλύτερα μορφολογικά σαν πυρηνική και κυτταρική κλασματοποίηση που οδηγεί σε δημιουργία κλασμάτων που συνδέονται με μεμβράνες και περιλαμβάνουν δομικά ανέπαφα οργανίδια που αναφέρονται ως αποπτωτικά σωμάτια (4,5). Στην απόπτωση, η πλασματική μεμβράνη παραμένει ανέπαφη και συνήθως συμβαίνει μια χαρακτηριστικού τύπου υδρόλυση του DNA τύπου ανεμόσκαλας. Σε αντίθεση με την κυτταρική νέκρωση που συμβαίνει ως συνέπεια ενός επιβλαβούς περιβάλλοντος, στην απόπτωση τα κύτταρα λαμβάνουν

ενεργό μέρος στο θάνατο τους από την ενεργοποίηση μιας ειδικής σειράς (προγράμματος) γεγονότων (κυτταρική αυτοκτονία) (1,6-8). Η παραγωγή του ATP και η πρωτεϊνική σύνθεση αναστέλλονται στη νέκρωση, αλλά διατηρούνται στην “ενεργό” διαδικασία της απόπτωσης (4,9). Παρ’όλο που και η απόπτωση και η νέκρωση παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του κυττάρου, υποθανατηφόρα βλάβη (αναστρέψιμη διακοπή της κυτταρικής λειτουργίας χωρίς απώλεια της δομικής ακεραιότητας) αναγνωρίζεται σαν ένας παράγοντας κλειδί στη μακροχρόνια παθοφυσιολογική διαδικασία (π.χ παθολογική μεταβίβαση σήματος και ογκογένεση).

Η θανατηφόρα βλάβη κυττάρων από νέκρωση, χαρακτηρίζεται μορφολογικά από διόγκωση των ενδοκυττάρων οργανιδίων, πυκνωτικές αλλαγές του πυρήνα και δημιουργία φυσαλίδων της πλασματικής μεμβράνης (προβολές σαν φυσαλίδες) που αποκλείουν τα οργανίδια (2,10-13).

Συμβαίνει μη ειδική υδρόλυση του DNA (4). Μεταγενέστερες ρήξεις των φυσαλίδων οδηγούν σε απώλεια της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης, οδηγώντας στην απελευθέρωση κυτταροπλασματικών ενζύμων (όπως AST και LDH) στο εξωκυττάριο περιβάλλον (14,15). Η απελευθέρωση των κυτταρικών συστατικών προάγει μια φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλεί μια περαιτέρω βλάβη του ιστού, που δημιουργείται μέσω φλεγμονωδών κυττάρων, κυτταροκινών, κυτταροτοξικών κοκκίων και ενεργοποιημένων τοξικών ριζών οξυγόνου (16,17-19).

Η σειρά των γεγονότων που οδηγεί στην κυτταρόλυση αποτελεί τον νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Έτσι, στην κλινική πράξη, η νέκρωση έχει συχνά δύο κύρια χαρακτηριστικά:

- 1) το πρωτοπαθές γεγονός που επηρεάζει άμεσα το κύτταρο (π.χ μεταβολισμός ενός φαρμάκου που προκαλεί ενεργές ρίζες οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες και κυτταρική λύση) και
- 2) η δευτεροπαθής φλεγμονώδης αντίδραση στα προϊόντα της κυτταρικής λύσης.

Παρόλο που αναγνωρίζουμε τη σημασία του καταρράκτη της φλεγμονώδους αντίδρασης στο να προκαλεί ηπατική βλάβη, θα εστιάσουμε τη συζήτηση στα ενδοκυττάρια γεγονότα που προκαλούν νέκρωση των κυττάρων του ήπατος.

Κυτταρικοί, βιοχημικοί και μοριακοί μηχανισμοί κυτταρικής νέκρωσης.

Το ήπαρ είναι ένα από τα πιο μεταβολικώς ενεργά όργανα του σώματος και τα ηπατοκύτταρα, εκτελούν πολλαπλές λειτουργίες (20,21). Παρά τις αναρρίθμητες

διαδικασίες που εκτελούνται από το ήπαρ , οι μηχανισμοί που οδηγούν σε νέκρωση των ηπατοκυττάρων, μπορούν να ταξινομηθούν στις ακόλουθες κατηγορίες:

- 1) δημιουργία και ρήξη των φυσαλίδων της πλασματικής μεμβράνης
- 2) απώλεια ενδοκυττάριας ιονικής ομοιόστασης
- 3) οξειδωτικό στρες, που πηγάζει από την ανισορροπία μεταξύ προοξειδωτικών δυνάμεων και αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών ευνοώντας τους προοξειδωτές
- 4) μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και έλλειμμα ATP και
- 5) ενεργοποίηση των υδρολασών (π.χ πρωτεάσες, ενδονουκλεάσες και φωσφορυλάσες).

Σχεδόν σε όλα τα μοντέλλα νεκρωτικής βλάβης των κυττάρων του ήπατος, μπορεί να εμπλακεί τουλάχιστον μια από αυτές τις διαδικασίες. Επίσης, στην ανθρώπινη ηπατοπάθεια, αυτοί οι μηχανισμοί νέκρωσης μπορεί να δρουν παράλληλα (23,24).

Δημιουργία και ρήξη φυσαλίδων πλασματικής μεμβράνης

Παρόλο που η κυτταρική μεμβράνη μπορεί να βλαβεί άμεσα από εξωκυττάρια διαλύτες ή να διακοπεί από πρωτείνες που δημιουργούν πόρους (π.χ συμπλήρωμα, περφορίνη, κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα, α-τοξίνη των βακτηριδίων), οι περισσότερες αλλαγές στην πλασματική μεμβράνη, παρατηρούνται κατά τη διάρκεια νεκρωτικού τύπου κυτταρικής βλάβης, που προκαλεί αλλοίωση της μορφολογίας της πλασματικής μεμβράνης (10,11,13). Η δημιουργία φυσαλίδων είναι ουσιαστικά ένα γενικό χαρακτηριστικό της νεκρωτικής βλάβης.

Η δημιουργία φυσαλίδων κατά τη διάρκεια της νεκρωτικής βλάβης του ηπατοκυττάρου ακολουθεί γενικά μια συγκεκριμένη αλληλουχία γεγονότων, και έχουν περιγραφεί τρία στάδια στη δημιουργία των. Κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της κυτταρικής βλάβης, εμφανίζονται πολλές μικρές φυσαλίδες στην πλασματική μεμβράνη (**στάδιο I**). Η κυτταρική διόγκωση είναι ελάχιστη σ' αυτό το στάδιο. Καθώς η βλάβη συνεχίζεται, οι μικρές φυσαλίδες συνενώνονται για να δημιουργήσουν λίγες μεγάλες τελικές φυσαλίδες (**στάδιο II**), που διατηρούν τη λειτουργία φραγμού της φυσιολογικής πλασματικής μεμβράνης αλλά παρουσιάζουν αλλαγές στη δομή των λιπιδίων και την υδροφιλία (22).

Μέχρι αυτό το στάδιο η δημιουργία φυσαλίδων είναι αναστρέψιμη και μπορεί να συμβεί απορρόφηση αν το αίτιο της βλάβης αναστραφεί (π.χ επανοξυγόνωση ανοξικών ηπατοκυττάρων) (13,23-26). Μπορεί να συμβεί ρήξη και διαρροή των φυσαλίδων με επανασύνδεση της κυτταρικής μεμβράνης. Η διαρροή των φυσαλίδων οδηγεί σε απελευθέρωση των κυτταροπλασματικών ενζύμων (AST, LDH κλπ), που περιέχονται μέσα στις φυσαλίδες, στην κυκλοφορία, χωρίς να έχουμε κυτταρικό θάνατο (15,23). Αν η βλάβη επιμένει, θα παρουσιαστεί ρήξη των φυσαλίδων (**στάδιο III**). Η ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης και οι διαβαθμίσεις των διαμεμβρανικών ιόντων χάνονται με την έναρξη της ρήξης των φυσαλίδων και τα κυτταροπλασματικά συστατικά ATP, AST, LDH κλπ ελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο.

Παρόλο που δίνεται μεγάλη σημασία στο σχηματισμό φυσαλίδων κατά τη διάρκεια της νεκρωτικής βλάβης του κυττάρου, ο ακριβής μηχανισμός ή μηχανισμοί που προκαλούν δημιουργία φυσαλίδων παραμένει ασαφής (13). Δημιουργία φυσαλίδων δεν μπορεί να αποδοθεί στην οσμωτική διόγκωση επειδή τα κύτταρα που υπολείπονται σε ATP εμφανίζουν φυσαλίδες παρόλο που γίνεται κυτταρική συρρίκνωση σε υπερτονικό μέσο (27). Πρόσφατες μελέτες υποθέτουν ότι διακοπή των συνδέσεων κυτταρικής μεμβράνης-κυτταροσκελετού οδηγεί σε δημιουργία φυσαλίδων. Άρα διακοπή των συνδέσεων αυτών μπορεί να οφείλεται σε αποδιοργάνωση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, ή σε αλλαγές στη διπλή στοιβάδα των λιπιδίων, που εμποδίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ μεμβρανικών και κυτταρολυτικών κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών. Οι περισσότερες από τις μελέτες για το μηχανισμό δημιουργίας και ρήξης φυσαλίδων εστίαστηκαν στο ρόλο των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών στο να εμποδίζουν τις αλλαγές της λιπιδικής διπλής μεμβράνης. Παράγοντες που διακόπτουν τα μικροϊνίδια (π.χ κυτοχλασίνη και φαλοιδίνη) δημιουργούν φυσαλίδες στα ηπατοκύτταρα (28,29). Η φυσιολογική μετάβαση μεταξύ μονομερούς (G-actine) και ιώδους (F-actin) εξαρτάται από το ATP και ο κυτταροσκελετός μπορεί να αποδιοργανωθεί από το έλλειμμα του ATP (24,30).

Επιπλέον, οι αλλαγές στη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών, η αύξηση του κυτταροπλασματικού ελεύθερου ασβεστίου (Ca) και η οξειδωση των σημαντικών θειολικών ομάδων, μπορεί να προκαλέσουν αλλαγές στη διάταξη των

κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών οδηγώντας σε διακοπή της κυτταροσκελετικής ακεραιότητας (12,31-34).

Αποδόμηση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών όπως η σπεκτρίνη, από πρωτεάσες, έχει αναφερθεί κατά τη διάρκεια κυτταρικής βλάβης και αναστολή των πρωτεασών μπορεί να καθυστερήσει τη δημιουργία φυσαλίδων σε μερικά μοντέλα (32,35). Αλλοιώσεις στη διπλή λιπιδική μεμβράνη, που μπορούν να προκαλέσουν τη δημιουργία φυσαλίδων, περιλαμβάνουν λιπιδική υπεροξειδωση και αυξημένη δραστηριότητα φωσφολιπασών που οδηγεί σε βλάβες στη διπλή λιπιδική δομή ή υδροφιλία (13,22,34,36). Πράγματι, αναστολή της δραστηριότητας των φωσφολιπασών έχει αναφερθεί ότι καθυστερεί τον κυτταρικό θάνατο (36) και αλλαγές στην υδροφιλία της μεμβράνης έχουν αναφερθεί στις περιοχές ρήξης των φυσαλίδων (22). Έτσι πολλαπλές διαδικασίες και μηχανισμοί μπορούν να συμβάλουν στη διαταραχή της αλληλεπίδρασης μεταξύ κυτταρικής μεμβράνης-κυτταροσκελετού, οδηγώντας σε σχηματισμό φυσαλίδων, ρήξη και κυτταρική νέκρωση.

Απώλεια της ενδοκυττάριας ιονικής ομοιόστασης

Οι συγκεντρώσεις ιόντων είναι στεγανά ρυθμιζόμενες στο κύτταρο. Η ενδοκυττάρια ιονική ομοιόσταση συχνά διακόπτεται κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων νεκρωτικής βλάβης των κυττάρων (37). Η απενεργοποίηση των αντλιών ιόντων είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της διαβάθμισης ιόντων που συμβαίνει κατά τη διάρκεια κυτταρικής βλάβης σαν αποτέλεσμα ελλείμματος ATP και οξειδωτικής βλάβης. Το έλλειμμα ATP μπορεί να οδηγήσει σε απενεργοποίηση των κατά τα άλλα ανέπαφων αντλιών που εξαρτώνται από το ATP, ενώ το οξειδωτικό στρες άμεσα απενεργοποιεί την πρωτεΐνη των αντλιών οξειδώνοντας σημαντικές θειολικές ομάδες (12,25,34,37-41).

Το έλλειμμα ATP, αναστέλλοντας την K-Na ATPase της πλασματικής μεμβράνης, προκαλεί ταχεία αύξηση στο κυτταρικό νάτριο και απώλεια ενδοκυττάριας K^+ (37). Ο ρόλος των αλλαγών K^+ και Na^+ κατά τη διάρκεια της νεκρωτικής βλάβης παραμένει αβέβαιος παρόλο που η απώλεια του K έχει χρησιμοποιηθεί σαν πρώιμος δείκτης κυτταρικής βλάβης (42).

Ενώ η συνάθροιση ενδοκυττάρου Na^+ μπορεί να προάγει τη διόγκωση του κυττάρου, η δημιουργία φυσαλίδων και η βλάβη συμβαίνει ανεξάρτητα από τις αλλαγές στον κυτταρικό όγκο (27). Πράγματι το κυτταρικό Na^+ αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό κατά τη διάρκεια ανοξικής βλάβης των ηπατοκυττάρων που έχουν προεπωαστεί με φρουκτόζη παρόλη την κυτταροπροστασία που σχετίζεται μ' αυτή την παρεμβολή (40). Ο ρόλος των μεταβολών στο κυτταρικό ελεύθερο Mg^{++} είναι εξίσου ασαφής. Τα επίπεδα του μαγνησίου αυξάνονται κατά τη διάρκεια κυτταρικής βλάβης αλλά η αύξηση βαίνει παραλλήλως προς το έλλειμμα του ATP, οδηγώντας στη σκέψη ότι η παρατηρούμενη αύξηση στο Mg^{++} οφείλεται στην απελευθέρωση Mg^{++} από τα συμπλέγματα Mg-ATP (23). Μεταβολές στο μαγνήσιο μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση ενδονουκλεασών που εξαρτώνται από μαγνήσιο και να ευθύνονται για την αποδόμηση του DNA που προκαλείται κατά τη διάρκεια νεκρωτικής βλάβης κυττάρων (4,43).

Φυσιολογικά τα ηπατοκύτταρα διατηρούν μια διαβάθμιση 1000πλάσια μεταξύ εξωκυτταρίου και ενδοκυτταρίου συγκεντρώσεως ιόντων ασβεστίου (26,44). Αλλαγές στο κυτταρικό ελεύθερο Ca^{++} ρυθμίζουν πολλές κυτταρικές λειτουργίες κλειδιά και παίζουν σημαντικό ρόλο στα γεγονότα μετάδοσης του σήματος, άρα αυστηρή ρύθμιση του Ca^{++} χρειάζεται για μια οργανωμένη κυτταρική λειτουργία (45,46). Ο ρόλος της ρύθμισης του Ca^{++} στην νεκρωτική βλάβη του κυττάρου έχει εκτενώς μελετηθεί και παραμένει ένα θέμα υπο συζήτησιν (9,26,44,47). Αυξήσεις στις συγκεντρώσεις Ca^{++} έχουν παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια ανοξίας, οξειδωτικού στρες, τοξικής βλάβης και άλλων μοντέλων ηπατοκυτταρικής βλάβης (9,33,34,37,38,44,48-53). Αυξημένες συγκεντρώσεις ασβεστίου, παρατηρούνται λόγω απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου από ενδοκυτταρίες αποθήκες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, εισόδου ασβεστίου διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης και ανεπαρκείας της φυσιολογικής απομακρύνσεως του ασβεστίου και των μηχανισμών αποθήκευσης (π.χ Ca^{++} -ATPase της πλασματικής μεμβράνης και ενδοπλασματικού δικτύου) (9,26,33,44,54). Αυξημένες συγκεντρώσεις Ca^{++} μπορεί να ενεργοποιήσουν πρωτεάσες, ενδονουκλεάσες και φωσφολιπάσες που εξαρτώνται από Ca^{++} (9,26,32,34,50,55-58).

Η ενεργοποίηση των πρωτεασών οδηγεί σε αποδόμηση ουσιωδών ενζύμων και κυτταροσκελετικών συστατικών, ενώ η ενεργοποίηση των φωσφολιπασών βλάπτει τις κυτταρικές μεμβράνες. Η αποδόμηση ουσιωδών κυτταρικών πρωτεϊνών και

μεμβρανών θεωρείται ότι προκαλεί κυτταρική νέκρωση. Η ενεργοποίηση της ενδονουκλεάσης, προκαλεί υδρόλυση του DNA εμποδίζοντας δυνητικές διαδικασίες επιδιόρθωσης που ρυθμίζονται από τη μετάφραση. Επιπλέον, εκτός από την ενεργοποίηση επιβλαβών υδρολασών, οι αυξημένες συγκεντρώσεις ιόντων ασβεστίου μπορεί να διακόψουν την μιτοχονδριακή λειτουργία, οδηγώντας σε μια απώλεια δυναμικού μιτοχονδριακής μεμβράνης, αναστολή της σύνθεσης ATP και παραγωγής προϊόντων τοξικού O₂ (38,44,52,59).

Έχει προταθεί από πολλούς ερευνητές, ένας σημαντικός ρόλος του ασβεστίου στη νεκρωτική βλάβη του κυττάρου:

- 1) έχει παρατηρηθεί ότι το Ca αθροίζεται στο νεκρωτικό ιστό (60)
- 2) μεταβολές στο Ca⁺⁺ έχουν ανιχνευθεί σε πολλούς τύπους θανατηφόρας κυτταρικής βλάβης και προηγούνται της απώλειας της κυτταρικής ζωτικότητας (34,37,52,53,61,62)
- 3) ειδικοί φορείς ιόντων Ca⁺⁺ (ιονομυκίνη, 4-βρωμο-A-23187) που αυξάνουν το ελεύθερο ασβέστιο στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων, είναι γνωστές τοξίνες, η τοξικότητα των οποίων παραλληλίζεται με τις μεταβολές στο ασβέστιο (63,64)
- 4) αναστολή της ενδοκυττάριας δραστηριότητας της πρωτεάσης που εξαρτάται από το Ca⁺⁺ μειώνει τη δημιουργία φυσαλίδων πλασματικής μεμβράνης και προστατεύει από κυτταρικό θάνατο σε πολλά μοντέλα ηπατοκυτταρικής νέκρωσης (56,65,66). Η αναστολή της δραστηριότητας της φωσφολιπάσης που εξαρτάται από το ασβέστιο είναι επίσης ένας προστατευτικός μηχανισμός (55,67,68)
- 5) τελικά, η απομάκρυνση του εξωκυτταρίου ασβεστίου ή η παρεμπόδιση αυξήσεων στις συγκεντρώσεις Ca⁺⁺ με ρύθμιση του ενδοκυτταρίου Ca⁺⁺ με χηλικούς παράγοντες Ca⁺⁺ (chelators) έχουν αναφερθεί ότι διατηρούν την κυτταρική επιβίωση κατά τη διάρκεια ποικίλων μοντέλων κυτταρικής νέκρωσης (37,52,69). (Αναστολείς καναλιών Ca⁺⁺ τασεοεξαρτώμενοι, δεν είναι χρήσιμοι στο να εμποδίσουν αυξήσεις Ca⁺⁺ στα ηπατοκύτταρα επειδή το επιθηλιακό κύτταρο δεν έχει κανάλια τασεοεξαρτώμενα στην κυτταρική μεμβράνη(45)).

Παρόλες αυτές τις παρατηρήσεις, είναι εμφανές ότι αυξήσεις των επιπέδων Ca⁺ δεν χρειάζονται για την κυτταρική νέκρωση (10,11,24). Η δημιουργία και η ρήξη φυσαλίδων παρατηρείται κατά τη διάρκεια ελλείμματος ATP από τη μεταβολική

αναστολή, παρά την απουσία αυξημένων συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{++} (10,24). Επιπλέον απομάκρυνση ασβεστίου από το εξωκυττάριο μέσον μπορεί ουσιαστικά να εντείνει τη κυτταρική βλάβη, μέσω δημιουργίας ειδών τοξικού O_2 από τα μιτοχόνδρια(44,70). Έτσι, ενώ διατηρούμενες αυξήσεις Ca^{++} μπορεί να προκαλέσουν ηπατοκυτταρική νέκρωση, αυξήσεις ασβεστίου μπορεί να μην είναι ζωτικές για όλους τους τύπους ηπατοκυτταρικής βλάβης. Ο ρόλος των ιόντων ασβεστίου στην νεκρωτική βλάβη των ηπατοκυττάρων *in vivo* αναμένει επιβεβαίωση και μπορεί να εξαρτάται από τη φύση και το μέγεθος της προσβολής.

Η κυτταρική οξείδωση, είναι προεξέχων χαρακτηριστικό στην κυτταρική βλάβη που χαρακτηρίζεται από έλλειμμα του ATP, και σχετίζεται με αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (12,40). Η απελευθέρωση των πρωτονίων από καθαρή υδρόλυση του νουκλεοσιδίου (π.χ ATP,ADP, GTP) , η δημιουργία γαλακτικού οξέος από αναερόβια γλυκόλυση και η έξοδος πρωτονίων από οξειδωτικά κυστίδια, όλα συνεισφέρουν στην ανάπτυξη κυτταρικής οξείδωσης (26,71). Επιπλέον, οι μηχανισμοί που ενεργούν στο να εμποδίσουν την κυτταρική οξείδωση μερικώς αναστέλλονται κατά την διάρκεια ελλείμματος ATP (26). Η κυτταρική οξείδωση προστατεύει από την κυτταρική νέκρωση ενώ η κυτταρική αλκαλοποίηση προάγει τον κυτταρικό θάνατο κατά τη διάρκεια ελλείμματος ATP και οξειδωτικού στρες (64,72-74). Η κυτταρική βλάβη αυξάνεται με ταχεία αποκατάσταση του κυτταρικού pH στο φυσιολογικό πριν την αποκατάσταση των συγκεντρώσεων του κυτταρικού ATP (12,26,74).

Το “παράδοξο ” του pH υποθέτει ότι η κυτταρική οξείδωση κατά τη διάρκεια του ελλείμματος ATP αντιπροσωπεύει ένα προσαρμοστικό μηχανισμό του κύτταρου για να εμποδίσει την νέκρωση (26). Παρόλο που οι μηχανισμοί του προστατευτικού αποτελέσματος της οξείδωσης εναντίον της κυτταρικής νέκρωσης παραμένουν ασαφείς, οι αλλαγές στο κυτταρικό pH έχουν μεγάλη επίδραση στην ενζυματική δραστηριότητα. Εκτός από τις όξινες υδρολάσες που βρίσκονται στα λυσοσώματα, τα περισσότερα ένζυμα αναστέλλονται από το όξινο pH. Συνεπώς η κυτταρική οξείδωση εμποδίζει την απώλεια της κυτταρικής ζωτικότητας αναστέλλοντας ουσιώδεις υδρολάσες αποδόμησης (π.χ πρωτεάσες και φωσφολιπάσες). Η φωσφολιπάση A_2 και οι καλπαίνες (calcium-dependency stein proteases) που έχουν ουδέτερο άριστο pH (optimum), αναστέλλονται από την κυτταρική οξείδωση (57,66). Η οξείδωση επίσης αναστέλλει τη δραστηριότητα της 5' νουκλεοτιδάσης

εμποδίζοντας τον κλωνισμό των υποστρωμάτων του ATP (75). Έτσι, αλλαγές στο κυτταρικό pH τροποποιούν την απάντηση στην κυτταρική βλάβη, ίσως με το να μεταβάλλουν την δραστηριότητα των ενζυματικών διαδικασιών αποδόμησης.

Οξειδωτικό stress – προοξειδωτικές και αντιοξειδωτικές οδοί

Οξειδωτικοί παράγοντες ή προοξειδωτές είναι άτομα ή μόρια που αφαιρούν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια ή άτομα. Αναγωγικοί παράγοντες ή αντιοξειδωτές είναι ενώσεις που εισφέρουν ηλεκτρόνια σε οξειδωτικούς παράγοντες, οδηγώντας στην αποτοξικοποίησή τους. Το κυτταρικό οξειδωτικό στρες επισυμβαίνει, όταν οι προοξειδωτικοί υπερκαλύπτουν τους κυτταρικούς αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς. Αυτή η ανισορροπία ανάμεσα στους προοξειδωτικούς και τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς μπορεί να οφείλεται είτε σε πλεονάζουσα δημιουργία οξειδωτικών ειδών είτε σε σχετική ανεπάρκεια αντιοξειδωτικών.

Προοξειδωτές Τα οξειδωτικά είδη που περισσότερο εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες περιλαμβάνουν το ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) την υδροξυλική ρίζα (OH^{\cdot}) το υποχλωρικό οξύ ($HOCl$), χλωραμίνες, ελεύθερο οξυγόνο και ρίζες υπεροξειδίου. Στα περισσότερα συστήματα το $O_2^{\cdot-}$ είναι συχνά το αρχικό είδος τοξικού οξυγόνου που δημιουργείται. Στα κύτταρα των θηλαστικών, ενζυματική δυσμετάλλαξη του $O_2^{\cdot-}$, του H_2O_2 συμβαίνει γρήγορα. Συνεπώς το H_2O_2 μπορεί να μετατραπεί στο έντονα αντιδρών OH^{\cdot} με αντιδράσεις μετάθεσης που καταλύονται από μέταλλα, ειδικά από σίδηρο. Τα κύτταρα επίσης περιέχουν ενζυματικές διαδικασίες που σχεδιάστηκαν για να αποτοξινώνουν το H_2O_2 μετατρέποντας το σε νερό.

Ανασκόπηση των βημάτων αναλυτικά:

$O_2^{\cdot-}$ δημιουργείται κατά τη διάρκεια φυσιολογικών δραστηριοτήτων σε μιτοχόνδρια, μικροσωμάτια και υπεροξεισωμάτια. Πράγματι το 1%-2% του O_2 που καταναλώνεται από τα μιτοχόνδρια, υπόκειται σε αναγωγή για να δημιουργήσει το $O_2^{\cdot-}$ από το συνένζυμο Q και το ανηγμένο σύμπλεγμα NADPH-συνένζυμο αναγωγάσης Q (59). Η παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ από τα μιτοχόνδρια αυξάνεται κάτω από μια ποικιλία παθολογικών καταστάσεων στις οποίες επηρεάζεται η μιτοχονδριακή μεταφορά ηλεκτρονίων (76-81). Η δραστηριότητα των ηπατικών μικροσωμάτων, κυρίως μέσω της δραστηριότητας του συστήματος των κυτταροχρωμάτων P450, μπορεί να δημιουργήσει $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 . Επιπλέον, ενώσεις που μεταβολίζονται από το

κυτταρόχρωμα P450 μπορεί να δημιουργήσουν είδη τοξικού O_2 κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού (82). Οι καλύτερα χαρακτηρισμένες οξειδάσες κυτταροπλάσματος, που προκαλούν δημιουργία τοξικού O_2 , είναι το ενζυμικό σύστημα οξειδάση και δευδρογενάση της ξανθίνης (83-86). Κάτω από συνθήκες έλλειψης ATP ή οξειδωτικού στρες η δευδρογενάση της ξανθίνης μετατρέπεται σε οξειδάση της ξανθίνης είτε μέσω πρωτεολυτικού τεμαχισμού είτε οξείδωσης σουλφυδρικών τμημάτων αντίστοιχα. Ο πρωτεολυτικός τεμαχισμός της δευδρογενάσης της ξανθίνης σε οξειδάση της ξανθίνης, είναι μη αναστρέψιμος, ενώ η οξειδωτική μετατροπή μπορεί να αναστραφεί με αναγωγικούς παράγοντες (87). Καθαρή υδρόλυση και μεταβολισμός του ATP κατά την διάρκεια κυτταρικής βλάβης, οδηγεί στη δημιουργία της ξανθίνης, ένα υπόστρωμα για την οξειδάση της ξανθίνης (83). Σε παρουσία επαρκών συγκεντρώσεων O_2^- , η δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης σε συσχέτιση με την άθροιση των υποστρωμάτων οδηγεί σε δημιουργία O_2^- . Η δραστηριότητα άλλων οξειδασών μπορεί επίσης να δημιουργήσει είδη τοξικού O_2 . Για παράδειγμα η δραστηριότητα της κυκλοοξυγενάσης και της λιποοξυγενάσης κατά την δημιουργία των προσταγλανδινών και λευκοτριενών μπορεί να δημιουργήσει O_2^- και ελεύθερο O_2 (88,89).

Τα είδη τοξικού οξυγόνου, παράγονται επίσης από φλεγμονώδη κύτταρα, συνεισφέροντας επιπλέον στο οξειδωτικό στρες της βλάβης του ιστού. Τα ουδετερόφιλα δημιουργούν O_2^- και υποχλωριώδες ανιόν μέσω της δραστηριότητας μιας οξειδάσης της μεμβράνης που σχετίζεται με την ανηγμένη μορφή NADPH, και της δραστηριότητας της μυελοπεροξειδάσης αντίστοιχα, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταροτοξικότητα που προκαλούν τα ουδετερόφιλα. Αντίδραση του HOCL με ενδογενείς αμίνες των ιστών οδηγεί σε δημιουργία μονοχλωραμινών και ταυρινεχλωραμίνης, που είναι δυνητικοί οξειδωτές (90). Τα ενεργοποιημένα κύτταρα του Kupffer δημιουργούν O_2^- μέσω της δραστηριότητας της οξειδάσης NADP (17,18,59). Τα μακροφάγα, τα κύτταρα Kupffer και το αγγειακό ενδοθήλιο μπορούν επίσης να δημιουργήσουν νιτρικά οξείδια, ένα βιολογικώς ενεργό προϊόν που προέρχεται από μετατροπή της L-arginine σε L-citrulline μέσω της συνθετάσης NO (91-93). Πρόσφατες μελέτες, δείχνουν ότι το NO αντιδρά με το O_2^- και δημιουργεί το περοξενιτρίδιον ($ONOO^-$) (93). Αυτό το ανιόν μπορεί να οξειδώσει σουλφυδρικές ομάδες και όταν πρωτονιοθεί μπορεί να αποσυντεθεί για να δημιουργήσει είδη που μοιάζουν με NO_2 και OH. Οι ρίζες που δημιουργούνται από

το NO φαίνεται να ευθύνονται για την αναστολή της μιτοχονδριακής αναπνοής και σύνθεσης DNA σε μοντέλα κυτταρικού θανάτου όγκων που εξαρτώνται από τα μακροφάγα (92,94).

Η ικανότητα και η βιολογική αντίδραση διαφορετικών ειδών τοξικού O_2^- , ποικίλουν. Το O_2^- είναι σχετικά ανενεργό και διαχέεται φτωχά διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών. Το H_2O_2 είναι επίσης ασθενής οξειδωτής, αλλά μπορεί να διαχυθεί μέσω του κυττάρου και δια μέσου των κυτταρικών μεμβρανών αντιδρώντας με ποικίλα κυτταρικά συστατικά (95,96). Οι χλωραμίνες και το HOCL είναι επίσης ασθενείς οξειδωτές (17). Αντίθετα το OH^\cdot και οι οργανικές ρίζες είναι ισχυρές αντιδραστικές ουσίες που μπορεί να συνδέουν πρωτείνες, να δημιουργούν θραύσματα στην αλυσίδα του DNA και να αντιδρούν με ζωικά κυτταρικά συστατικά (83,86,96-99). Σε πολλά μοντέλα κυτταρικής βλάβης, το OH^\cdot θεωρείται ότι είναι μια “κυτταροτοξική σφαίρα” που δημιουργείται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής βλάβης.

Τα είδη του τοξικού O_2 θεωρείται ότι προκαλούν κυτταρική νέκρωση μέσω οξείδωσης ουσιωδών κυτταρικών πρωτεϊνών, του DNA και λιπιδίων (100-102). Οξείδωση ουσιωδών θειολών μπορεί να οδηγήσει σε δημιουργία δισουλφιδίων (PrS-Sr-P) και μεικτών δισουλφιδικών πρωτεϊνών (PrS-SG) οδηγώντας σε απώλεια ουσιαστικών λειτουργιών των πρωτεϊνών (98). Αναστολή των πρωτεϊνών που μεταφέρουν ασβέστιο μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση ιόντων ασβεστίου με συνέπεια την ενεργοποίηση υδρολασών αποδόμησης που εξαρτώνται από το ασβέστιο (38)

Η οξείδωση σημαντικών πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, μπορεί να δημιουργήσει φουσαλίδες, ενώ οξειδωτική βλάβη στα μιτοχόνδρια προκαλεί απώλεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και έλλειμμα του ATP (100). Υδροξυλικές και άλλες ρίζες μπορεί να αντιδράσουν με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), σε μια σειρά αντιδράσεων που δημιουργούν ρίζες PUFA, ρίζες υδρουπεροξειδίων των λιπιδίων και υδριπεροξειδάσες λιπιδίων, οι οποίες όλες είναι ισχυρές αντιδρώσες ενώσεις (98,102). Οι ρίζες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μπορεί να αντιδράσουν με άλλες PUFA και να προάγουν περαιτέρω δημιουργία ριζών σε μια διαδικασία γνωστή σαν υπεροξείδωση των λιπιδίων. Επιπλέον ο ελεύθερος σίδηρος, μπορεί να επιταχύνει την αποσύνθεση των υπεροξειδίων των λιπιδίων σε προϊόντα που μπορεί να μετρηθούν σαν δείκτες υπεροξείδωσης των λιπιδίων και ως τοξικοί παράγοντες που μπορούν να οξειδώσουν ομάδες κυτταρικής θειόλης μακριά από την αρχική βλάβη (103,104). Έτσι, η διαθεσιμότητα του ελεύθερου ενδοκυττάρου σιδήρου έχει

σημαντικό ρόλο στην πρόκληση οξειδωτικού στρες. Με τον τρόπο αυτό, η υπεροξειδωση των λιπιδίων μπορεί να απλωθεί μέσα στο κύτταρο οδηγώντας `σε διακοπή της λιπιδικής μεμβράνης μακριά από την αρχική θέση δημιουργίας ελεύθερων ριζών . Η αυξημένη διαθεσιμότητα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο κύτταρο, μπορεί δυνητικά να προκαλέσει τη διαδικασία υπεροξειδωσης των λιπιδίων και να επιταχύνει τη βλάβη. Παρόλο που η υπεροξειδωση των λιπιδίων και η δημιουργία ελευθέρων ριζών έχει θεωρηθεί ότι είναι επικρατών μηχανισμός της οξειδωτικής βλάβης του κυττάρου, η υπεροξειδωση των λιπιδίων δεν έχει αποδειχτεί σε όλα τα μοντέλα οξειδωτικού στρες. **(104)**.

Επιπλέον, η υπεροξειδωση των λιπιδίων συμβαίνει ως ένα μη ειδικό μεταθανάτιο γεγονός, κάνοντας την αξιολόγηση του ρόλου της στην κυτταρική βλάβη δύσκολη. Όμως, η υπεροξειδωση των λιπιδίων συνήθως ανιχνεύεται σε πολλά κλινικά μοντέλα, σχετιζόμενα με ηπατοπάθειες, και η χρήση πιο ευαίσθητων μεθόδων επιτρέπει την ανίχνευση της δημιουργίας ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων πολλών τύπων κυτταρικής βλάβης **(105)**. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν συνδέσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων με την ηπατική ίνωση, και υποθέτουν ότι τα προϊόντα υπεροξειδωσης των λιπιδίων μπορεί να είναι ινωγενετικά **(106-109)**.

Αντιοξειδωτές Υπάρχει ένα πολύπλοκο αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα για να προστατεύσει τα κύτταρα από τη βλάβη των προοξειδωτών**(110)**.

Σημαντικό ρόλο για την αποτοξικοποίηση του H_2O_2 και του O_2^- παίζουν διάφορα ενζυματικά συστήματα. Το υπεροξειδίο της δισμουτάσης (SOD) είναι μια οικογένεια μεταλλοενζύμων που καταλύουν τη μετατροπή του O_2^- σε H_2O_2 **(84-86)**.

Το H_2O_2 που παράγεται από τη δραστηριότητα του SOD, μπορεί να αποτοξικοποιηθεί με ενζυματική μετατροπή σε νερό, είτε από τη γλουταθειόνη-περοξειδάση ή την καταλάση. Έτσι, ο συνδυασμός SOD και GSH περοξειδάσης ή καταλάσης αποτοξικοποιούν ουσιαστικά το O_2^- και το H_2O_2 . Η σημαντικότητα του SOD σαν αντιοξειδωτής έχει ξεκαθαρίσει καλύτερα με την ανακάλυψη ότι, η οικογενής πλάγια μυατροφική σκλήρυνση προκαλείται από μια απλή μεταλλαγή στο γονίδιο αυτού του ενζύμου**(111)**.

Η GSH περοξειδάση και GSH τρανσφεράση επίσης παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση άλλων οξειδωτικών ειδών**(112)**. Κατά τη μετατροπή των υδροπεροξειδίων σε H_2O , το GSH οξειδώνεται σε δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, το οποίο γίνεται ξανά GSH με την GSH αναγωγή χρησιμοποιώντας το NADPH σαν

συμπαράγοντα, βοηθώντας έτσι στη διατήρηση των ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων GSH. Εάν επιμένει το οξειδωτικό stress, εξαντλείται το NADPH, και το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης αποβάλλεται από το κύτταρο, οδηγώντας στην εξάντληση του GSH. Η συζευγμένη μορφή του GSH που παράγεται από τη δραστηριότητα της GSH-τρανσφεράσης, αποβάλλεται επίσης από το κύτταρο, οδηγώντας σε ενδοκυτταρική εξάντληση του GSH και επομένως αύξηση της κυτταρικής ευπάθειας στο συνεχιζόμενο οξειδωτικό στρες. Εμφανώς λοιπόν, οι ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις του GSH παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην προστασία του κυττάρου από το οξειδωτικό στρες.

Η διαμερισματοποίηση του GSH και των άλλων αντιοξειδωτών παίζουν επίσης τον ίδιο σημαντικό ρόλο όπως και οι κυτταρικές συγκεντρώσεις του GSH. Για παράδειγμα το GSH συντίθεται μόνο στο κυτταρόπλασμα ακόμα και αν βρίσκεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις στα μιτοχόνδρια(112). Η μεταφορά του γίνεται με μεταφορείς- μεσολαβητές(113).

Υπάρχουν όμως και άλλοι μηχανισμοί για να ξεφύγει το ηπατοκύτταρο από το οξειδωτικό στρες εκτός των ανωτέρω. Μικρού μοριακού βάρους ουσίες όπως το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ, η ταυρίνη, η β-καροτένη και η α-τοκοφερόλη δρουν σαν εξουδετερωτές ελευθέρων ριζών εμποδίζοντας την οξείδωση λιπιδίων και την κυτταρική βλάβη(110,114). Πράγματι, η α-τοκοφερόλη ένας αντιοξειδωτής κλειδί, προστατεύει το κύτταρο από πολλές οξειδωτικές βλάβες (115,116)λόγω της λιποδιαλυτότητας του, τόσο στην κυτταρική μεμβράνη όσο και στα οργανίδια του κυττάρου.

Αν και το αιφνίδιο οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική νέκρωση, μπορεί επίσης να έχει συμμετοχή στην κυτταρική λειτουργία και βιωσιμότητα. Μπορεί να ενέχεται στην τροποποίηση της αντιγραφής και της γονιδιακής έκφρασης, στην αλληλεπίδραση του ριβοσωμιακού messenger RNA , στην ανακύκλωση των μεμβρανικών υποδοχέων και στην έκφραση και κατανομή των μεμβρανικών πρωτεϊνών(117,108,118).

Ενδιαφέρον είναι ότι, η οξείδωση των πρωτεϊνών αυξάνεται με την ηλικία και η ικανότητα μεταβολισμού αυτών των οξειδωμένων πρωτεϊνών συσχετίζεται με το προσδόκιμο επιβίωσης στα ανώτερα σπονδυλωτά(70,119,120). Έτσι καταστάσεις οξειδωτικού στρες που δεν οδηγούν σε νέκρωση μπορούν οδηγήσουν σε πολλές σημαντικές παθοφυσιολογικές αλλαγές.

Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και μείωση του ATP

Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο με ένα από τους πιο κάτω δύο μηχανισμούς:

- 1) βλάβη στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, με άρση της μιτοχονδριακής σύνθεσης ATP, που οδηγεί σε μείωση του ATP και
- 2) διαπερατότητα προς το εσωτερικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης που ενοχοποιείται για τον κυτταρικό θάνατο με μηχανισμό που παραμένει αδιευκρίνιστος.

Δεν φαίνεται πάντως να σχετίζονται οι παραπάνω μηχανισμοί, αν και οφείλονται και οι δύο σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση εξαρτάται από την ηλεκτροχημική ($\Delta\psi$) διαβάθμιση και τη διαβάθμιση του pH (ΔpH) κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το άθροισμα $\Delta\psi$ και ΔpH παριστάνει την ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων ($\Delta\mu\text{H}^+$). Η $\Delta\mu\text{H}^+$ είναι η οδηγός δύναμη για την εισροή πρωτονίων κατά τη διάρκεια της σύνθεσης ATP με την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Για την κυτταρική βιωσιμότητα είναι πολύ σημαντική η διατήρηση του $\Delta\mu\text{H}^+$ και η σύνθεση του ATP. Η μείωση του ATP είναι προεξέχων χαρακτηριστικό της νεκρωτικής κυτταρικής βλάβης. Μια πληθώρα ενζυμικών συστημάτων απαιτεί ATP για την δράση των, ενώ η κυτταρική ομοιόσταση είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την διατήρηση των ενδοκυτταρίων συγκεντρώσεων ATP. Η μη ταχεία αναπλήρωση των απωλειών ATP οδηγεί σε ένα καταρράκτη γεγονότων που καταλήγει στην κυτταρική βλάβη και την νέκρωση(1,26).

Το πόσο σημαντική είναι η ελάττωση του ATP στους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου φαίνεται κατά την κυτταρική νέκρωση από ανοξία, χολικά άλατα, οξειδωτικό στρες και τοξική βλάβη(69,121-123).

Εκτός από τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, που αποτελούν την κυριότερη πηγή ATP, η διέγερση των μεταβολικών οδών που σχετίζονται με την ενέργεια, μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε μείωση του ATP, ειδικά σε καταστάσεις μέτριας μείωσης της κυτταρικής ροής.

Τη μείωση του ATP κατά τη διάρκεια στρες μπορεί να τροποποιήσει το ηπατικό γλυκογόνο με την απελευθέρωση γλυκόζης για τη γλυκολυτική παραγωγή ATP. Αν τα αποθέματα γλυκογόνου είναι μειωμένα έπεται γρήγορη μείωση του ATP(123).

Πρόσφατες ενδείξεις, προτείνουν ότι, αν και η μείωση του ATP είναι απαραίτητη για τη νέκρωση, δεν αρκεί μόνο αυτό. Ορισμένα μοντέλα ηπατοκυτταρικής νέκρωσης, διαχώρισαν την κυτταρική συγκέντρωση ATP από την κυτταρική νέκρωση(124-126). Το ενδιαφέρον εστιάζεται στη σχέση της κυτταρικής διαπερατότητας με τον κυτταρικό θάνατο(59,102,127-130). Υπό κανονικές συνθήκες, η μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι στεγανή για ουσίες που κινούνται κατά μήκος της και υπάρχουν ειδικοί μηχανισμοί μεταφοράς. Κατά την κυτταρική βλάβη όμως γίνεται διαπερατή για ηλεκτρολύτες και χαμηλού μοριακού βάρους ουσίες (102,129,130). Αυτή η αυξημένη διαπερατότητα μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε νέκρωση (μιτοχονδριακός θάνατος) (125,131).

Η αυξημένη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, μπορεί να οφείλεται σε βλάβες είτε της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης είτε σε μηχανισμό που οδηγεί σε άνοιγμα πρωτεϊνικών πόρων ή μεγάλων καναλιών (131-134), που αποτελεί τρόπο ειδικής διαπερατότητας. Αυτή η ειδική διαπερατότητα, επιτυγχάνεται με τη συσσώρευση στα μιτοχόνδρια λυσοφωσφολιπιδίων ή λιπαρών οξέων, είτε με αύξηση του ασβεστίου στην μιτοχονδριακή θεμέλιο ουσία (59,131,135,136).

Δύο φαρμακευτικές ουσίες, η L-καρνιτίνη και η κυκλοσπορίνη-A αναστέλλουν την έναρξη της ηπατοκυτταρικής νέκρωσης κατά τη διάρκεια οξειδωτικού στρες, ανοξίας, αναστολής της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης από μεταβολικούς αναστολείς (102,125,157) και θανατηφόρας υποξικής βλάβης των ενδοθηλιακών κυττάρων των κολποειδών του ήπατος.

Δράση υδρολασών

Διασπαστικές υδρολάσες είναι, οι πρωτεάσες, οι φωσφολιπάσες και οι ενδονουκλεάσες. Οι ενδονουκλεάσες εμπλέκονται επίσης στην απόπτωση γιατί και θα αναφερθούμε στο αντίστοιχο κεφάλαιο. Σύμφωνα με τις υπάρχουσες ενδείξεις, αναστολή των υδρολασών οδηγεί σε αναστολή της έναρξης της κυτταρόλυσης(36,56,57,66,68,137,138).

Οι πρωτεάσες που εμπλέκονται στη νέκρωση φαίνεται να εξαρτώνται από το ασβέστιο(139). Αύξηση της συγκέντρωσης του οδηγεί σε νέκρωση ενώ μείωση του οδηγεί σε ελάττωση της νεκρωτικής βλάβης και της πρωτεόλυσης στα ηπατοκύτταρα, κατά τη διάρκεια της έκθεσης των στο γλυκοχηνοδεοξυχολικό οξύ(69).

Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής βλάβης παρατηρήθηκε αύξηση της φωσφολιπάσης A_2 και D (140). Παρόλα αυτά μόνο η φωσφολιπάση A_2 φαίνεται να εμπλέκεται στην κυτταρική νέκρωση. Φαίνεται ότι υπάρχει φωσφολιπάση A_2 που εξαρτάται από το ασβέστιο και φωσφολιπάση A_2 που δεν εξαρτάται από το ασβέστιο. Η χορήγηση φαρμακευτικών παραγόντων ή η κυτταρική οξειδωση που αναστέλλουν τη φωσφολιπάση A_2 μάλλον προστατεύουν από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο (36,55,67,141). Οι μελέτες αυτές όμως αφήνουν κάποιες αμφιβολίες για την ορθότητα τους. Άλλες μελέτες δείχνουν ότι η αυξημένη δραστηριότητα των φωσφολιπασών μπορεί να φέρει αντίθετο αποτέλεσμα δηλαδή να προστατέψει από την κυτταρική νέκρωση. Είναι λοιπόν φανερό, ότι η ρύθμιση των φωσφολιπασών κατά την κυτταρική βλάβη είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο και δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητό, γιαυτό και χρειάζονται περαιτέρω μελέτες.

Δράση μεταλλοπρωτεασών

Οι μεταλλοπρωτεάσες (MMPs) είναι μια οικογένεια ενζύμων, της οποίας η κύρια λειτουργία είναι η αποικοδόμηση της εξωκυτταρίου θεμελίου ουσίας. Η οικογένεια αυτή αποτελείται τουλάχιστον από 14 διαφορετικές ανθρώπινες μεταλλοπρωτεάσες, οι οποίες έχουν απομονωθεί, και χαρακτηριστεί από την αμινοξική τους αλληλουχία. Τα ένζυμα αυτά υπάρχουν και σε υγιή άτομα και έχουν ένα σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες όπως η επούλωση των τραυμάτων (230,231), η εγκυμοσύνη και ο τοκετός (232), η οστική επαναρρόφηση και η υποστροφή του μαστού (233). Το κύριο ενδιαφέρον για τις MMPs σχετίζεται με το ρόλο τους σε διάφορες νοσολογικές οντότητες στις οποίες η διάσπαση της εξωκυτταρίου θεμελίου ουσίας αποτελεί κεντρικό χαρακτηριστικό. Τέτοιες νόσοι είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα (234) περιοδοντικές νόσοι (235) και ο καρκίνος. Φυσικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών υπάρχουν, και συνθετικοί αναστολείς έχουν ανακαλυφθεί οι οποίοι παρέχουν την ελπίδα νέων θεραπευτικών δυνατοτήτων στις νόσους αυτές. Τα κύρια χαρακτηριστικά των MMPs είναι τα ακόλουθα:

- 1) είναι πρωτεάσες που διασπών τουλάχιστον ένα συστατικό της εξωκυτταρίου θεμελίου ουσίας
- 2) περιέχουν ένα ιόν ψευδαργύρου και αναστέλλονται από επολυωτικούς παράγοντες
- 3) εκκρίνονται σε αδρανή μορφή, απαιτώντας ενεργοποίηση για την πρωτεολυτική τους δραστηριότητα

4) αναστέλλονται από ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών (TIMP_ς) και

5) έχουν κοινή αμινοξική αλληλουχία (236).

Οι κυριότερες οικογένειες μεταλλοπρωτεασών είναι οι κολλαγενάσες, οι στρομελυσίνες, οι γελατινάσες, οι ελαστάσες και οι μεμβρανικού τύπου μεταλλοπρωτεάσες (MT-MMPs) (237).

Οι MMP_ς μπορούν να εντοπιστούν με τεχνικές από τις οποίες η κάθε μια έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και είναι οι εξής: ανοσοιστοχημεία, ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), απομόνωση και ανάλυση mRNA, ζυμογραφία σε γελατίνη (gelatin zymography), μέθοδοι χρησιμοποιούσες ραδιοσημασμένο υπόστρωμα κολλαγόνου (radiolabelled collagen substrate degradation assays) και western ανοσοκαθίζηση (blotting). Η ζυμογραφία σε γελατίνη (gelatin zymography) έχει το πλεονέκτημα της μέτρησης της ενζυματικής δραστηριότητας ποσοτικά (238) και της διάκρισης του ενεργού από το ανενεργό ένζυμο (239,240). Εντούτοις, μόνο οι μεταλλοπρωτεάσες 2 και 9 μπορούν να μετρηθούν εύκολα με αυτές τις μεθόδους. Η ανοσοιστοχημεία και η ανάλυση του RNA μπορούν να εντοπίσουν όλες τις MMP_ς και TIMP_ς (Tissue Inhibitors of Metalloproteases), αλλά δεν επιτρέπουν μέτρηση ποσοτική ούτε επιτρέπουν τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας (241-246), γιαυτό για την εξαγωγή ορθών συμπερασμάτων πρέπει να γίνεται ένας συνδυασμός τεχνικών.

Οι ιστοί στους οποίους παράγονται οι MMP_ς όπως έχει δείχθει είτε ανοσοιστοχημικά είτε με *in situ* υβριδισμό, είναι φυσιολογικοί ιστοί ενηλίκων, με την έκφραση της MMP-2 να περιορίζεται σε κύτταρα του στρώματος (247). Η MMP-7 βρέθηκε στα αδενικά επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού και του ενδομητρίου (246) και η MMP-9 στα αιμοποιητικά κύτταρα (248).

Η κανονική έκφραση των γονιδίων των μεταλλοπρωτεϊνών ελέγχει την διατήρηση της κανονική λειτουργίας των ιστών πολύ στενά. Στις κακοήθειες χάνεται αυτός ο στενός έλεγχος. Τα υψηλά επίπεδα του RNA των μεταλλοπρωτεασών στις κακοήθειες αποδίδονται σε διάφορους αυξητικούς παράγοντες (επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, transforming factor β , TNF α , ιντερλευκίνη 1) (247) και πιθανόν σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων (236,249).

Για την ενεργοποίηση της προενζυμικής μορφής των μεταλλοπρωτεασών απαιτούνται κάποιοι παράγοντες οι οποίοι δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένοι για όλες τις μορφές (250-253). Επίσης μπορεί να συμβαίνει αλληλοενεργοποίηση (254,255). Η

ενεργοποίηση των MMPs in vivo , πιθανόν να αποτελέσει ένα κρίσιμο βήμα για την βιολογική συμπεριφορά των, με θεραπευτικούς ορίζοντες.

Οι μεταλλοπρωτεάσες, εμπλέκονται στη διαδικασία μετατροπής ενός καλοήθους όγκου σε κακοήθη, με την προτεόλυση της εξωκυτταρίου ουσίας και την ανακατασκευή των ιστών (256). Πολλές in vitro μελέτες έδειξαν ότι μια υπερέκφραση των μεταλλοπρωτεασών σχετίζεται με πολύ επιθετικούς φαινότυπους στις κυτταρικές σειρές (257,258). Σε ζώα αποδείχτηκε κάποια σχέση ανάμεσα στην γελατινάση και τις μεταστάσεις (259). Γενικότερα, η σχέση των μεταλλοπρωτεασών με τον καρκίνο και την διθητικότητα απεδείχθη στον καρκίνο του στομάχου, του παχέως εντέρου και του παγκρέατος(260,261,262,263,264,265).

Συμπερασματικά , υπάρχουν αυξημένες ενδείξεις ότι οι μεταλλοπρωτεάσες παίζουν ένα ρόλο κλειδί στην επιθετικότητα των όγκων και τις μεταστάσεις, με πιο κρίσιμο βήμα την ενεργοποίηση του ενζύμου. Η ανακάλυψη από του στόματος συνθετικών αναστολέων των μεταλλοπρωτεασών θα μπορούσε να οδηγήσει σε μια χρήσιμη μορφή θεραπείας για τον έλεγχο των κακοήθων νόσων στο μέλλον.

Μηχανισμοί νέκρωσης κυττάρων ήπατος σε κλινικές νόσους ήπατος

Ανοξία και υποξική βλάβη ήπατος, προκαλούνται από πλήρη και σχετική έλλειψη οξυγόνου αντίστοιχα. Ανοξική ηπατική βλάβη προκύπτει κατά τη διάρκεια της θρόμβωσης της ηπατικής αρτηρίας, που προκαλείται μετά από μεταμόσχευση ήπατος, την φύλαξη του ήπατος για μεταμόσχευση και τη διακοπή της πυλαίας ροής . Υποξική ηπατική βλάβη προκύπτει κατά τη διάρκεια καταστάσεων χαμηλής ροής όπως σε μαζική κεντρολοβιακή νέκρωση, σε καταστάσεις υπότασης και ποικίλα σύνδρομα shock. Η ιστική υποξία προτείνεται επίσης σαν ένας παράγων που συμβάλλει σε μια ποικιλία άλλων ηπατικών κλινικών καταστάσεων, όπως η αλκοολική νόσος του ήπατος (142-145).

Η βλάβη από επανοξυγόνωση ή επανέκχυση απεικονίζει την κατάσταση που συμβαίνει στο ήπαρ μετά από εισαγωγή ζεστού, οξυγονωμένου αίματος στο ήπαρ μετά από μια περίοδο ανοξίας ή υποξίας (146). Η βλάβη από επανοξυγόνωση μπορεί να προκύψει μετά από ένα ισχαιμικό επεισόδιο, μετά από μεταμόσχευση ήπατος ή μετά από μη καλή απολίνωση των πυλαίων αγγείων (147,148). Εκτός από τις ανωτέρω συνήθεις καταστάσεις, το κάθε κύτταρο ήπατος (ηπατοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα κολποειδών, κύτταρα Kupffer επιθηλιακά κύτταρα χοληφόρων

τριχοειδών) παρουσιάζει ιδιαίτερο τύπο βλάβης μετά από ισχαιμία ή επανοξυγόνωση (149). Η διαφορετική ευαισθησία στην ανοξική βλάβη ή βλάβη μετά από επανοξυγόνωση, εξαρτάται επίσης από την θερμοκρασία (150).

Οι πρωιμότερες βλάβες από ανοξία, παρατηρούνται στα μιτοχόνδρια. Η απουσία του οξυγόνου οδηγεί σε διαταραχή της αερόβιας κατάστασης (41). Προκύπτει στη συνέχεια μείωση των νουκλεοτιδίων πυριδίνης, οδηγώντας σε αύξηση της ενδοκυττάριας αναλογίας NADH/NAD^+ (10,151). Η άρση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης οδηγεί γρήγορα σε μείωση του ATP. Στα ηπατοκύτταρα όπου μπορούν να χρησιμοποιήσουν αποθέματα γλυκογόνου για να προμηθεύσουν υπόστρωμα για αναερόβια γλυκόλυση, η κατάσταση θρέψης είναι ένας σημαντικός καθοριστικός παράγοντας της ανοξικής βλάβης. Τα ηπατοκύτταρα σε μεταγευματική κατάσταση, όπου υπάρχουν μεγάλα αποθέματα γλυκογόνου, είναι περισσότερο ανθεκτικά στην ανοξική βλάβη παρά τα ηπατοκύτταρα σε φάση νηστείας με μικρά αποθέματα γλυκογόνου (123). Η αναστολή της συνθετάσης – ATP, η οποία χρησιμοποιεί το $\Delta\mu\text{H}^+$ για να παράξει ATP, είναι ένα πρώιμο γεγονός κατά την ανοξία, και επιτρέπει μερική διατήρηση της μιτοχονδριακής διαβάθμισης πρωτονίων σε βάρος της ελάττωσης του ATP (152-154). Η αναστολή της συνθετάσης-ATP είναι πιθανόν προσαρμοστική απάντηση στην ανοξία για να διατηρήσει την μιτοχονδριακή ακεραιότητα και βοηθά στο να εξηγηθεί η σχετική διατήρηση της $\Delta\psi$ και $\Delta\mu\text{H}^+$ παρά την απουσία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Εάν η ανοξική προσβολή συμβαίνει σε αρχική κατάσταση, όταν διατηρείται η $\Delta\psi$, η μιτοχονδριακή βλάβη διορθώνεται και εμποδίζεται ο κυτταρικός θάνατος (154). Αν συνεχιστεί η ανοξία μπορεί να επέλθει ανεπανόρθωτη απώλεια $\Delta\psi$ (10,152). Η ανεπανόρθωτη απώλεια της μιτοχονδριακής λειτουργίας φαίνεται να είναι ο παράγοντας κλειδί στην ανοξία.

Στους 37°C τα ηπατοκύτταρα είναι περισσότερο ευπαθή στην ανοξία παρά τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών, τα κύτταρα Kupffer και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων. Όλες οι κατηγορίες κυττάρων χάνουν το 90% του ATP μετά από ανοξία 30 λεπτών (149). Οι διαφορές στον ρυθμό δράσης της ενδοκυττάριας πρωτεάσης, μπορούν να εξηγήσουν την ευπάθεια των υποτύπων των κυττάρων του ήπατος στην ανοξική νέκρωση.

Τα ηπατοκύτταρα στις ζώνες I-III είναι ευαίσθητα στην ανοξία που προκύπτει από έκχυση N_2 σε απομονωμένα μοντέλα ήπατος (155). Στην υποξία, η σχετική έλλειψη O_2 προκαλεί εξασθένιση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και μείωση του ATP

(26,27,41). Το στρες της υποξίας οδηγεί τελικά σε νέκρωση και με την παραγωγή ελεύθερων ριζών O_2 . Άρα στην υποξία παρατηρείται και μείωση ATP και οξειδωτικό στρες.

Η ανοξική ηπατική βλάβη μπορεί να ανακοπεί με παρέμβαση στους μηχανισμούς που προκαλούν την ανοξική κυτταρική νέκρωση. Η μείωση του ATP μπορεί να βελτιωθεί με τη χορήγηση γλυκολυτικών υποστρωμάτων (π.χ φρουκτόζη) (40,64,123). Αναστολή της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης φαίνεται ότι προστατεύει τα ηπατικά κύτταρα από την ανοξία (124,125). Αναμένεται με ενδιαφέρον η *in vivo* χορήγηση L-καρνιτίνης και άλλων αναστολέων της μιτοχονδριακής μεμβράνης σε μοντέλλα ανοξικής βλάβης σε ζώα. Η γλυκίνη και η αλανίνη θα μπορούσαν να εμποδίσουν επίσης τη βλάβη (139-156). Η κυτταρική οξείδωση επίσης προστατευτική για το κύτταρο κατά τη διάρκεια ανοξίας, μέσω της αναστολής της επιβλαβούς δραστηριότητας των υδρολασών (12,26,57,64). Θεραπείες που βασίζονται στην ενεργοποίηση της κυτταρικής οξείδωσης όπως είναι ο εκλεκτικός αναστολέας του μεταφορέα Na/H , οι πρωτεάσες που εξαρτώνται από ασβέστιο, και φωσφολιπάσες, μπορούν επίσης να διατηρήσουν τη ζωτικότητα του κυττάρου (32,67,157,139,158).

Βλάβη από επανοξυγόνωση Ως βλάβη από επανοξυγόνωση, ορίζεται η κυτταρική βλάβη που προκαλείται από επανοχορήγηση φυσιολογικών συγκεντρώσεων οξυγόνου σε βιώσιμα κύτταρα τα οποία εκτέθηκαν σε επιβλαβή αλλά όχι θανατηφόρα ανοξική κατάσταση. Σ αυτή την περίπτωση η ζημιά από επανοξυγόνωση, προκαλεί και βλάβες τύπου οξειδωτικού στρες και βλάβες τύπου ανοξίας. Με τη μεταμόσχευση ήπατος η βλάβη από επανοξυγόνωση έχει γίνει μείζον θέμα στην παθοφυσιολογία του ήπατος (147,148,159).

Τα μιτοχόνδρια είναι το κύριο μέρος στο οποίο παράγεται τοξικό οξυγόνο στα ηπατικά κύτταρα (41,160).

Εξωκυτταρίως, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παράγονται από γειτονικά των κυττάρων του ήπατος κύτταρα συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων φλεγμονής στο επηρεασμένο ήπαρ. Το ακολουθούμενο οξειδωτικό στρες από τις ρίζες οξυγόνου που σχηματίζονται, οδηγεί το κύτταρο σε νέκρωση. Επίσης, επιπρόσθετα με το οξειδωτικό στρες, το παράδοξο του pH που σχετίζεται με επανέκχυση μπορεί να οδηγήσει σε ιστική βλάβη.

Τα ηπατοκύτταρα είναι σχετικά ευαίσθητα στην βλάβη από επανοξυγόνωση, πιθανόν εξαιτίας ανεπάρκειας των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών (41,149). Παρόλα αυτά μπορούν να πάθουν βλάβη από επανοξυγόνωση μόνο εάν είχαν ισχαιμική ή ανοξική βλάβη πριν την επανοξυγόνωση (41,161).

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι πιο ευαίσθητα από τα ηπατοκύτταρα στην επανοξυγόνωση (162).

Η βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων φαίνεται να είναι η αχίλλειος πτέρνα που εμποδίζει την επί μακρόν διατήρηση του μοσχεύματος για ηπατική μεταμόσχευση. Ο λόγος είναι ότι αυτά τα κύτταρα παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (163,164). Οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί των ενδοθηλιακών κυττάρων σε σχέση με την ικανότητα τους να παράγουν ρίζες οξυγόνου ίσως ανεπαρκούν κατά τη βλάβη από ανοξία/επανοξυγόνωση. Προστασία από τη βλάβη του ήπατος από επανοξυγόνωση και ειδικά των ενδοθηλιακών κυττάρων από αντιοξειδωτές έχει επιβεβαιωθεί. Π.χ SOD, 2,2,6,6-τετραμεθυλπεριδίνη-N-οξυ 1, και βιταμίνη E και τα ανάλογα τους φαίνεται ότι παράγονται (162,165,166). Ιδιαίτερα σημαντική είναι η προστασία των ενδοθηλιακών κυττάρων γιατί η βλάβη των, προκαλεί προσωρινή δυσλειτουργία στη μικροκυκλοφορία που οδηγεί σε μείωση της αιματικής ροής και τελικά σε ισχαιμική ιστική νέκρωση, το «φαινόμενο μη επαναροής» (165). Η στρατηγική για να ανακόψουμε τη βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι να ενισχύσουμε την ηπατική αιματική ροή και να εμποδίσουμε την περαιτέρω ισχαιμική βλάβη.

Κατά τη βλάβη του ήπατος από ανοξία/επανοξυγόνωση συμβαίνει αυξημένη έκφραση μορίων προσκολλητικότητας και παραγωγή παραγόντων ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (162,165-170). Αυτό οδηγεί σε προσκόλληση των ουδετερόφιλων με απελευθέρωση H₂O₂, πρωτεασών και σχηματισμό θρόμβων από ουδετερόφιλα και αιμοπετάλια. Τα κύτταρα Kupffer παράγουν O₂⁻ κυτταροκίνες και πρωτεάσες που βλάπτουν ακόμα περισσότερο τα γειτονικά κύτταρα (171-173). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν ακόμα NO (92,174). Στο αγγειακό υπόστρωμα εκτός ήπατος το NO οδηγεί σε αγγειοδιαστολή και εμποδίζει την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα κατεστραμμένα αγγεία. Η αύξηση της προσκόλλησης των CD11/CD18 ουδετεροφίλων στο ενδοθήλιο αυξάνεται με την αναστολή της NO-συνθετάσης σε μερικά πειραματικά μοντέλα (91).

Στην παρουσία O₂⁻, το NO μπορεί να παράξει ελεύθερες ρίζες από την οδό του περοξυνιτρικού (93). Η δραστηριότητα αυτής της διαδικασίας ενεργοποιεί

περισσότερο τα κύτταρα Kupffer και τα ουδετερόφιλα επιτείνοντας την βλαπτική διαδικασία (175,176). Η φλεγμονώδης αυτή διαδικασία επηρεάζει την μικροκυκλοφορία με ένα φαινόμενο μη-επαναροής προκαλώντας ιστική ισχαιμία και ηπατική βλάβη. Ο καταρράκτης των φλεγμονωδών κυτταροκινών που παρουσιάζεται σ' αυτή τη θέση, συντείνει στην έκπτωση της λειτουργίας πολλαπλών οργάνων.

Αν και η στένωση των χοληφόρων είναι αναγνωρισμένη επιπλοκή της ανοξίας και της επανοξυγόνωσης (146), ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες αναφορικά με την ανοξία και τη βλάβη από επανοξυγόνωση των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων. Σε σύγκριση με τα ηπατοκύτταρα τα κύτταρα των χοληφόρων είναι περισσότερο ανθεκτικά στη βλάβη από ανοξία και πιο ευαίσθητα στη βλάβη από επανοξυγόνωση (149). Η ευαισθησία στην επανοξυγόνωση εκφράζεται με σχηματισμό ελευθέρων ριζών και μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης GSH στα ηπατοκύτταρα. Πρόσφατα, χορηγήθηκε αντιοξειδωτικό διάλυμα αμέσως πριν από επανέκχυση για να προστατεύσει από τη βλάβη από επανοξυγόνωση κατά τη μεταμόσχευση ήπατος (177).

Αλκοολική ηπατοπάθεια

Η αιθανόλη είναι η πιο γνωστή τοξίνη κατά του ήπατος. Παρόλο που η παρατεταμένη χρήση αλκοόλ μπορεί να επηρεάσει και άλλα όργανα το ήπαρ είναι ο κύριος στόχος τοξικής επίδρασης της αιθανόλης. Ο μηχανισμός της ηπατικής κυτταροτοξικότητας παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος και αμφισβητούμενος. Ο κύριος λόγος για την αμφισβήτηση αυτή είναι η έλλειψη κατάλληλου μοντέλου πειραματόζωου για την πρόκληση ηπατικής τοξικότητας και κυρίως για την πρόκληση κίρρωσης.

Η αιθανόλη μεταβολίζεται σε ακεταλδεύδη δια τριών κυρίων οδών. Η αλκοολική δευδρογενάση είναι πρωταρχικής σημασίας κατά τη βραχυχρόνια λήψη αιθανόλης. Κατά τη μακροχρόνια λήψη αλκοόλης το μικροσωμιακό σύστημα οξειδωσης της αιθανόλης P450-ΠΕΙ ,παίζει ένα μεγαλύτερο ρόλο. Στον άνθρωπο, ο ρόλος των περοξεισωματίων στο μεταβολισμό του αλκοόλ είναι λιγότερο σημαντικός. Ο μεταβολισμός της αιθανόλης σε ακεταλδεύδη οδηγεί στην παραγωγή NADH από NAD⁺. Η αιθανόλη επίσης μειώνει το NAD ανεξάρτητα από την παραγωγή NADH δια μέσου αύξησης της δραστηριότητας της πολυμεράσης (διφωσφορική αδενοσίνη-ριβόζη) (178). Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση του λόγου NADH/ NAD στο ηπατοκύτταρο. Η εντόπιση του P450 –ΠΕΙ στη ζώνη III μαζί με τη μείωση της παροχής οξυγόνου σ'αυτή την περιοχή του ηπατικού λοβίου οδηγεί σε ακόμα μεγαλύτερη αύξηση του λόγου NADH/ NAD (143,179). Πρόσφατες μελέτες σε ζώα πρότειναν ότι η ζώνη III λαμβάνει λιγότερο οξυγόνο(144). Αυτό οδηγεί σε υποξία της ζώνης III. Ο αυξημένος λόγος NADH/ NAD συσχετίζεται με τη μακροχρόνια έκθεση σε αιθανόλη που οδηγεί σε οξειδωτικό στρες και την λιπιδική υπεροξείδωση (180). Όλοι οι μηχανισμοί που δρουν κατά το οξειδωτικό στρες και που περιγράφηκαν προηγουμένως ισχύουν εδώ (96,100,103,145).

Επιπλέον η ακεταλδεύδη μπορεί να αλληλεπιδράσει με φωσφολιπίδια οδηγώντας σε υπεροξείδωση των λιπιδίων και ο μεταβολισμός της ακεταλδεύδης από οξείδωση της αλδεύδης μπορεί να παράξει επίσης O₂⁻ (145,180,181,182). Επιπλέον οξειδωτική βλάβη μπορεί να προκαλέσουν τα ιστικά ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα , απελευθερώνοντας O₂⁻ (17).

Η μακροχρόνια έκθεση σε αιθανόλη μειώνει την ηπατοκυτταρική αντιοξειδωτική άμυνα. Οι συνηθέστερες αλλαγές που παρατηρούνται είναι η μείωση του GSH και της βιταμίνης E (183,184,182,185). Η διαιτητική ανεπάρκεια μπορεί να επιδεινώσει

την παρατηρούμενη ανεπάρκεια και σαν τέτοια μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην ισορροπία ανάμεσα στο οξειδωτικό στρες και την αντιοξειδωτική άμυνα κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας πρόσληψης αιθανόλης.

Η μιτοχονδριακή ανωμαλία είναι από τις πρώιμες αλλαγές που παρατηρούνται στη βλάβη από αιθανόλη και η απελευθέρωση μιτοχονδριακών ενζύμων φαίνεται να είναι ένας ευαίσθητος δείκτης στη λήψη αιθανόλης, αντιπροσωπευτικός πιθανόν πρώιμης μιτοχονδριακής βλάβης (**186,187,188**). Εκλεκτική αποθήκευση μιτοχονδριακών αντιοξειδωτών ή μείωση μιτοχονδριακών προοξειδωτών μπορούν να αποτελέσουν μέτρα που εμποδίζουν την ηπατοκυτταρική βλάβη κατά την κατάχρηση αιθανόλης. Είναι ενδιαφέρον να σκεφτεί κανείς ότι η χρήση εξωγενών αντιοξειδωτών μπορεί να φανεί χρήσιμη στη θεραπεία της αλκοολικής ηπατίτιδας.

Νόσοι από συσσώρευση μετάλλων

Ο σίδηρος και ο χαλκός μπορούν να παίξουν ένα ρόλο κλειδί στη φυσιολογική και παθολογική ηπατοκυτταρική λειτουργία (**189,190**). Η αιμοχρωμάτωση και η νόσος του Wilson οδηγούν σε σημαντική ηπατοκυτταρική βλάβη και σημαντική κλινική ηπατική νόσο (**191,192**).

Τόσο η νόσος του Wilson όσο και η αιμοχρωμάτωση είναι αποτέλεσμα οξειδωτικού στρες που προάγεται από αντιδράσεις που καταλύονται από το σίδηρο και το χαλκό (**104,193**). Πράγματι η οι εναποθηκευτικές νόσοι των μετάλλων είναι οι πρωτότυπες ανθρώπινες νόσοι που προκαλούνται από οξειδωτικό στρες με υπεροξείδωση των λιπιδίων (**96**).

Οι ασύζευκτες μορφές αυτών των μετάλλων είναι υπεύθυνες για τη νέκρωση που προκαλείται στα ηπατοκύτταρα από ελεύθερες ρίζες. Συζευγμένες μορφές όπως φερριτίνη ή αιμοσιδηρίνη δεν ευθύνονται για αυτή τη διαδικασία (**96,104**).

Η απελευθέρωση σιδήρου από τη φερριτίνη προκαλείται από τη μείωση παραγόντων όπως του ασκορβικού οξέως, GSH και υπεροξειδικών ανιόντων (**96,104,193,194**). Καταστάσεις οξέωσης, αύξηση του λόγου NADH/NADPH και αυξημένη δραστηριότητα οξειδάσης της ξανθίνης οδηγούν σε μεγαλύτερη απελευθέρωση σιδήρου από τη φερριτίνη και την αιμοσιδηρίνη (**104,180,195**). Ο ελεύθερος σίδηρος και ο χαλκός είναι ικανά να συμμετέχουν σε αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών, που οδηγούν στην υπεροξείδωση των λιπιδίων (**98**).

Σε ζωικά μοντέλα με υπερφόρτωση σιδήρου και χαλκού έχει μελετηθεί η κυτταρική διαμερισματοποίηση (196,192,194-204). Στην υπερφόρτωση σιδήρου, η λιπιδική υπεροξειδωση συμβαίνει στα μιτοχόνδρια, στα μικροσώματα και στα λυσοσώματα των πειραματοζώων και συσχετίζεται με την δυσλειτουργία των οργανυλίων (191,199,200,205).

Τα μιτοχόνδρια μπορεί να είναι η πηγή των ίδιων τους των δηλητηρίων: παραγωγή ριζών οι οποίες περαιτέρω οδηγούν σε υπεροξειδωση των μιτοχονδριακών λιπιδίων. Η σημαντικότητα της λιπιδικής υπεροξειδωσης και του οξειδωτικού στρες σαν αιτία μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας περιγράφηκε από τις προστατευτικές δράσεις της ατοκοφερόλης και στα δύο μοντέλα βλάβης από μέταλλα (115,204).

Έτσι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ίσως είναι ένα συστατικό της αιμοχρωμάτωσης και της νόσου του Wilson στις οποίες η κυτταρική νέκρωση είναι μια χαρακτηριστική εκδήλωση της νόσου.

Χολοστατική ηπατική νόσος

Η διαταραχή της ροής της χολής και των χολικών αλάτων είναι κοινό χαρακτηριστικό όλων των μορφών ενδοηπατικής και εξωηπατικής χολόστασης (π.χ από αλκοόλ, PBC, πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα, στένωση χοληφόρων). Η μείωση εκκρίσεως των χολικών αλάτων οδηγεί σε συγκέντρωση των χολικών αλάτων εντός των ηπατοκυττάρων (206). Η συγκράτηση των τοξικών υδροφοβών χολικών αλάτων θεωρείται η αιτία για την ηπατοκυτταρική βλάβη στη χολοστατική ηπατική νόσο (207). Πράγματι, η αντικατάσταση των τοξικών υδροφοβικών χολικών οξέων στη χοληφόρο δεξαμενή από το υδρόφιλο χολικό οξύ ουρσοδεοξυχολικό οξύ βελτιώνει την χολοστατική ηπατική βλάβη (208). Εξαιτίας της απορρυπαντικής δράσης των στεροειδών τμημάτων των χολικών αλάτων, η ηπατοκυτταρική βλάβη πιστεύεται ότι προκύπτει λόγω άμεσης μεμβρανικής βλάβης και ο βαθμός της ηπατοκυτταρικής βλάβης εξαρτάται άμεσα από την υδροφοβικότητα (209). Παρόλα αυτά οι συγκεντρώσεις των χολικών αλάτων που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της τοξικής τους δράσης επί των μεμβρανών είναι κοντά στις κρίσιμες συγκεντρώσεις των μικκυλίων και οι συγκεντρώσεις των χολικών αλάτων στον ορό κατά τη χολόσταση δεν πλησιάζουν την κρίσιμη συγκέντρωση των μικκυλίων οδηγώντας τις πρόσφατες έρευνες σε μη απορρυπαντικούς μηχανισμούς τοξικότητας των χολικών αλάτων.

Πρόσφατες έρευνες προτείνουν ότι τα τοξικά χολικά άλατα είναι μιτοχονδριακές τοξίνες και ότι η τοξικότητα τους οδηγεί σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (69,210).

Πρώτον, τα μεγάλα διογκωμένα μιτοχόνδρια παρατηρούνται στα ηπατοκύτταρα με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που ακολουθεί την απολίπωση των χοληφόρων οδών στα ποντίκια (211,212).

Δεύτερον, τα μιτοχόνδρια που απομονώνονται από τα απολιπωμένα ποντίκια και μειώνουν τον αναπνευστικό ρυθμό σαν αποτέλεσμα του εξασθένησης του σταδίου III της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που παρατηρείται στα μιτοχόνδρια ζώων με απολιπωμένα χοληφόρα, μπορούν να αναπαραχθούν με την έκθεση απομονωμένων μιτοχονδρίων ή διαπερατών ηπατοκυττάρων σε τοξικά χολικά άλατα (210).

Τρίτον, η μείωση του ATP παίζει ένα σημαντικό μηχανιστικό ρόλο στη νέκρωση που προκαλείται από τα χολικά άλατα. Η μείωση του ATP προκαλείται από τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία διότι οι οδοί για την γλυκολυτική παραγωγή ATP είναι άθικτοι και μπορούν να γεμίσουν με υπόστρωμα (π.χ φρουκτόζη); η γλυκολυτική παραγωγή ATP εμποδίζει την κυτταρική νέκρωση από το γλυκοχηνοδεοξυχολικό (69). Τελικά, τα τοξικά χολικά άλατα αυξάνουν τον σχηματισμό υδροπεροξειδίου σε απομονωμένα ηπατοκύτταρα (213). Η αυξημένη παραγωγή υδροπεροξειδίου οδηγεί σε αναστολή της ροής ηλεκτρονίων διαμέσου της αναπνευστικής αλυσίδας, αυξάνοντας έτσι το ρυθμό διαφυγής των ηλεκτρονίων προς σχηματισμό ριζών οξυγόνου.

Η μείωση του ATP κατά την ηπατική βλάβη λόγω χολικών αλάτων οδηγεί σε επίσης αύξηση του ασβεστίου και της πρωτεόλυσης που εξαρτάται από το ασβέστιο (69). Η αύξηση του ασβεστίου προκαλείται από την είσοδο του εξωκυτταρίου ασβεστίου μέσα στο κύτταρο η οποία προκαλείται από τα υδρόφοβα χολικά άλατα (214).

Ανοσοφλεγμονώδης ηπατική βλάβη

Η κυτταρική φλεγμονώδης διήθηση μπορεί να προκαλέσει ηπατική βλάβη ως πρωτοπαθές γεγονός (πχ αυτοάνοσος ηπατίτις) είτε ως δευτεροπαθής απάντηση σε μια άλλη διαδικασία (π.χ ιογενής ηπατίτις).

α) Τα ουδετερόφιλα είναι κοινά κύτταρα φλεγμονής σε πολλές ηπατικές νόσους (π.χ αλκοολική ηπατίτιδα, βλάβη από ανοξία/επανοξυγόνωση). Μείωση των ουδετερόφιλων με τη χρησιμοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων έχει συσχετιστεί με μικρότερου βαθμού νέκρωση σε βλάβη από ανοξία /επανοξυγόνωση, υποστηρίζοντας ένα ρόλο κλειδί των ουδετερόφιλων σ' αυτή τη μορφή βλάβης (215,216). Τα ουδετερόφιλα επιστρατεύονται σε περιοχές βλάβης από τις κυτταροκίνες, τις λευκοτριένες, τα προϊόντα του οξειδωτικού στρες και έκφρασης

των μορίων προσκόλλησης σε τοπικά βεβλαμμένο ενδοθηλίο. **(167,169,170,216)**. Η έκφραση των προσκολλητικών μορίων P και E seleκτίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα σηματοδοτεί την έναρξη του κύκλου δράσης των ουδετεροφίλων**(217)**. Ο κύκλος αυξάνει την επαφή μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και των ουδετεροφίλων, προωθώντας την προσκόλληση των ουδετεροφίλων δια των ουδετεροφιλικών πρωτεϊνών CD11/CD18 , και των ενδοκυτταρίων μορίων προσκόλλησης (ICAM 1 and 2) στο ενδοθήλιο **(169)**. Η προσκόλληση ενεργοποιεί την απελευθέρωση πρωτεασών όπως οι ελαστάσες, H₂O₂, και υδροχλωρικού οξέως (παράγεται με την δραστηριότητα της μυελοπεροξειδάσης)**(17,18)**. Αν και η σημαντικότητα του οξειδωτικού στρες και της βλάβης από τις πρωτεάσες έχει συζητηθεί μια τρέχουσα υπόθεση προτείνει τις δράσεις των οξειδωτών σαν επιτρεπτικό παράγοντα για την βλάβη από τις πρωτεάσες **(17)**. Το υποχλωριώδες οξύ και άλλοι οξειδωτές που παράγονται από από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα μπορούν να απενεργοποιήσουν τις ιστικές αντιπρωτεάσες και τις αντιπρωτεάσες του ορού. Οι πρωτεάσες των ουδετεροφίλων που απελευθερώνονται από την παρουσία των αναστολέων μπορούν στη συνέχεια να βλάψουν τις κυτταρικές μεμβράνες οδηγώντας στη λύση του κυττάρου. Οι αποτελεσματικοί αντιοξειδωτές και η δραστηριότητα των αντιπρωτεασών αναστέλλουν αυτή τη διαδικασία, αλλά η συνεισφορά της κάθε διαδικασίας στην ηπατοκυτταρική βλάβη σε καταστάσεις νόσων παραμένει αδιευκρίνιστη **(17,218,219)**.

β) Τα κύτταρα Kupffer που είναι τα μόνιμα μακροφάγα του ήπατος εμπλέκονται και αυτά στη ηπατική νέκρωση κατά την φαρμακευτική βλάβη του ήπατος, την αλκοολική νόσο του ήπατος, την βλάβη από ανοξία/επανοξυγόνωση, την ενδοτοξιναιμία και τις ιογενείς ηπατίτιδες **(151,172,173,220,221)**. Διάφορες μελέτες προτείνουν κάποιο ρόλο των κυττάρων του Kupffer στην βλάβη των ηπατοκυττάρων λόγω της βελτίωσης που παρατηρείται στη βλάβη όταν ανασταλεί η λειτουργία των κυττάρων Kupffer και την επιδείνωση της βλάβης με την ενεργοποίηση των **(163,172,173,221)**. Τα ενεργοποιημένα κύτταρα Kupffer παράγουν κυτταροκίνες μερικές από τις οποίες στρατολογούν και άλλα κύτταρα φλεγμονής. Άλλες κυτταροκίνες μπορούν να είναι άμεσα κυτταροτοξικές **(19,93,173,220)**. Ο παράγων νέκρωσης των όγκων TNF α, ενεργοποιεί την παραγωγή ριζών οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια και είναι επίσης κυτταροτοξικός σε μερικές κυτταρικές σειρές **(222)**. Επιπρόσθετα τα κύτταρα Kupffer μπορούν να παράξουν ρίζες NO σαν απάντηση

στις κυτταροκίνες (**93,223**). Οι ρίζες NO δυνατόν να είναι κυτταροτοξικές με μηχανισμό που εμπλέκει το περοξεινιτρικό ιόν ONOO⁻. Η αναστολή της παραγωγής NO μπορεί επίσης να συμβάλει στην ηπατική βλάβη (**224**). Άρα μπορούν να παρατηρηθούν και φλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις δράσεις του NO, κάνοντας περίπλοκο το ρόλο του NO στην ηπατική βλάβη. Τα κύτταρα Kupffer απελευθερώνουν επίσης πρωτεάσες, παράγοντες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, τοξικές ρίζες οξυγόνου και φωσφολιπάση A2 (**19,217**).

γ) Τα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα ενοχοποιούνται ευρέως στις ηπατικές νόσους (**225,226**). Ο μηχανισμός που τα λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς προκαλούν την ηπατική τους βλάβη είναι αντικείμενο διχογνωμιών (**16,19,227-229**). Τα T-κύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα κυττάρων στόχων στα πλαίσια του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (**6,19**). Μια αλληλεπίδραση ανάμεσα στους υποδοχείς των T-κυττάρων και των αντιγόνων του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας ενεργοποιεί την δράση των T-κυττάρων. Η απελευθέρωση κυτταροτοξικών κοκκίων είναι υπεύθυνη για την κυτταρόλυση στα κύτταρα στόχους. Τα κοκκία περιέχουν τις περφορίνες και υδρολυτικά ένζυμα γνωστά σαν granzymes (serine proteases, esterases, etc) (**229**). Τα μονομερή της περφορίνης πολυμερίζονται με την παρουσία ασβεστίου και σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα το οποίο εισέρχεται μέσα στη μεμβράνη του κυττάρου στόχου, οδηγώντας στην απώλεια της κυτταρικής συνέχειας (**227**). Η είσοδος ασβεστίου και των granzymes μέσα στα κύτταρα στόχους οδηγούν στην κυτταρική νέκρωση (**6,229**).

Πρόσφατα έχει προταθεί ένας δεύτερος μηχανισμός κυτταρικής βλάβης (**16**). Υπό διάφορες καταστάσεις η κυτταρική φόνευση από τα λεμφοκύτταρα μπορεί να είναι ανεξάρτητη από το ασβέστιο και η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης του κυττάρου στόχου προηγείται από την δράση των ενδονουκλεασών και την υδρόλυση του DNA (**6,16,19**). Αυτό είναι δύσκολο να συμβιβαστεί με τη βλάβη του κυττάρου που οφείλεται στο μηχανισμό δράσης της περφορίνης όπου η απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης είναι η αρχική βλάβη και είναι εξαρτώμενη από το ασβέστιο. Έχει υποτεθεί ότι η λεμφοκυτταρική αναγνώριση και οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις με κύτταρα στόχους μπορεί να είναι κυτταροτοξική δια μέσου μιας επαγωγής της απόπτωσης δια υποδοχέων-μεσολαβητών (**16**). Ένας υποδοχέας κυττάρου στόχου (πιθανόν ο APO-1/Fas system) ο οποίος αλληλεπιδρά με υποδοχείς λεμφοκυττάρων έχει προταθεί σαν συνδετική θέση του κυττάρου στόχου

(19). Παρόλα αυτά το σήμα που δίνεται για την έναρξη της δραστηριότητας της ενδονουκλεάσης μετά τον υποδοχέα παραμένει άγνωστο. Πάντως δεν είναι εντελώς ξεκαθαρισμένοι οι δύο μηχανισμοί της λεμφοκυτταρικής τοξικότητας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982;17:229-259.
- 2) Popper H, Keppler D. Networks of interacting mechanisms of hepatocellular degeneration and death. *Prog Liver Dis* 1986;8:209-235.
- 3) Fawthrop DJ, Boolbs AR, Davies DS. Mechanisms of cell death. *Arch Toxicol* 1991;65:437-444.
- 4) Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEBJ* 1992;6:2450-2455.
- 5) Kerr JFR, Searle J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J Pathol* 1972;107:41-44.
- 6) Goldstein P, Ojcius DM, Young DE. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 1991;121:29-65.
- 7) Raff MC. Social controls on cell death. *Nature* 1992;356:397-400.
- 8) Vaux DL. Toward an understanding of molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:786-789.
- 9) Trump BF, Berzesky IK. The role of cytosolic Ca²⁺ in cell injury, necrosis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 1992;4:227-232.
- 10) Lemasters JJ, DiGusepp J, Nieminen AL et al. Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 1987;325:78-81.
- 11) Herman B, Nieminen A-L, Gores GJ et al. Irreversible injury in anoxic hepatocytes precipitated by an abrupt increase in plasma membrane permeability. *FASEB J* 1988;2:146-151.
- 12) Gores GJ, Nieminen AL, Wray BE et al. Intracellular pH during "chemical hypoxia" in cultured rat hepatocytes: protection by intracellular acidosis against the onset of cell death. *J Clin Invest* 1989;83:386-396.
- 13) Gores GJ, Hermans B, Lemasters JJ. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. *Hepatology* 1990;11:690-698.
- 14) Baur H, Kasperek S, Pfaff E. Criteria of viability of isolated liver cells. *Hope-Seylers Z Physiol Chem* 1975;356:827-838.

- 15) Frederiks WM, Myagkaya GL, Boch KS et al . The value of enzyme leakage in the prediction of necrosis in liver ischemia. *Histochemistry* 1983;78:459-472.
- 16) Berke G. Lymphocyte-triggered internal target disintegration. *Immunol Today* 1991;12:396-398.
- 17) Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320 (6):365-376.
- 18) Baggiolini M, Boulay F, Badwey JA et al. Activation of neutrophil leucocytes: Chemoattractant receptors and respiratory burst. *FASEB J* 1993;7:1004-1010.
- 19) Doherty PC. Cell-mediated cytotoxicity. *Cell* 1993;75:607-612.
- 20) Gumucio JJ, Chianale J. Liver cell heterogeneity and liver function. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The liver: biology and pathobiology*. 2nd ed. New York:Raven, 1988:931-948.
- 21) Jungermann K, Katz N. Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology* 1982;2:385-395.
- 22) Florine-Casteel K, Lemasters JJ, Herman B. Lipid order in hepatocyte plasma membrane blebs during ATP depletion measured by digitized video fluorescence polarization microscopy. *FASEB J* 1991;5:2078-2084.
- 23) Lemasters JJ, Stemkowski CL, Ji S et al. Cell surface changes and enzyme release during hypoxia and reoxygenation in the isolated, perfused rat liver. *J Cell Biol* 1983;97:778-786.
- 24) Nieminen A-L, Gores GJ, Wray BE et al. Calcium dependence of bleb formation and cell death in hepatocytes. *Cell Calcium* 1988;9:327-246.
- 25) Harman Aw, Nieminen AL, Lemasters JJ et al. Cytosolic free magnesium, ATP, and blebbing during chemical hypoxia in cultured rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:477-483.
- 26) Herman B, Gores GJ, Nieminen AL et al. Calcium and pH in anoxic and toxic injury. *Crit Rev Toxicol* 1990;21:127-148.
- 27) Gores GJ, Nieminen A-l, Fleishman KE et al. Swelling reductive stress, and cell death during chemical hypoxia in hepatocytes. *Am J Physiol* 1988;255:C347-C354.
- 28) Goodman GC, Miranda AF, Deitch AD et al. Action of cytochalasin D on cells of established lines. *J Cell Biol* 1975;64:644-667.

- 29) Prentki M, Chaponnier C, Jeanrenaud B et al. Actin microfilaments, cell shape, and secretory processes in isolated rat hepatocytes. *J Cell Biol* 1979;81:592-607.
- 30) Weeds A. Actin-binding proteins-regulators of cell architecture and motility. *Nature* 1982;296:811-816.
- 31) Schliwa M, Euteneuer U, Bulinski JC et al. Calcium lability of cytoplasmic microtubules and its modulation by microtubule-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:1037-1041.
- 32) Nicotera P, Hartzell P, Davis G et al. The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agents that increase cytosolic Ca^{2+} is mediated by the activation of a non-lysosomal proteolytic system. *FEBS Lett* 1986;209:139-144.
- 33) Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G et al. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *TIBS* 1989;10:281-284.
- 34) Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S. Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992;32:449-470.
- 35) Elliget KA, Phelps PC, Trump BJ. HgCl₂-induced alterations of actin filaments in cultured primary rat proximal tubule epithelial cells labeled with fluorescein phalloidin. *Cell Biol Toxicol* 1991;7:263-280.
- 36) Sakaida I, Thomas AP, Farber JL. Phospholipid metabolism and intracellular Ca^{2+} homeostasis in cultured rat hepatocytes intoxicated with cyanide. *Am J Physiol* 1992;263:C684-C690.
- 37) Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H et al. Effect of anoxia on intracellular ATP, Na, Ca^{2+} , Mg^{2+} and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1992;267:6654-6663.
- 38) Bellomo G, Orrenius S. Altered thiol and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury. *Hepatology* 1985;5:876-882.
- 39) Nicotera P, Moore M, Mirabelli F, et al. Inhibition of hepatocytes plasma membrane Ca^{2+} -ATPase activity by menadione metabolism and its restoration by thiols. *FEBS Lett* 1985;181:149-153.
- 40) Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H et al. Fructose protects rat hepatocytes from anoxic injury. *J Biol Chem* 1992;267:7545-52.
- 41) Gonzalez-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 1993;91:456-464.

- 42) Hyashi H, Chaudry IH, Clemens MG et al. Reoxygenation injury in isolated hepatocytes: effect of extracellular ATP on cation homeostasis. *Am J Physiol* 1986;250:R573-R579.
- 43) Pietsch M, Georg M, Tschopp J. The apoptosis endonuclease: cleaning up after cell death. *Trends Cell Biol* 1994;4:37-41.
- 44) Thomas CE, Reed DJ. Current status of calcium in hepatocellular injury. *Hepatology* 1989;10:375-384.
- 45) Goldman EF. Calcium signals in the liver. In: Arias IM, Jakoby et al. *The liver: Biology and pathology*. New York: Raven, 1988:777-784.
- 46) Berridge MJ. Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature* 1993;361:315-325.
- 47) Boobis AR, Fawthrop DJ, Davies DS. Mechanisms of cell toxicity. *Curr Opin Cell Biol* 1990;2:231-237.
- 48) Thor H, Hartzell H, Orrenius S et al. Potentiation of oxidative cell injury in hepatocytes which have accumulated Ca^{2+} . *J Biol Chem* 1984;259:6612-6615.
- 49) Smith MT, Sandy MS. Role of extracellular Ca^{2+} in toxic liver injury: comparative studies with the perfused rat liver and isolated hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;81:213-219.
- 50) Nicotera P, Hartzell P, Svensson SA, et al. Cystamine induces toxicity in hepatocytes through the elevation of cytosolic Ca^{2+} and the stimulation of a nonlysosomal proteolytic system. *J Biol Chem* 1986;261:14628-35.
- 51) Nicotera P, Thor H, Orrenius S. Cytosolic-free Ca^{2+} and cell killing in hepatoma 1c1c7 cells exposed to chemical hypoxia. *FASEB J* 1989;3:59-64.
- 52) Belomo G, Fulceri R, Albano E et al. Ca^{2+} -dependent and independent mitochondrial damage in hepatocellular injury. *Cell Calcium* 1991;12:335-341.
- 53) Zoetewij JP, van de Water B, de Bont HJ et al. Calcium-induced cytotoxicity in hepatocytes after exposure to extracellular ATP is dependent on inorganic phosphate. *J Biol Chem* 1993;268:3384-2388.
- 54) Thomas CE, Reed DJ. Effect of extracellular Ca^{2+} omission on isolated hepatocytes I. Induction of oxidative stress and cell injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;245:493-507.

- 55) Chien KR, Abrams J, Serroni A et al. Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver injury. *J Biol Chem* 1978;253:4809-4817.
- 56) Geeraerts MD, Ronveax-Dupal M, Lemasters JJ et al. Cytosolic free Ca²⁺⁺ and proteolysis in lethal oxidative injury in endothelial cells. *Am J Physiol* 1991;261:C889-C*(^.
- 57) Harrison DC, Lemasters JJ, Herman B. A pH-dependent phospholipase A2 contributes to loss of plasma membrane integrity during chemical hypoxia in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:65659.
- 58) Ferguson D, Gores GJ, Bronk sf et al. Increase in cytosolic protease activity during liver preservation. *Transplantation* 1993;55:627-633.
- 59) Kass GEN, Bellomo G, Juedes MJ et al. Toxic effects of calcium on mitochondria. *Methods Toxicol* 1993;2:378-388.
- 60) Cheung JY, Bonventure JV, Malis CD et al. A calcium and ischemic injury. *New Engl J Med* 1986;314:1670-1676.
- 61) Nicotera P, McConkey D, Svensson SA, Bellomo G et al. Correlation between cytosolic Ca²⁺ concentration and cytotoxicity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicology* 1988;52:55-63.
- 62) Smith MW, Phelps PC, Trump BF. Cytosolic Ca²⁺ deregulation and blebbing after HgCl₂ injury to cultured rabbit proximal tubule cells as determined by digital imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:4926-4030.
- 63) Starke PE, Hoek JB, Farber JL. Calcium-dependant and calcium-independent mechanisms of irreversible cell injury in culture hepatocytes. *J Biol Chem* 1986;261:3005-30012.
- 64) Nieminen AL, Dawson TL Gores GJ et al. Protection by acidotic pH and fructose against lethal injury to rat hepatocytes from mitochondrial inhibitors, ionophores and oxidant chemicals. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;167:600-606.
- 65) Lee KS, Frank S, Vanderklish P, et al. Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7233-7237.
- 66) Bronk SF, Gores GJ. PH dependent, non-lysosomal proteolysis contributes to lethal anoxic cell injury of rat hepatocytes, *Am J Physiol* 1993;264:G744-G751.

- 67) Chien KR, Abrams J, Pfau RG et al. Prevention by chlorpromazine of ischemic liver. *Am J Pathol* 1977;88:539-553.
- 68) Farber JL, Young EA. Accelerated phospholipid degradation in anoxic rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 1981;211:312-320.
- 69) Spivey JR, Bronk SF, Gores GJ. Glycochenodeoxycholate-induced lethal cell injury in rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1993;92:17-24.
- 70) Starke-Reed PE, Oliver CN. Protein oxidation and proteolysis during aging oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 1989;275:559-567.
- 71) Bronk SF, Gores GI. Efflux of protons from acidic vesicles contributes to cytosolic acidification of hepatocytes during ATP depletion. *Hepatology* 1991;14:626-633.
- 72) Gores GJ, Nieminen AL, Fleishman KE et al. Extracellular acidosis delays the onset of cell death in ATP depleted hepatocytes. *Am J Physiol* 1988;255:C315-C322.
- 73) Bronk SF, Gores GJ. Acidosis protects against lethal oxidative injury of liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 1991;14:150-157.
- 74) Currin RT, Gores GJ, Thurman RG et al. Protection by acidotic pH paradox. *FASEB J* 1991;5:207-210.
- 75) Bak ML, Ingwall JS. Acidosis during ischemia promotes adenosine triphosphate resynthesis in postischemic rat heart. *J Clin Invest* 1994;93:40-49.
- 76) Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 1980;191:421-427.
- 77) Forman HJ, Boveris A. Superoxid radical and hydrogen peroxide in mitochondria. *Free radicals in biology*. New York: Academic, 1982:65-90.
- 78) Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1985;237:408-411.
- 79) Fridovich S. Biological effects of the superoxide radical. *Arc Biochem Biophys* 1986;247:1-11.
- 80) Konstantinou AA, Peskin AV, Popova EY&, Khomutov GB et al. Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria. *Biochem Biophys Acta* 1987;894:1-10.

- 81) Dawson TL, Gorews GJ, Nieminen AL et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1993;264:C961-967.
- 82) Jones DP. The role of oxygen in oxidative stress: hypoxic and hyperoxic models. In: Sies H, ed. *Oxidative stress*. Orlando, Florida: Academic, 1985:151-185.
- 83) McCord JM. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *New Engl J Med* 1985;312:159-163.
- 84) Cross CE, Halliwell B, Borish ET, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987;107:526-545.
- 85) Southorn P, Powis G. Free radicals in medicine: II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 1988;63:390-408.
- 86) Southorn P, Powis G. Free radicals in medicine: I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988;63:381-389.
- 87) Brass CA, Narcisco J, Gollan JC. Enhanced activity of the free radical producing enzyme xanthine oxidase in hypoxic rat liver. *J Clin Invest* 1991;87:424-431.
- 88) Kuehi FAJ, Humes JL, Ham EA et al. Inflammation: the role of peroxidase derived product. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 1980;6:77-86.
- 89) Cadenos E, Sies H. Single oxygen formation detected by low level chemiluminescence during enzymatic reduction of prostaglandin G₂ to H₂. *Hopp-Seylers Z Physiol Chem* 1983;364:519-528.
- 90) Bilzer M, Lanterberg BH. Effects of hydrochlorous acid and chloramine on vascular resistance, cell integrity and biliary GSSG in the isolated perfused rat liver: modulation by GSH. *Hepatology* 1991;13:84-89.
- 91) Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992;6:3051-3064.
- 92) Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl J Med* 1993;329:2002-2012.
- 93) Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC et al. EPR characterization of molecular targets for NO in Mammalian cells and organelles. *FASEB J* 1993;7:1124-1134.
- 94) Stuehr DJ, Nathan CF. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 1989;169:1543-1555.

- 95) Parks DA, Buckley GB, Granger DN. Role of oxygen-delivered free radicals in digestive tract disease. *Surgery* 1983;94:415-422.
- 96) Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Radical Biol Med* 1985;1:3-25.
- 97) Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984;222:1-15.
- 98) Girotti AW. Mechanisms of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1985;1:87-95.
- 99) Bindoli A. Lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 1988;5:247-261.
- 100) Kass GEN, Juedes MJ, Orrenius S. Cyclosporine A protects hepatocytes against prooxidant-induced cell killing. *Biochem Pharmacol* 1992;44:1995-2003.
- 101) Schulte-Frohlinde D, Sonntag CV. Radiolysis of DNA and model system in the presence of oxygen. In: Sies H, eds. *Oxidative stress*. Orlando Florida: Academic, 1985:11-40.
- 102) Tribble DL, Aw TK, Jones DP. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology* 1987;7:377-387.
- 103) Minnoti G, Aust SD. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1987;262:1098-1104.
- 104) Bacon BR, Britton RS. The pathology of hepatic overload: a free radical-mediated process? *Hepatology* 1990;11:127-137.
- 105) Connor HD, Gao W, Nukina S et al. Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat-an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Transplantation* 1992;54:199-204.
- 106) Chojker M, Houghlum K, Solis-Heruzzo J et al. Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1989;264:16957-16962.
- 107) Houghlum K, Filip M, Witztum JL et al. Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal protein adducts in plasma and liver of rats with iron overload. *J Clin Invest* 1990;86:1991-1998.
- 108) Houghlum K, Breener DA, Chojkier M. d-alpha-tocopherol inhibits collagen alpha 1(I) gene expression in cultured human fibroblasts. Modulation of constitutive collagen gene expression by lipid peroxidation. *J Clin Invest* 1991;87:2230-2235.

- 109) Kamimura S, Gaal K, Britton RS et al. Increased 4-hydroxynonenal levels in experimental alcoholic liver disease: association of lipid peroxidation with liver fibrogenesis. *Hepatology* 1992;16:448-453.
- 110) Cotgreave IA, Moldeus P, Orrenius S. Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1988;28:189-212.
- 111) Deng H-X, Hentati A, Tainer J, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science* 1993;261:1047-1051.
- 112) Meister A. Glutathione. In: Arias IM, Jacoby WB et al, eds. *The liver: biology and pathobiology*. 2 ed. New York:Raven, 1988:401-417.
- 113) Griffith OW, Meister A. Origin and turnover of mitochondriaglutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4668-4672.
- 114) Rice-Evans CA, Diplock AT. Current status of antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med* 1993;15:77-96.
- 115) Bacon BR, Britton RS, O'Neill R. Effects of vitamin E deficiency on hepatic mitochondrial lipid peroxidation and oxidative metabolism in rats with chronic dietary overload. *Hepatology* 1989;9:398-404.
- 116) Lee SM, Clemens MG. Effect of α -tocopherol on hepatic mixed function oxidase in hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 1992;15:276-281.
- 117) Gerritsen ME, Bloor CM. Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J* 1993;7:523-532.
- 118) De-Forge LE, Preston AM, Takeuchi E et al. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem* 1993;268:25568-25576.
- 119) Sohal RS. Aging cytochrome oxidase activity and hydrogen peroxide release by mitochondria. *Free Rad Biol Med* 1993;14:583-588.
- 120) Culter RG. Peroxide-producing potential of tissues: inverse correlation with longevity of mammalian species. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:4798-4802.
- 121) Sparagg RG, Hinshaw DM, Hyslop PA et al. Alteration in adenosine triphosphate and energy charge in cultured endothelial and P338D cells after oxidant stress. *J Clin Invest* 1985; 76:1471-1476.
- 122) Nieminen AL, Gores GJ, Dawson TL et al. Toxic injury from mercuric chloride in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1990;265:2399-2408.
- 123) Annundi I, King J, Owen DA, et al. Fructose prevents hypoxic cell death in liver. *Am J Physiol* 1987;253:G390-G396.

- 124) Kane AB, Petrovich DR, Stern RQ et al. ATP depletion and loss of cell integrity in anoxic hepatocytes and silica-treated P388D1 macrophages. *Am J Physiol* 1985;249:C256-C266.
- 125) Pastorino JC, Snyder JW, Serroni A et al. Cyclosporine and carnitine prevent anoxic death of cultured hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 1993;268:13791-13798.
- 126) Masaki N, Thomas AR, Hoek JB et al. Intracellular acidosis protects cultured hepatocytes from the toxic consequence of a loss of mitochondrial energization. *Arch Biochem Biophys* 1989;272:152-161.
- 127) Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporine A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J* 1988;255:357-360.
- 128) Novgorodov SA, Gudz TI, Milgrom YM et al. The permeability transition in heart mitochondria is regulated synergistically by ADP and cyclosporine A. *A J Biol Chem* 1992;267:16274-16282.
- 129) Broekemeier KM, Carpenter DL, Reed DJ et al. Cyclosporine A protects hepatocytes subjected to high Ca^{2+} and oxidative stress. *FEBS Lett* 1992;304:192-194.
- 130) Imberti R, Nieminen AL, Herman B et al. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporine A, and trifluoperazine. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265:392-400.
- 131) Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am Physiol* 1990;258:C755-786.
- 132) Bernardi P, Vasanelli S, Veronese P, et al. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 1992;267:2934-2939.
- 133) Bernardi P, Veronese P, Petronilli V. Modulation of the mitochondrial cyclosporine A sensitive permeability transition pore. Evidence for two separate Me^{2+} binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J Biol Chem* 1993;268:1005-1010.
- 134) Petronilli V, Cola C, Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporine A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore

- induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH and matrix Ca^{2+} . *J Biol Chem* 1993;268:1011-1016.
- 135) Thies RI, Autor AP. Reactive oxygen injury to cultured pulmonary artery endothelial cells: mediation by poly(ADP-ribose)polymerase activation causing NAD depletion and altered energy balance. *Arch Biochem Biophys* 1991;286:353-363.
- 136) Weis M, Kass GEN, Orrenius S et al. N-Acetyl-p-benzoquinone imine induces Ca^{2+} release from mitochondria by stimulation pyridine nucleotide hydrolysis. *J Biol Chem* 1992;267:804-809.
- 137) Nguyen VD, Cieslinski DA, Humes HD. Importance of adenosine triphosphate in phospholipase A₂-induced rabbit proximal renal tubule cell injury. *J Clin Invest* 1988;82:1098-1105.
- 138) Chakrabort S, Gurtner GH, Michael JR. Oxidant mediates activation of phospholipase A₂ in pulmonary epithelium. *Am J Physiol* 1989;257:L430-L437.
- 139) Nichols JC, Bronk SF, Mellgren RL, et al. Inhibition of non-lysosomal calcium-dependent proteolysis by glycine during anoxic injury of rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1994;106:168-176.
- 140) Natarjan V, Taher MM, Roehm B et al. Activation of endothelial cell phospholipase D by hydrogen peroxide and fatty acid hydroperoxide. *J Biol Chem* 1993;268:930-937.
- 141) Sen A, Miller JC, Reynolds R et al. Inhibition of the release of arachidonic acid prevents the development of sarcolemmal membrane defects in culture rat myocardial cells during adenosine triphosphate depletion. *J Clin Invest* 1988;82:1333-1338.
- 142) Jauhonen P, Baraona E, Miyakawa H et al. Mechanism for selective perivenular hepatotoxicity of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 1982;6:350-357.
- 143) Ji S, Lemasters JJ, Christenson V, Thurman et al. Periportal and pericentral pyridine nucleotide fluorescence from the surface of the perfused liver: evaluation of the hypothesis that chronic treatment with ethanol produces pericentral hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:5415-5419.
- 144) Lieber CS, Baraona E, Hernandez-Munoz R, Kubota S, et al. Impaired oxygen utilization: a new mechanism for the hepatotoxicity of ethanol in sub-human primates. *J Clin Invest* 1989;83:1682-1690.

- 145) Lieber CS. Alcohol and the liver:1994 update. *Gastroenterology* 1994;106:1085-1105.
- 146) Gores GL. Hepatic preservation. In:Wiesner RH, Lake JR et al eds. *Liver transplantation*. New York: Wiley .
- 147) Blankenstein JD, Terpstra OT. Liver preservation :the past and the future. *Hepatology* 1991;13:1235-1250.
- 148) Clavien PA, Harvey RC, Strasberg SM. Preservation and reperfusion in liver allografts. *Transplantation* 1992;53:957-978.
- 149) Noack K, Bronk SF, Kato A et al. Bile duct cells are more vulnerable to reoxygenation injury than to anoxia. *Am J Physiol* 1987;252:C256-C361.
- 150) Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K et al. Ischemic injury in liver transplantation:difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 1992;16:454-461.
- 151) Lemasters JJ, Ji S, Thurman RG et al. Centrilobular injury following hypoxia in isolated, perfused rat liver. *Science* 1981;213:661-663.
- 152) Andersson BS, Aw TY, Jones DP. Mitochondrial transmembrane potential and pH gradient during anoxia. *Am J Physiol* 1987;252:C249-C355.
- 153) Aw TY, Andersson BS, Jones DP. Mitochondrial transmembrane ion distribution during hypoxia. *Am J Physiol* 1987;252:C256-C361.
- 154) Aw TY, Andersson BS, Jones DP. Suppression of mitochondrial respiratory function after short term anoxia. *Am J Physiol* 1987;252:C362-C368.
- 155) Marotto ME, Thurman RG, Lemasters JJ. Early midzonal cell death during low-flow hypoxia in the isolated perfused rat liver:protection by allopurinol. *Hepatology* 1988;8:585-590.
- 156) Marsh DC, Vreudgdenhil PK, Mack VE et al. Glykine protects hepatocytes from injury caused by anoxia cold ischemia and mitochondrial inhibitors, but not injury caused by calcium ionophores or oxidative stress. *Hepatology* 1993;17:91-98.
- 157) Imberti R, Nieminen AL, Herman B et al. Synergism of cyclosporin A and phospholipase inhibitors in protection against lethal cell injury to rat hepatocytes from oxidant chemicals. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1992;78:27-38.

- 158) Takei Y, Marzi I, Kauffman FC et al. Increase in survival time of liver transplants by protease inhibitors and calcium channel blocker, nisoldipine. *Transplantation* 1990;50:14-20.
- 159) Chazouilleres O, Calmus Y, Vaubourdolle M et al. preservation-induced liver injury:clinical aspects, mechanisms and therapeutic approaches. *J Hepatol* 1993;18:123-134.
- 160) Jaeschke H, Mitchell JR. Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;160:140-147.
- 161) Caraceni P, Gasbarini A, Van Thiel DH et al. Oxygen free radical formation by rat hepatocytes during postanoxic reoxygenation:scavering effect of albumine. *Am J Physiol* 1994;266:G451-G458.
- 162) Fujii Y, Johnson ME, Gores GJ. Mitochondrial dysfunction during anoxia/reperfusion injury of sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 1994;20:177-185.
- 163) Thurman RG, Bunzendahl H, Lemasters JJ. Role of sinusoidal lining cells in hepatic reperfusion injury following cold storage and transplantation. *Semin Liver Dis* 1993;13:93-100.
- 164) Zweier JL, Kuppusamy P, Luty GA. Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*1988;85:4046-4050.
- 165) Koo A, Komatsu H, Tao G et al. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion :evidence for a role for superoxide anion . *Hepatology* 1992;15:507-514.
- 166) Wu TW, Hashimoto N, Au JX et al. trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. *Hepatology* 1991;13:575-580.
- 167) Arnould T, Michiels C, Remacle J. Increase PMN adherence on endothelial cells after hypoxia: involment of PAF , CD18/CD11b and ICAM-1. *Am J Physiol* 1993;264:C1102-C1110.
- 168) Kubes P, Susuki M, Granger DN. Modulation of PAF-induced leukodyte adherence and increased microvascular permeability. *Am J Physiol* 1990. 259:G859-G864.

- 169) Osborn L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 1990;62:3-6.
- 170) Adams DH, Shaw S. Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* 1994;343:831-836.
- 171) tanner A, Keyhani A, Reiner R et al. Proteolytic enzymes released by liver macrophages may promote hepatic injury in a rat model of hepatic damage. *Gastroenterology* 1981;80:647-654.
- 172) Jaescke H, Farhood A. Neutrophil and Kupher cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991;260:G355-G362,
- 173) Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y et al. Kupher cell activation and endothelial damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 1991;13: 83-95.
- 174) Langrehr JM, Hoffman RA, Lancaster JJR et al. Nitric-oxide- a new endogenous immunomodulator. *Transplantation* 1993;55:1205-1212.
- 175) Jaeschke H, Rafferty MJ, Justesen U et al. Serum complement mediates andotoxin-induced cysteinly leukotriene fomation in rats in vivo. *Am J Physiol* 1992;263:G947-G952.
- 176) Witthaut R, Farhood A, Smith CW et al. Complement and tumor necrosis factor-alpha contribute to Mac-1 (CD11b/CD18) up regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia in vivo. *J Leukoc Biol* 1994;55:105-111.
- 177) Sanchez-Urdazpal L, Gores GL, Lemasters JJ et al. The Carolina Rinse solution decrease liver injury during clinical liver transplantation. *Transplant Proc* 1993;25:1574-1575.
- 178) Akinshola BE, Sharma S, Potter JJ et al. Ethanol enhances ADP-ribylation of protein in rat hepatocytes. *Hepatology* 1992;15:471-476.
- 179) Tsutsumi M, Lasker JM, Shimizu M, et al. The intralobular distribution of ethanoinduced P450IIE1 in rat and human liver. *Hepatology* 1989;10:437-446.
- 180) Nordman R, Ribiere C, Rouch H. Implicationof free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Radic Biol Med* 1992;12:219-240.
- 181) Lauterberg BH, Bilzer M. Mechanisms of acetaldehyde hepatotoxicity. *J Hepatol* 1988;7:384-390.F

- 182) French SW. Biochemistry of alcoholic liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1992;29:83-115.
- 183) Fernandez Checa JC, Garcia-Ruiz C, Ookhtens M et al. Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol fed rats. *J Clin Invest* 1991;87:397-405.
- 184) Kawase T , Kato S, Lieber CS. Lipid peroxidation systems in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology* 1989;10:815-821.
- 185) Fernadez-Checa JC, Ookhtens M, Kaplowitz N. Effect of chronic ethanol feeding on rat glutathione. *J Clin Invest* 1987;80:57-62.
- 186) Cunningham CC, Coleman WB, Spach PI. The effects of chronic ethanol consumption of hepatic mitochondrial energy metabolism. *Alcohol Alcohol* 1990;25:127-136.
- 187) Rubin E, Lieber CS. Fatty liver hepatitis and cirrhosis produced by alcohol in primates. *New Engl J Med* 1974;290:128-135.
- 188) Arai M, Leo MA, Nakano M et al. Biochemical and morphological alterations of baboon hepatic mitochondria after chronic ethanol consumption. *Hepatology* 1984;4:165-174.
- 189) Young SP, Aisen P. The liver and iron. In :AriasIM et al, eds. *The liver and pathobiology*. New York; Raven, 1988: 535-550.
- 190) Sternlieb I. Cooper and zinc. In: Arias IM, et al , eds.*The liver :biology and pathobiology*. New York: raven, 1985:525-534.
- 191) Bonkovsky HL. Iron and the liver. *Am J Med Sci* 1991;301:32-43.
- 192) Sternlieb I. Copper and the liver. *Gastroenterology* 1980;78:1615-1628.
- 193) Biemond P, Swaak AJG, Van Eijk HG et al. Superoxide dependet iron release from ferritin in inflamatory diseases. *Free Radic Biol Med* 1988;4:185-198.
- 194) O'Connel MJ, Ward RJ, Baum H et al. the role of iron in ferritin and haemosiderin: Is haemosiderine formation a biological protective mechanism? *Biochem J* 1986;234:727-731.
- 195) Topham R, Goger M, Pearce K et al. The mobilization of ferritin iron by cytosol. *Biochem J* 1989;261:137-143.
- 196) Sokol RJ, Deveraux MW, Triber MG et al. Copper toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes:effect of vitamin E. *Pediatr Res* 1989;25:55-62.

- 197) Bacon BR, Tavil AS, Britteham GM et al. hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. *J Clin Invest* 1983;71:429-439.
- 198) Bacon BR, Park CH, Britteham GM et al. Hepatic mitochondrial oxidative metabolism in rats with chronic dietary iron overload. *Hepatology* 1985;5:789-797.
- 199) Bacon BR, O'Neill R, Park CH, et al. Iron-induced injury to isolated hepatic mitochondria. *J Radic Biol Med* 1986. 2:339-347.
- 200) Bacon BR, O'Neill R, Britton RS. Hepatic mitochondrial energy production in rats with chronic iron overload. *Gastroenterology* 1993;105:1134-1140.
- 201) Britton RS, O'Neill R, Bacon BR. Hepatic mitochondrial malondialdehyde metabolism in rats with chronic iron overload. *Hepatology* 1990; 11:93-97.
- 202) sternlieb I, Feldman G. Effects of anti-copper therapy on hepatocellular mitochondria in patients with Wilson's disease: an ultra structural and serological study. *Gastroenterology* 1976;71:457-461.
- 203) Sokol RJ, Devereaux MW, O'Brien K, et al. Abnormal hepatic mitochondrial respiration and cytochrom C oxidase activity in rats with long-term copper overload. *Gastroenterology* 1993;105:178-187.
- 204) Socol RJ, Deveraux MW, Mierau GW, et al. Oxidant injury to hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload. *Gastroenterology* 1990;99:1061-1071
- 205) Myers BM, Prendergast FG, Holman R et al. Alterations in the structure, physicochemical properties, and pH of hepatocytes lysosomes in experimental iron overload. *J Clin Invest* 1991;88:1207-1215.
- 206) Greim H, Czygan D, Schaffner F et al. Determination of bile acids in needle biopsies of human liver. *Biochem Med* 1973;8:280-286.
- 207) Schmucker DL, Ohta M, Kanai S et al. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. *Hepatology* 1990;12:1216-1221.
- 208) Poupon RE, Balkan B, Eschwege E, et al. a multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 1991;324:1548-1554.

- 209) Scholmerich J, Becher MS, Schmidt K, et al. Influence of hydroxylation and conjugation of bile acid on their membrane-damaging properties-studies on isolated hepatocytes and membrane vesicles. *Hepatology* 1984;4:661-666.
- 210) Krahenbuhl S, Talos C, Fiscer S, et al. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 1994;19:471-479.
- 211) Krahenbuhl S, Stucki J, Reichen J. Reduced activity of the electron transport chain in liver mitochondria from rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1992;15:1160-1166.
- 212) Krahenbuhl S, Krahenbuhl-Glauser S, Stucki J, et al. Stereological and functional analysis of liver mitochondria from rats with secondary biliary cirrhosis: impaired mitochondria metabolism and increased mitochondrial content per hepatocyte. *Hepatology* 1992;15:1167-1172.
- 213) Sokol RJ, McKim MJ, Devereaux MK, et al. Increased hydroperoxide generation during taurochenodeoxycholic acid (TCDC) toxicity in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1994;106:A988.
- 214) Abramson II, Sharmoo AL. Anionic detergents as divalent cation ionophores across black lipid membranes. *J Membr Biol* 1979;50:241-244.
- 215) Jaescke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990. 4:3355-3359.
- 216) Jaescke H, Farhood A, Bautista AP, et al. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 1993;17:915-923.
- 217) Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993;91:379-387.
- 218) Mavrier P, Preaux AM, Guigui B, et al. In vitro toxicity of neutrophils to rat hepatocytes: evidence for a proteinase mediated mechanism. *Hepatology* 1988;8:254-258.
- 219) Mavrier P, Rosenbaum J, Preaux A, et al. Decreased toxicity of polymorphonuclear neutrophils toward hepatocytes isolated from rats with acute inflammatory reaction. *Hepatology* 1990; 12:1337-1341.
- 220) Toth CA, Thomas P. Liver endocytosis and Kupffer cells. *Hepatology* 1992;16:255-266.
- 221) Shiratori Y, Tanaka M, Hai K, et al. Role of endotoxin-responsive macrophages in hepatic injury. *Hepatology* 1990;11:183-192.

- 222) Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroec B, et al. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. *J Biol Chem* 1992;267:5317-5323.
- 223) Spitzer JA. Cytokine stimulation of nitric oxide formation and differential regulation in hepatocytes and nonparenchymal cells of endotoxemic rats. *Hepatology* 1994;19:217-228.
- 224) Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J et al. Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen radical-mediated hepatic injury. *J Leukoc Biol* 1992;52Z:390-394.
- 225) McFarlane IG. Autoimmunity and the liver. *Semin Liver Dis* 1991;11:223-233.
- 226) MacKay IR. Pathogenesis of autoimmune chronic active hepatitis. In: Krawit EL, Wiesner RH, eds. *Autoimmune diseases*. New York: Raven, 1991:1-42.
- 227) Krahenbuhl O, Tschopp J. Perforin-induced pore formation. *Immunol Today* 1991;12:399-4-2.
- 228) Podack ER, Hengartner H, Lichtenheld MG. A central role of perforin in cytolysis? *Annu Rev Immunol* 1991;9:129-157.
- 229) Tschopp J, Nabholz M. Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1990;8:279-302.
- 230) Wolf C, Chenard MP, Durand de Grossouvre P, et al. Breast-cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed in basal cell carcinoma and during cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol* 1992;99:870-2.
- 231) Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnel F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinase MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 1993;101:64-8.
- 232) Jeffrey J. Collagen and collagenase: pregnancy and perturbation. *Semin Perinatol* 1991;15:118-26.
- 233) Talhouk R, Bissel M, Werb Z. Co-ordinated expression of extracellular matrix degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol* 1992;118:1271-82.
- 234) Harris E. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990;322:1277-89.
- 235) Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res* 1991;26:230-42.

- 236) Matrisian L. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Gene* 1990;6:121-5.
- 237) Sato H, Takino T, Okada Y et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994;370:61-5.
- 238) Kleiner D, Stetler-Stevenson W. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994;218:325-9.
- 239) Brown PD, Bloxidge RE, Anderson E et al. Expression of activated gelatinase in human invasive breast carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 1993;11:183-9.
- 240) Brown P, Levy A, Margulies I. Independent expression and cellular processing of M[®] 72000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. *Cancer Res* 1990;50:6184-91.
- 241) David L, Nesland J, Holm R et al. Expression of laminin, collagen IV, fibronectin, and type IV collagenase in gastric carcinoma. *Cancer* 1994;73:518-27.
- 242) Hewitt RE, Leach IH, Powe DG, et al. Distribution of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in colorectal tumours. *Int J cancer* 1991;49:666-72.
- 243) D'Errico A, Garbisa S, Liotta L, et al. Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, and Ki67 proliferation antigen associated with human, gastric and breast carcinoma progression. *Mod Pathol* 1991;4:239-46.
- 244) Daidone M, Silvestrini R, D'Errico A et al. Laminin receptors, collagenase IV and prognosis in node negative breast cancers. *Int Cancer* 1991;48:529-32.
- 245) Porte H, Chastre E, Prevot S et al. neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes. *Int J cancer* 1995;64:70-5.
- 246) Rodgers WH, Osteen KG, Matrisian LM et al. Expression and localization of matrilysin , a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:253-60.
- 247) Matrisian LM,\. Matrix metalloproteinase gene expression. *Ann N Acad Sci* 1993;732:42-50.
- 248) Hibbs M, Hoidal J, Kang A. Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and denatured collagens by cultured human alveolar macrophages. *J Clin Invest* 1987;80:1644-50.

- 249) Wasylyk C, Gutman A, Nicholson r et al. The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J* 1991;10:1127-34.
- 250) Okada Y, Morodomi T, Enghild J et al. Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur J Biochem* 1990;194:721-30.
- 251) Okada Y, Gonoji Y, Naka K et al. Matrix metalloproteinase 9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT1080 human fibrosarcoma cells. *J Biol Chem* 1992;267:21712-19.
- 252) Okada Y, Tsuchiya H, Shimizu H et al. Induction and stimulation of 92-kDa gelatinase type IV collagenase production in osteosarcoma and fibrosarcoma cell lines by tumour necrosis factor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;171:610-17.
- 253) Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T et al. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3. *Biochemistry* 1990;29:10261-70.
- 254) Sang QX, Birkedal-Hansen H et al. Proteolytic and non-proteolytic activation of human neutrophil progelatinase B. *Biochim Biophys Acta* 1995;1251:99-108.
- 255) Crabbe T, Smith B, O'Connell JP et al. Human progelatinase A can be activated by matrilysin. *FEBS Lett* 1994;345:14-16.
- 256) Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin Cancer Biol* 1990;1:99-106.
- 257) Bernhard E, Muschel R, Hugles E. Mr 92000 gelatinase release correlates with the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Cancer Res* 1990;50:3872-7.
- 258) Reich R, thompson E, Iwamoto Y et al. Effects of inhibitors of plasminogen activator, serine proteinases, and collagenase IV on the invasion of basement membranes by metastatic cells. *Cancer Res* 1988;48:3307-12.
- 259) Nakajima M, Welch DR, Wynn DM et al. Serum and plasma M[®] 92000 progelatinase levels correlate with spontaneous metastasis of rat 13762NF mammary adenocarcinoma. *Cancer Res* 1993;53:5802-7.
- 260) Schwartz GK, Wang H, Lampen N et al. Defining the invasive phenotype of proximal gastric cancer cells. *Cancer* 1994;73:22-7.

- 261) Koshikawa N, yasumitsu H, Umeda M et al. Multiple secretion of matrix serine proteinase by humangastric carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1992;52:5046-53.
- 262) Della Porta P, Ryan NM, Collins KJ. Expression of gelatinolytic activity by oesophageal and colon carcinoma cell lines. *Biochem Soc Trans* 1995;23:391S.
- 263) Yoshimoto M, Itoh F, yamamoto H et al. Expression of MMP-7 (PUMP-1) mRNA in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 1993;54:614-18.
- 264) Taniguchi S, Iwamura T, Katsuki T. Correlation between spontaneous metastatic potential and type I collagenolytic activity in a human pancreatic cell line and sublines. *Clin Exp metastasis* 1992;10:259.
- 265) Zucker S, Lysik R, wieman j et al. Diversity of human pancreatic cancer cell proteinases: role of cell membrane metalloproteinases in collagenolysis and cytolysis. *Cancer Res* 1985;45:6168.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ

Εισαγωγή

Ο κυτταρικός θάνατος είναι ένα φαινόμενο “κλειδί” σε πολλές κλινικές καταστάσεις. Γι’ αυτό το λόγο η κατανόηση των κυτταρικών μηχανισμών που οδηγούν στο θάνατο του κυττάρου είναι απαραίτητη για να κατανοήσουμε και την ανθρώπινη νόσο. Ειδικά, το σύνηθες γεγονός του κυτταρικού θανάτου σε ένα ευρύ φάσμα γαστρεντερικών-ηπατικών νοσημάτων, κάνει ακόμη πιο αναγκαία την κατανόηση των κυτταρικών μηχανισμών που οδηγούν στην απώλεια της κυτταρικής βιωσιμότητας. Η απόπτωση είναι μια μορφή κυτταρικού θανάτου που επιτρέπει την απομάκρυνση των κατεστραμμένων, γηρασμένων και ανεπιθύμητων κυττάρων στους πολυκυττάριους οργανισμούς, χωρίς να καταστρέφει το κυτταρικό μικροπεριβάλλον. Πράγματι, η απόπτωση αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο σαν ένα βιολογικό κλειδί που ρυθμίζει την διαδικασία. Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος παίζει ένα συμπληρωματικό αλλά αντίθετο με τη μίτωση ρόλο στην διατήρηση της κυτταρικής και ιστικής ομοιόστασης. Η μίτωση προκαλεί αντιγραφή του κυττάρου, υπερπλασία των ιστών και υπερτροφία των οργάνων, ενώ η απόπτωση οδηγεί το κύτταρο στην “απόσυρση”, τους ιστούς στην υποπλασία και τα όργανα στην ατροφία (1). Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η καταστροφή που προκαλεί η απόπτωση οδηγεί στον ανισόρροπο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθότι παίζει σημαντικό ρόλο στην εξαφάνιση των κυττάρων από τους ιστούς και αναγνωρίζεται σήμερα ως ένας από τους μηχανισμούς της καρκινογένεσης. Επιπρόσθετα η απόπτωση εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα παθοφυσιολογικών καταστάσεων όπως αυτοάνοσες νόσοι, νοσήματα από ιούς, συγγενείς ανωμαλίες και γήρανση. Επιπλέον έχει εκτιμηθεί ως μια τοξικολογική απάντηση σε δυσμενείς περιβαλλοντικές καταστάσεις.

Καθορισμός του κυτταρικού θανάτου

Ο κυτταρικός θάνατος ορίζεται ως η μη αντιστρεπτή απώλεια των ζωτικών λειτουργιών του κυττάρου και της δομής του, η οποία μπορεί να συμβεί είτε με νέκρωση είτε με απόπτωση **(1-3)**. Αν και αυτός ο διαχωρισμός είναι υπεραπλουστευμένος λίγες είναι οι εμφανείς εξαιρέσεις απ' αυτόν και μας δίνει μια πολύ χρήσιμη βάση για την κατανόηση της κυτταρικής καταστροφής και τον θάνατο. Μέχρι πρόσφατα οι έρευνες γύρω από τον κυτταρικό θάνατο εστιάστηκαν στην κυτταρική νέκρωση αν και τώρα έχει διαπιστωθεί ότι και η απόπτωση μαζί με την νέκρωση συμβάλουν σ' αυτόν **(4)**. Η νέκρωση ορίζεται από την απώλεια της κυτταρικής μεμβράνης που οδηγεί στην κυτταρόλυση και ακολουθεί η απώλεια του ATP. Προκαλείται από την καταστροφή που υφίσταται το κύτταρο από ένα πλήθος προσβολών όπως η ισχαιμία, η υποξία, η υπερθερμία, η ακτινοβολία και μεταβολικές τοξίνες **(5)**. Αντίθετα με την νέκρωση η απόπτωση ορίζεται μορφολογικά από την κλασματοποίηση του πυρήνα, του DNA και του κυττάρου εν γένει, το οποίο διασπάται σε τμήματα περιβαλλόμενα από μεμβράνη και που περιέχουν δομικά οργανίδια άθικτα, και βιώσιμα που αναφέρονται σαν “αποπτωτικά σωμάτια”. Παρά τον τεμαχισμό του κυττάρου τόσο τα οργανίδια όσο και η κυτταρική μεμβράνη παραμένουν άθικτα στην απόπτωση. Τα “αποπτωτικά σωμάτια” τελικά αποβάλλονται με φαγοκυττάρωση **(6)**. Αυτό που πρέπει να τονιστεί είναι ότι η απόπτωση είναι μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου αλλά δεν είναι συνώνυμες λέξεις **(6)**. Αντίθετα με τη νέκρωση, η απόπτωση είναι ένα ενεργητικό φαινόμενο του κυττάρου που χαρακτηρίζεται από αυξημένη πρωτεϊνική και RNA σύνθεση **(7)**. Το φαινόμενο της απόπτωσης έχει παρατηρηθεί σε πολλές παθολογικές καταστάσεις του ήπατος, όπως ο κίτρινος πυρετός **(8)**, οξείες ιογενείς ηπατίτιδες **(9)**, χρόνιες ενεργείς ιογενείς ηπατίτιδες (μηΑ μηΒ) **(10)**, φαρμακευτικές ηπατίτιδες, ηπατοκυτταρικός καρκίνος **(9)**, παιδικά ηπατώματα **(11)**. Όσον αφορά μάλιστα τα κακοήθη νεοπλάσματα **(12)** τίθεται σήμερα η εξής υπόθεση **(13,14)**: η καρκινογένεση είναι αποτέλεσμα της ανισορροπίας ανάμεσα στην ανώμαλη κυτταρική μίτωση και την απόπτωση όπου η πρώτη υπερσχύει της δεύτερης. Έτσι ένα σημαντικό επακόλουθο στην ογκολογία είναι η επαγωγή της απόπτωσης με χημειοθεραπεία για να περιορίσει τις παρενέργειες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού **(14)**

Μορφολογία της απόπτωσης

Τα κύτταρα που οδηγούνται σε απόπτωση συστέλλονται, χάνουν τα ειδικά επιφανειακά συστατικά τους όπως οι μικρολάχνες και οι διακυτταρικές συνδέσεις και τελικά χάνουν και την επαφή τους με τα γεινιάζοντα κύτταρα (1,3,6,15). Υφίστανται εκτεταμένη επιφανειακή ελίκωση και σχηματίζουν κυτταροπλασματικά κυστίδια που περιέχουν οργανίδια. Μαζί με τις πυρηνικές αλλαγές συμβαίνουν και δραματικές αλλαγές στην υφή των υπερμικροσκοπικών σωματιδίων. Η χρωματίνη συμπυκνώνεται σε ημισεληνοειδείς σχηματισμούς παρακείμενους στην πυρηνική μεμβράνη και ακολουθεί ο πυρηνικός διατεμαχισμός. Αυτές οι μεταβολές συμβαίνουν μαζί με τις κυταροπλασματικές αλλαγές όπου το κύτταρο χωρίζεται αρχικά σε κλάσματα που περιβάλλονται από κυτταρική μεμβράνη και περιέχουν μέρος του πυρήνα και άθικτα οργανίδια που ορίζονται ως αποπτωτικά σωματίδια. Κατά την διάρκεια της διαδικασίας αυτής η πλασματική μεμβράνη παραμένει άθικτη. Τα αποπτωτικά σωματίδια αποβάλλονται είτε από επιθηλιακές επιφάνειες είτε φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά κύτταρα ή ιστικά μακροφάγα. Σε ιστικές καλλιέργειες τα κύτταρα δεν φαγοκυτταρώνονται αλλά απομόνα τους αποσπώνται από τα γειτονικά τους και από τα υποστρώματα των καλλιεργειών.

Ιστολογικά η απόπτωση δεν είναι εμφανής ούτε αναγνωρίσιμη για πολλούς λόγους:

- 1) Επηρεάζονται μόνο σκόρπια και μεμονωμένα κύτταρα
- 2) Τα περισσότερα αποπτωτικά σωματίδια είναι μικροσκοπικά σε μέγεθος και ως εκ τούτου αδύνατον να αναγνωριστούν με το κοινό οπτικό μικροσκόπιο
- 3) Τα αποπτωτικά σωματίδια φαγοκυτταρώνονται και απομακρύνονται με πολύ γρήγορο ρυθμό
- 4) Απουσιάζει η φλεγμονώδης αντίδραση σε παρακείμενους ιστούς και
- 5) Η απόπτωση συχνά δεν διακρίνεται από την νέκρωση. Ιστολογικά κριτήρια του κυτταρικού θανάτου όπως καρρυόρηξη και πύκνωση μπορούν να παρατηρηθούν και στην απόπτωση και στην νέκρωση.

Βιοχημεία της απόπτωσης

Το κυριότερο βιοχημικό χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι ο κατακερματισμός

του DNA σε τμημάτια μήκους 180-200 ζευγών βάσεων πυρηνικών οξέων ή πολλαπλασίων του, που αποκαλύπτονται μετά από ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης (DNA Ladder Pattern). Στην περίπτωση αυτή τα ιόντα Ca^{++} με την παρουσία τους ενεργοποιούν την ενδογενή ενδονουκλεάση η οποία προκαλεί διατομές των αλύσεων του DNA σε θέσεις μεταξύ των νουκλεοσωμάτων (16), με κάποια περιοδικότητα. Η αρχική περιγραφή έγινε σε κύτταρα θύμου επίμυος τα οποία εκτέθηκαν στην επίδραση γλυκοκορτικοειδών (17). Επίσης άλλο ένζυμο είναι η εξαρτώμενη από τα ιόντα Ca^{++} κυτταροπλασματική τρανσγλουταμινάση (18). Αυτό που πρέπει να τονιστεί είναι η μεγάλη ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων Ca^{++} κατά την απόπτωση (19,20). Πρόσφατα μία ομάδα πρωτεασών, ειδικότερα αυτές της οικογένειας των μετατροπέων της ιντερλευκίνης 1β οι οποίες δρουν στις πυρηνικές πρωτεΐνες έχουν κινήσει το ερευνητικό ενδιαφέρον (21). Στη νέκρωση, το DNA είτε δεν κατακερματίζεται είτε διατέμνεται σε τυχαίες θέσεις ώστε να προκύπτουν ανισομεγέθη τμημάτια που εξαφανίζονται στην ηλεκτροφόρηση ως επίχρισμα (22). Η διαδικασία κατάτμησης του DNA προηγείται της εμφάνισης των μορφολογικών εκδηλώσεων της απόπτωσης και διαρκεί ως το τέλος του κυτταρικού θανάτου (23). Επειδή η απόπτωση αποτελεί ασύγχρονη μεταβατική διαδικασία που διαρκεί μικρό μόνο χρονικό διάστημα, οι μορφολογικές αλλοιώσεις που εξελίσσονται ραγδαία, γίνονται δύσκολα αντιληπτές στο οπτικό, ακόμα και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (24).

Γονιδιακοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί

Η γενετική ρύθμιση της απόπτωσης εστιάζεται α) σε γονίδια ρυθμιστικά-ευοδωτικά της απόπτωσης και των οποίων τα γονιδιακά προϊόντα επάγουν την απόπτωση (death genes) β) σε γονίδια των οποίων η έκφραση αναστέλλει την απόπτωση και οδηγούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Proto-oncogenes). Το να ομαδοποιήσουμε τα γονίδια σε αυξητικά-ρυθμιστικά-πολλαπλασιαστικά είτε αποπτωτικά αν και είναι πολύ ελκυστικό αποτελεί μεγάλη υπεραπλούστευση. Αναγνωρίζεται τώρα ότι πολλά αυξητικά-επαγωγικά γονίδια όπως το C-myc μπορούν επίσης να αναστείλουν την απόπτωση επίσης. Διάφορα γονίδια πάντως έχουν εμπλακεί είτε στην αναστολή είτε στην επαγωγή την απόπτωσης. Επειδή οι γνώσεις μας σ' αυτό το θέμα είναι ακόμα στην αρχή, δεν τολμούμε να ομαδοποιήσουμε τα γονίδια σε αποπτωτικά ή

αντιαποπτωτικά. Επιπλέον οι μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση μπορούν να προκύψουν ως συνέχεια του κυτταρικού θανάτου.

Η πρώτη ένδειξη για τη σημασία της ενεργού γονιδιακής ρύθμισης στην απόπτωση προήλθε από την παρατήρηση ότι αναστολείς σύνθεσης πρωτεϊνών και mRNA μπορούν να παρεμποδίσουν την πραγματοποίηση ορισμένων τύπων προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σε αναπτυσσόμενους οργανισμούς. Η πλέον ολοκληρωμένη αντίληψη για τη συμμετοχή των γονιδιακών μηχανισμών στη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου προήλθε από τη μελέτη του νηματώδους *Caenorhabditis elegans*. Τα πρώτα δύο από τα γονίδια που ανακαλύφθηκαν ήταν τα *ced-3, ced-4* οι μεταλλάξεις των οποίων είχαν ως αποτέλεσμα την επιβίωση 131 από τα 1000 περίπου σωματικά κύτταρα του οργανισμού αυτού που επρόκειτο κανονικά να υποστούν τη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Το γονίδιο *ced-3* βρέθηκε ότι είναι ομόλογο με την ομάδα ICE (interleukin-1 β -converting enzyme) των πρωτεϊνών κυστεΐνης, ενώ το ομόλογο γονίδιο των θηλαστικών έναντι του *ced-4* δεν έχει πλήρως ταυτοποιηθεί. Αργότερα βρέθηκε ότι η δράση των δύο παραπάνω γονιδίων ελέγχεται από ένα άλλο γονίδιο το *ced-9*. Η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου αυτού έδειξε ότι είναι ομόλογο με το ανθρώπινο ογκογονίδιο *bcl-2* (24,25,26).

Από τότε που ανακαλύφθηκε ότι η αλληλουχία του *Ced-3* είναι ταυτόσημη με την ICE των θηλαστικών έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον άλλες 14 πρωτεΐνες της κυστεΐνης που ονομάστηκαν **κασπάσες**. Αυτές οι πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από την σχεδόν απόλυτη ειδικότητα για το ασπαρτικό οξύ στη θέση P1. Όλες οι κασπάσες περιέχουν ένα μοτίβο πενταπεπτιδίου το Q,A,C,X,G όπου X μπορεί να είναι R,Q,G. Οι κασπάσες συντίθενται σαν αδρανή προένζυμα που αποτελούνται από ένα N-τελικό πεπτιδίο (prodomain) μαζί με μια μεγάλη και μια μικρή υποομάδα. Η κρυσταλλική δομή των κασπασών 1 και 3 δείχνει ότι το ενεργό ένζυμο είναι ένα ετεροτετραμερές που περιέχει δύο μικρές και δύο μεγάλες υποομάδες. Η ενεργοποίηση των κασπασών κατά τη διάρκεια της απόπτωσης οδηγεί σε κατακερματισμό κρίσιμων κυτταρικών υποστρωμάτων που περιλαμβάνουν πολύ-πολυμεραση (ADP-ribose) και λαμίνες, και οδηγούν στις δραματικές μορφολογικές μεταβολές της απόπτωσης. Η απόπτωση που επάγεται από το CD95 (Fas/Apo-1) και τον TNF ενεργοποιεί την κασπάση-8 (MACH/FLICE/Mch5) η οποία περιέχει ένα N-τελικό τμήμα μαζί με μια FADD(Fas-associates protein with death domain)-like

περιοχή που προκαλεί το θάνατο, παρέχοντας ένα άμεσο δεσμό μεταξύ κυτταρικού θανάτου και κασπασών. Η σημαντικότητα των προπεριοχών των κασπασών για τη ρύθμιση της απόπτωσης έχει ακόμα πολύ μεγαλύτερη σημασία από την αναγνώριση προσαρμοστικών μορίων όπως των RAIDD {receptor-interacting protein(RIP)-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with a death domain}/CRADD(caspase and RIP adapter with death domain), τα οποία συνδέονται με τις προπεριοχές της κασπάσης 2 και τις κάνουν μέλη του συμπλέγματος του σήματος. Τα κύτταρα που υπόκεινται σε απόπτωση ακολούθως προκαλούν τους υποδοχείς του θανάτου να εκτελέσουν το πρόγραμμα θανάτου ενεργοποιώντας ιεραρχικά τις κασπάσες, με την κασπάση 8 ή πιθανόν την κασπάση 10 να είναι στην κορυφή του καταρράκτη της απόπτωσης (27). Στην ίδια ομάδα πρωτεϊνών ανήκει και η λειτουργικά ομόλογη πρωτεάση granzyme B, η οποία είναι υπεύθυνη για την απόπτωση που προκαλείται από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα.(105).

Η πρωτεΐνη **bcl-2** όταν υπερεκφρασθεί οδηγεί σε αναστολή της διαδικασίας της απόπτωσης με αποτέλεσμα την επιμήκυνση του χρόνου ζωής του κυττάρου (28). Βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή και πυρηνική μεμβράνη ως επίσης και στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τη συναντούμε στις χρωμοσωμιακές αντιμεταθέσεις των οζωδών λεμφωμάτων (29). Ανευρίσκεται κυρίως σε κύτταρα με μεγάλη διάρκεια ζωής όπως είναι τα νευρικά (29). Οι μέχρι τώρα μελέτες δεν την έχουν εντοπίσει ακόμα στα ηπατοκύτταρα (30,31,32) αν και βρίσκεται άφθονη στα χοληφόρα και στα κύτταρα των κολποειδών (32). Μία πιθανή εξήγηση της απουσίας του bcl-2 είναι η εξής (33): η πρωτεΐνη bax που σχετίζεται με τη bcl-2 και είναι ισχυρός αναστολέας της, βρίσκεται στα ηπατοκύτταρα και σχηματίζει in vivo ετεροδιμερή bcl-2-bax (34). Η υπεροχή του bax, προάγει την απόπτωση αν και η απόπτωση θα αναστελλόταν από την έκφραση του bcl-2.

Εκτός από το γονίδιο bcl-2 ,ανακαλύφθηκε πρόσφατα μια ολόκληρη ομάδα γονιδίων που ρυθμίζουν την απόπτωση και εμφανίζουν ομολογία αλληλουχίας με το bcl-2. Τα γονίδια της ομάδας Bcl-2 μπορούν να διαιρεθούν σε δύο ανταγωνιστικές από λειτουργικής πλευράς ομάδες: καταστολείς του κυτταρικού θανάτου (bcl-2,Bcl-xL, MCL-1 και A1) και προαγωγείς του κυτταρικού θανάτου (Bax, Bcl-Xs, Bak, Bad). Όλες οι πρωτεΐνες των γονιδίων της οικογένειας bcl-2 περιέχουν δύο καλά διατηρημένες ομόλογες περιοχές που ονομάζονται BH1 και BH2, οι οποίες χρησιμεύουν στο σχηματισμό ετεροδιμερών μεταξύ των ανταγωνιστικών μελών των

δύο ομάδων ή ομοδιμερών μεταξύ των μορίων της ίδιας πρωτεΐνης. Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα πειραματικά δεδομένα, η σχετική αναλογία των αντιαποπτωτικών και αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, προσδιορίζει την ευαισθησία ή αντοχή των κυττάρων στα διάφορα ερεθίσματα ή καταστάσεις που προκαλούν απόπτωση (35,36).

Το **p-53** σχετίζεται με την διατήρηση του κυττάρου που έχει υποστεί βλάβη στη φάση G-1 του κυτταρικού κύκλου ώστε να δοθεί πίστωση χρόνου για επιδιόρθωση. Είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο και συνδυάζεται με αποπτωτική δράση μέσω αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από το προϊόν που κωδικοποιεί (37). Το p53 είναι απαραίτητο για ορισμένους αλλά όχι όλους τους τύπους της απόπτωσης (38,39,40). Ασκεί σημαντικό και εξαρτημένο από την ποσότητα αποτέλεσμα στην έναρξη της απόπτωσης αλλά μόνο όταν επάγεται από παράγοντες που προκαλούν τη ρήξη της έλικας του DNA.

Η επαγωγή της απόπτωσης από το p53, αποτελείται από δύο σκέλη. Το πρώτο είναι η απαίτηση ενεργοποίησης γονιδίων στόχων από το p53 μέσω ειδικής κατ'ακολουθία DNA σύνδεσης, ενώ το δεύτερο σκέλος είναι μια μάλλον ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων οδός, που παρακάμπτει τα γονίδια στόχους του p53 (41,42). Ο κατασταλτικός στην ανάπτυξη ρόλος του p53 συνίσταται στην ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου waf1 γνωστού και ως p21/CIP1, το οποίο είναι ισχυρός αναστολέας των G1, G2 κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (43,44). Οι ενεργοποιημένες κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες φωσφορυλιώνουν και αδρανοποιούν την πρωτεΐνη Rb.

Η επαγωγή του Waf1 από το p53 έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση των κινασών οδηγώντας σε αποτυχία φωσφορυλίωσης της Rb και κατά συνέπεια τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου.

Τόσο η αναστολή των G1,G2 όσο και η απόπτωση συμβαίνουν σε απάντηση της επαγωγής του **Waf1** από το p53 (45,46). Η αδυναμία επαγωγής του Waf1 αποκλείει την p53 εξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού κύκλου (πολλ/σμου), ενώ ακύρωση της p53-εξαρτώμενης αναστολής και της συνεπαγόμενης απόπτωσης μπορεί να επισυμβεί είτε λόγω απενεργοποίησης του p53 από μεταλλαγή (47) ,είτε λόγω απορρύθμισης της έκφρασης του mdm-2(48).

Το 21 kda παράγωγο του waf1 βρίσκεται σε ένα σύμπλεγμα κυκλινών κυκλινοεξαρτωμένων κινασών και PCNA, σε φυσιολογικά αλλά όχι τροποποιημένα

κύτταρα και φαίνεται ότι είναι καθολικός (γενικός) αναστολέας της δραστηριότητας των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών **(44,64,65,66,67)**. Ένα αποτέλεσμα της σύζευξης και της αναστολής των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDK) του p21/waf1, είναι να εμποδίζει την CDK-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση με επακόλουθη αδρανοποίηση της Rb πρωτεΐνης (4) η οποία είναι απαραίτητη για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

Γιαυτό το p21/waf1 είναι ένας ισχυρός και αναστρέψιμος αναστολέας του κυτταρικού κύκλου στα σημεία ελέγχου G1, G2 **(45,63,68)**, προφανώς για να δώσει τον απαραίτητο χρόνο στο DNA να ολοκληρώσει την επιδιόρθωση του . Η μη αναστρέψιμη διακοπή στα σημεία G1,G2 οδηγεί στην απόπτωση.

Εντούτοις ο ρόλος του p21/waf1 στην απόπτωση είναι λιγότερο σαφής, αν και η p53-εξαρτώμενη απόπτωση οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του waf1 **(45,63)**. Η επαγωγή του p21/waf1 σε απάντηση της καταστροφής του DNA μπορεί να συμβεί μέσω τόσο p53 –εξαρτώμενων, όσο και p53 ανεξάρτητων μηχανισμών, σε απάντηση μιτογόνων ερεθισμάτων και ερεθισμάτων διαφοροποίησης, ή σε κύτταρα νεοπλασματικά με μεταλλαγμένο p53 **(43,45,63,69-71)**.

Το λειτουργικό p21/waf1 είναι απαραίτητο για την p53 εξαρτώμενη διακοπή στο σημείο G1 **(72,73)** ,προφανώς οφειλόμενη στην αναστολή από το waf1 και της δραστηριότητας των CDK και της PCNA-εξαρτώμενης αντιγραφής του DNA **(74)**.

Το waf1 έχει επίσης αναγνωρισθεί σαν γονίδιο που αναμειγνύεται στην γήρανση του κυττάρου, καλούμενο sd11 **(75)**. Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η υπερέκφραση του p21/waf1 καταστέλλει την ανάπτυξη **(43)** πράγμα συμβατό με το ρόλο του ως αναστολέα των CDKs. Αναστέλλοντας την αδρανοποίηση της Rb με ένα p53 εξαρτώμενο τρόπο, το p21/waf1 βοηθά στην ολοκλήρωση του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που εξαρτάται από το p53 και την Rb.

Τα ευρήματα είναι συμβατά με το τρέχον μοντέλο της λειτουργίας του p53 κατά το οποίο το p53 κατά κάποιο τρόπο αντιλαμβάνεται την καταστροφή του DNA και διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο είτε στο G1 είτε στο G2(σημείο ελέγχου), για να επιτρέψει την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA . Εάν η επιδιόρθωση είναι ανεπιτυχής , το p53 μπορεί να προωθήσει τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης , τοιουτοτρόπως εμποδίζοντας την αναπαραγωγή γενετικών ατελειών σε διαδοχικές κυτταρικές γενεές. Το p53 επίσης αποδείχτηκε ότι έχει άμεσο αποτέλεσμα στην απόπτωση.ελέγχοντας αρνητικά την έκφραση του και θετικά την έκφραση του bax **(49)**.

Το **mdm-2** γονίδιο είναι ογκογόνο όταν ενισχύεται και όταν υπερεκφράζεται (**50-55**). Η 90kda mdm-2 πρωτεΐνη σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλοκο με το p53 *in vivo* , και αναστέλλει την ειδική κατ'ακολουθία σύνδεση του DNA με το p53 (**51,56**).

Ανάλυση των mdm-2 και p53 γονιδίων σε σαρκώματα έδειξε ότι το ένα ή το άλλο από αυτά τα γονίδια μεταλλάσσεται στο 70% των όγκων (**51,53**). Έτσι μεταβολές είτε στο p53 είτε στο mdm-2 αντιπροσωπεύουν εναλλακτικούς μηχανισμούς για την απενεργοποίηση της ίδιας οδού καταστολής της αύξησης. Ο φυσικός τύπος του p53 προκαλεί την έκφραση του mdm-2 σαν απάντηση στην βλάβη του DNA (**57**), ενώ υπερέκφραση του mdm-2 αναστέλλει την ικανότητα του φυσικού τύπου του p53 να προκαλέσει την έκφραση των γονιδίων στόχων (**51,56,58**).

Η ρύθμιση της έκφρασης του mdm-2 από το p53 αντιπροσωπεύει ένα ανάδρομο μηχανισμό ελέγχου της λειτουργίας του p53 (**57**). Η λειτουργία του mdm-2 είναι σημαντική για την ανάπτυξη, καθώς τα ποντίκια που δεν έχουν mdm-2 πεθαίνουν κατά την εμβρυογένεση (**59,60**). Αυτό μπορεί να αποφευχθεί με την εξάλειψη του p53, γεγονός που δείχνει ότι το mdm-2 είναι απαραίτητο για την αρνητική ρύθμιση της ενεργότητας του p53 (**59,60**).

Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η 90 mdm2 πρωτεΐνη σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα τόσο με την E2F όσο και με την Rb πρωτεΐνη. Το mdm-2 προκαλεί την E2F εξαρτώμενη ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων συνδεδεμένο στη σφαίρα επιρροής της δράσης της E2F (**61**). Η E2F είναι εν δυνάμει ενεργοποιητής εκ μεταγραφής που συνήθως συνδέεται με /και αναστέλλεται από την υποφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Rb. Το mdm-2 προκαλεί την απελευθέρωση του E2F από το Rb και οδηγεί σε εκ μεταγραφής ενεργοποίηση των E2F γονιδίων στόχων (**61,62**). Σύνδεση του mdm-2 με την Rb πρωτεΐνη , μειώνει την Rb εξαρτώμενη καταστολή της ενεργοποίησης της E2F, με ένα p53 ανεξάρτητο τρόπο (**62**).

Έτσι το mdm-2 μπορεί να υπερπηδήσει την ικανότητα αναστολής (του κύκλου) στα σημεία G1, που έχει τόσο το p53 όσο και η Rb , όπως και να επάγει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού ενεργοποιητή E2F , που προάγει την ανάπτυξη.

Η ελάφρυνση των λειτουργιών αναστολής της ανάπτυξης τόσο του p53 όσο και της Rb , συμφωνεί με την παρατήρηση ότι το mdm-2 μπορεί να προκαλέσει έξοδο από την G1 φάση στα p53+/Rb+ κύτταρα (**62**) και είναι απαραίτητο για την εμβρυογένεση (**59,60**). Το γονίδιο p53 ενεργοποιεί εκ μεταγραφής έναν αριθμό γονιδίων , συμπεριλαμβανομένου του waf1/CIP1, σε απάντηση της βλάβης του DNA

(43,45,63).

Το **ΑΡΟ-1/Fas** (CD 95) είναι ρυθμιστής της απόπτωσης. Ο υποδοχέας του είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου 1 της οικογένειας TNF (Tumor Necrosis Factor) και του EGF (Epidermal Growth Factor). Αφού συνδεθεί με ορισμένα αντισώματα διεγείρει τους αποπτωτικούς μηχανισμούς, ιδιαίτερα σε κύτταρα στα οποία υπερεκφράζεται (76,77).

Το ογκογονίδιο **c-myc** συμμετέχει στη ρύθμιση της απόπτωσης κυρίως σε συνδυασμό με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι πρωτεΐνες Max και Mad ανήκουν σε μια οικογένεια πρωτεϊνών συγγενών με το myc οι οποίες χαρακτηρίζονται από μια ομόλογη περιοχή που τους επιτρέπει την σύνδεση με ορισμένη αλληλουχία του DNA καθώς και μεταξύ τους. Η δράση του myc στο κύτταρο υλοποιείται με σχηματισμό ετεροδιμερών Myc/Max. Η δημιουργία των διμερών αυτών περιορίζεται κυρίως από τα επίπεδα της συγκέντρωσης του Myc, τα οποία σε κατάσταση ηρεμίας του κυττάρου είναι χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα. Σε καταστάσεις όμως διεγέρσεως των κυττάρων από μιτογόνα η συγκέντρωση του Myc αυξάνεται εντός λεπτών ενώ τα επίπεδα της συγκέντρωσης του Max παραμένουν σταθερά τόσο σε ηρεμούντα όσο και σε ενεργοποιημένα κύτταρα (78). Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα πειραματικά δεδομένα η υπερέκφραση του myc σε κυτταρικές σειρές που βρίσκονται σε ελαττωμένη συγκέντρωση ορού ή αυξητικών παραγόντων έχει ως συνέπεια την παύση της κυτταρικής διαφοροποίησης και πρόκληση εκτεταμένης απόπτωσης (79).

Το **TRPM-2** που κωδικοποιεί την κλωστερίνη και την SGP-2 πρωτεΐνη εκφράζεται κατά την διάρκεια της απόπτωσης. Το RP-2 και το RP-8 που ανήκουν στην ίδια οικογένεια είναι άφθονα κατά την προκλητή απόπτωση των θυμοκυττάρων (76).

Φαγοκυτταρικοί μηχανισμοί

Όσον αφορά τους μηχανισμούς αναγνώρισης των κυττάρων από τα φαγοκύτταρα είναι ουσιαστικά τρεις:

1) Ανακατανομή των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την απώλεια της υδροφοβίας της επιφάνειας η οποία αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς φωσφατιδικής σερίνης των μακροφάγων με τους οποίους συνδέεται, δίνοντας έτσι το έναυσμα για την έναρξη των αποπτωτικών διαδικασιών. Ο μηχανισμός αυτός

μελετήθηκε σε δρεπανοκύτταρα, φυσιολογικά ερυθροκύτταρα, ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, θυμοκύτταρα και λεμφοκύτταρα (77).

2) *in vitro* μελέτες έδειξαν εμπλοκή των λεκτινών και των υποδοχέων θρομβοσπονδίνης και φωσφατιδικής σερίνης. Οι δεσμοί των υδατανθράκων επιφανείας του ενός κυττάρου με τις λεκτίνες του άλλου, αποτελούν συνήθη μηχανισμό κυτταρικής σύναψης. Υποστηρίζεται ότι μια απο τις μεταβολές που σηματοδοτούν ειδικά την αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων από τα παρακείμενα κύτταρα, είναι η απώλεια σιαλικού οξέως ή άλλων υδατανθράκων (77).

3) η έκκριση θρομβοσπονδίνης απο τα μακροφάγα, που μεσολαβεί ως σύνδεσμος για την πρόσληψη των αποπτωτικών πολυμορφοπυρήνων λευκοκυττάρων από τους υποδοχείς βιτρονεκτίνης των μακροφάγων (77).

Μεσολαβητικοί ρυθμιστικοί παράγοντες

Οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτταροκίνες έχουν ποικίλη δράση (77). Το ανοσοποιητικό σύστημα συμμετέχει στην απάλειψη ορισμένων λεμφοκυτταρικών κλώνων (76). Η ορμονική στέρηση οδηγεί σε ατροφία ορμονοεξαρτώμενων ιστών και οργάνων. Η στέρηση ACTH απο τα κύτταρα του φλοιού των επινεφριδίων και της FSH και LH απο το γεννητικό επιθήλιο του όρχεως αποτελούν τυπικά παραδείγματα απόπτωσης. Τα ανδρογόνα επάγουν την απόπτωση των ωοθυλακικών κυττάρων ενώ τα οιστρογόνα έχουν την αντίθετη δράση (80). Η παρουσία αναστολέων σύνθεσης RNA και πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση, πιθανώς λόγω μεταβολής της σταθερότητας του mRNA. Χημικές ουσίες ή φάρμακα, που προκαλούν δομικές μεταβολές της χρωματίνης, μπορεί να ενεργοποιήσουν την δραστηριότητα της ενδονουκλεάσης, με συνέπεια τον αποπτωτικό κερματισμό του DNA (76).

Απόπτωση και παθογένεια των νόσων

Όπως και στην αρχή του κεφαλαίου αναφέρθηκε η απόπτωση αποτελεί ένα προγραμματισμένο κυτταρικό γεγονός. Η ισορροπία μεταξύ του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της απόπτωσης είναι απαραίτητη για να μπορέσει να διατηρηθεί

φυσιολογικός ο αριθμός των κυττάρων σε ένα οργανισμό. Διαταραχή αυτής της ισορροπίας οδηγεί αναπόφευκτα σε νόσο. Η αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή η ελάττωση του ρυθμού απόπτωσης θα οδηγήσει αναπόφευκτα σε νεοπλασία. Είναι γνωστό ότι την αύξηση και την ανάπτυξη των οργανισμών την ρυθμίζουν κάποια σημαντικά γονίδια στα οποία έχουμε ήδη αναφερθεί. Κάποιο ελάττωμα στη δομή των γονιδίων αυτών που μπορεί να γίνει για παράδειγμα από μια μεταλλαγή, αν δεν διορθωθεί αυτή η βλάβη, τότε το κύτταρο θα πρέπει να αυτοκτονήσει. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της διαδικασίας της απόπτωσης. Αν για όποιο δήποτε λόγο το κύτταρο αποτύχει στην απόπειρα αυτοκτονίας τότε θα καταδικαστεί στη αιώνια τιμωρία της ακατάπαυστης μετάδοσης της βλάβης στις επόμενες γενιές κυττάρων που γενιούνται ελαττωματικές, δηλαδή τα κύτταρα οδηγούνται στην κακοήθη εξαλλαγή (12,25)

Τα νεοπλασματικά κύτταρα παρουσιάζουν ελάττωση της ικανότητας να υφίστανται απόπτωση σε μερικά φυσιολογικά ερεθίσματα. Αντίθετα με τα φυσιολογικά κύτταρα που αδυνατούν να ζήσουν στην απουσία ορισμένων απαραίτητων φυσιολογικών παραγόντων, τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι σκληροτράχηλα και μπορούν να αντεπεξέλθουν ακόμα και στις πιο δυσμενείς συνθήκες πράγμα που μπορεί να εξηγήσει απόλυτα την ικανότητα πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων μακράν του οργάνου ή του ιστού καταγωγής των (81).

Ο Folkman και συν. για να αποδείξουν τη σημασία της απόπτωσης σε σχέση με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό έκαναν ένα πείραμα με το οποίο παρατήρησαν ότι οι όγκοι που ανεπτύσσοντο παρουσία αναστολέα της αγγειογένεσης δημιούργησαν μικρές εστίες ενώ οι όγκοι που ανεπτύσσοντο χωρίς τον αναστολέα δημιουργούσαν μεγάλες μάζες και μεταστάσεις. Η διαφορά των μεγάλων μαζών και των μικρών δεν οφειλόταν στον ρυθμό πολλαπλασιασμού που ήταν σχεδόν ίδιος (40%) και στις δύο ομάδες όγκων αλλά στο ρυθμό απόπτωσης που ήταν 4 φορές μεγαλύτερος στην ομάδα των μικρών όγκων (82).

Δεν είναι του παρόντος να εισέλθουμε στους μηχανισμούς της κάθε νόσου χωριστά για να περιγράψουμε την λογική του αυξημένου ή μειωμένου αποπτωτικού ρυθμού αλλά απλα θα αναφερθούν δειγματοληπτικά ωρισμένες οντότητες που απασχολούν την καθημέρα κλινική πράξη. Νόσοι που σχετίζονται με αυξημένο ρυθμό απόπτωσης είναι το AIDS, διάφορες νευροεκφυλιστικές διαταραχές όπως η v.Alzheimer, η v.Parkinson, η v.Huntington, η πλάγια αμυατροφική σκλήρυνση, νόσοι σχετιζόμενοι

με priions, η απλαστική αναιμία, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, η ηπατική βλάβη τοξικής αιτιολογίας κ.λ.π. Νόσοι που σχετίζονται με αναστολή της απόπτωσης είναι τα οξώδη λεμφώματα, τα καρκινώματα με μεταλλαγές στο γονίδιο p53, ορμονοεξαρτώμενοι όγκοι (μαστού, προστάτου, ωοθήκης), ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος, σπειραματονεφρίτιδες, ερπητοϊοί και αδενοϊοί (**25,81,83,84,85,86,87**).

Από τα όσα αναφέρθηκαν μέχρι τώρα γίνεται φανερό στο πόσο χρήσιμη θα ήταν η φαρμακευτική πρόκληση του μηχανισμού της απόπτωσης στις νεοπλασματικές καταστάσεις. Έχει αποδειχθεί ότι πολλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα ανεξάρτητα του ιδιαίτερου μηχανισμού δράσης, επάγουν την απόπτωση μέσω ενός τελικού σταδίου (**88**). Έχει ήδη αναφορά για τον ρόλο των ογκογονιδίων στην διαδικασία της απόπτωσης. Αναφέρουμε ενδεικτικά ξανά την παρουσία του bcl-2 στα νεοπλάσματα κατάσταση που προσδίδει αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά και τα μετατρέπει από κυτταροτοξικά σε κυτταροστατικά και επιτρέπει την επιβίωση τουλάχιστον ενός μέρους των εκ των οποίων μπορεί να προκληθεί υποτροπή (**36,89**). Αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα παρουσιάζουν επίσης κύτταρα με μεταλλαγή του γονιδίου p53 επομένως λειτουργική αδρανοποίηση του. Η ακριβής γνώση της λειτουργικής κατάστασης του γονιδίου p53 συμβάλλει στην εκτίμηση της πιθανότητας ανταπόκρισης ενός όγκου στη θεραπεία αλλά και για τη ρύθμιση της θεραπευτικής δόσης, δεδομένου ότι ψηλές δόσεις χημειοθεραπευτικών μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων της πρωτεΐνης p53. Όταν υπάρχει μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53 δεν είναι δυνατή η πρόκληση απόπτωσης μετά από σοβαρή προκλητή βλάβη του DNA . Επομένως έχουμε και ανεπαρκή ανταπόκριση των νεοπλασμάτων στη θεραπεία και ευκολότερη συσσώρευση μεταλλαγών και μεταβίβαση τους στα θυγατρικά κύτταρα με αποτέλεσμα την ανάπτυξη κυτταρικών κλώνων με επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά (**3,25,90**).

Η ακτινοθεραπεία επίσης αποτελεί μέσον θεραπευτικής πρόκλησης απόπτωσης σε νεοπλασματικά κύτταρα. Οι διαταραχές της δομής του DNA που προκαλούνται από την επίδραση της ακτινοβολίας είναι υπεύθυνες για τον προκαλούμενο κυτταρικό θάνατο ο οποίος σε μεγάλο βαθμό υλοποιείται με την ενεργοποίηση του p53 (**91**). Σε ορισμένους όγκους η ακτινοευαισθησία δεν σχετίζεται πάντα με την κατάσταση του γονιδίου p53 και θα πρέπει να θεωρηθεί ότι υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί ανεξάρτητοι του p53 που μπορούν να προκαλέσουν αντοχή των κυττάρων στην

ακτινοβολία (91).

Τεχνικές ανίχνευσης της απόπτωσης

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές μελέτης των αποπτωτικών κυττάρων και εν γένει της αποπτωτικής διαδικασίας.

Η μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών και των κυτταροπλασματικών φυσαλλίδων γίνεται είτε με το μικροσκόπιο αντιθέσεως φάσεων είτε με scanning ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (1). Με το πρώτο παρατηρούμε την κυτταρική συστολή, την ελίκωση της κυτταρικής μεμβράνης και τον σχηματισμό των φυσαλλίδων ενώ με το δεύτερο παρατηρούμε τους χαρακτηριστικούς μορφολογικούς σχηματισμούς των κυττάρων που υφίστανται απόπτωση όπως η απώλεια των μικρολαχνών και ο σχηματισμός των κυτταροπλασματικών φυσαλλίδων. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι η τεχνική επιλογής για την ταυτοποίηση και μελέτη της απόπτωσης

Τη συγγέντρωση της χρωματίνης και τον κατακερματισμό του πυρήνα τα παρατηρούμε σε ιστολογικές τομές είτε με το μικροσκόπιο αντιθέσεως φάσεων είτε με το οπτικό μικροσκόπιο.

Τον ποσοτικό προσδιορισμό του κυτταρικού DNA, το μέγεθος του κυττάρου και τις πρωτεΐνες μπορούμε να τα πετύχουμε με κυτταρομετρία ροής (92).

Με την βοήθεια Transmission ηλεκτρονικού μικροσκοπίου μπορούμε να ταυτοποιήσουμε χαρακτηριστικά υπερμικροσκοπικά σωματίδια της απόπτωσης σε κύτταρα ή ιστούς όπως άθικτα οργανίδια, κυτταροπλασματικές φυσαλλίδες, συγγεντρωμένη χρωματίνη και τον κατακερματισμένο πυρήνα (1,93). Επίσης με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μπορούμε να παρατηρήσουμε τα αποπτωτικά σωματίδια.

Τον τεμαχισμό του DNA μπορούμε να τον παρατηρήσουμε με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης (9) όπου δίνει χαρακτηριστική εικόνα επιχρίσματος (DNA laddering) λόγω της παρουσίας πολλαπλών μικρών διανουκλεοσωματικών τμημάτων DNA μήκους 185 βάσεων περίπου. Σε περίπτωση που το DNA δεν έχει υποστεί πλήρη διάσπαση αλλά διάσπαση σε μικρότερα από 50 έως 300 Kb τεμάχια, τότε ταυτοποίηση κλασμάτων 50 έως 300 Kb μπορεί να γίνει με ανάστροφη ηλεκτροφόρηση σε gel, με κλασματοποίηση του DNA (94).

Ο προσδιορισμός των αποπτωτικών κυττάρων σε ιστολογικές τομές βασίζεται στην αναγνώριση κυττάρων με πυκνωση ρης χρωματίνης καθώς και τμημάτων πυρήνα που περιβάλλονται από κυτταρόπλασμα γνωστά ως αποπτωτικά σωματίδια όπως ανεφέρθη. Η διάκριση των αποπτωτικών κυττάρων όμως δεν μπορεί να γίνει εύκολα από άλλα κύτταρα με πυκνωτική χρωματίνη, όπως τα κύτταρα που βρίσκονται σε

τελόφαση και επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα της επεξεργασίας του ιστού (26). Επίσης λόγω της γρήγορης διάρκειας του φαινομένου (2-5 λεπτά για την πύκνωση της χρωματίνης και την τμηματοποίηση του κυττάρου, 3 ώρες για την φαγοκυττάρωση και πέψη των αποπτωτικών σωματίων) το ποσοστό των προσδιοριζομένων αποπτωτικών κυττάρων είναι μικρό, γιατί και πρέπει να εκτιμάται όσο το δυνατόν ακριβέστερα (24). Για το λόγο αυτό, πρόσφατα έχει εφαρμοστεί η *in situ* σήμανση του κατακερματισμένου DNA, το οποίο περιλαμβάνει ελεύθερα 3'-OH άκρα, με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα. Η βασική αρχή στηρίζεται στη χρήση του ενζύμου πολυμεράση, το οποίο αρχικά σχηματίζει 5' προεκτάσεις σε κάθε 3'-OH άκρο και στην ακόλουθη κάλυψη των διακένων με ενσωμάτωση σημασμένων μονονουκλεοτιδίων. Τα στάδια αυτά ολοκληρώνονται με ανίχνευση των θέσεων σύνδεσης με συστήματα ανοσοπεροξειδάσης (95). Οι αποπτωτικοί πυρήνες μπορούν να σημανθούν με φθορίζουσες ουσίες ή με ραδιοϊσότοπα (96). Η τεχνική αυτή είναι ιδανική για το κατακερματισμένο DNA και όχι για το RNA.

Σήμερα χρησιμοποιείται η μέθοδος TUNEL όπου ολιγονουκλεοτίδια σημαίνονται με διγοξιγενίνη και ενσωματώνονται στα 3'-OH άκρα με την βοήθεια δεοξυνουκλεοτιδυλικής τρανσφεράσης (TdT) (97,98). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται με ικανοποιητικά αποτελέσματα σε τομές μονιμοποιημένες με φορμόλη και εγκλεισμένες σε παραφίνη. Μπορεί επίσης να εφαρμοστεί σε μορφομετρικά συστήματα αναλυτών εικόνας και κυτταρόμετρα (97,99). Χρειάζεται προσοχή στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και ιδιαίτερα των ψευδώς θετικών που μπορούν να δημιουργηθούν από νέκρωση του ιστού και κατάτμηση του DNA λόγω καθυστερημένης μονιμοποίησης (100). Επίσης κύτταρα που περιέχουν τυπικά αποπτωτικά σωματίδια μπορεί να μην δώσουν θετικό αποτέλεσμα (101). Εκτός από την μέθοδο TUNEL χρησιμοποιείται ακόμα η μέθοδος ISEL (*in situ* end labeling) η οποία χρησιμοποιεί το ένζυμο DNA πολυμεράση I (ή την πολυμεράση Klenow) για την ενσωμάτωση σημασμένων νουκλεοτιδίων στα 3'-OH άκρα δίκλωνων τμημάτων DNA με προέχων 5'-OH άκρο. Η μέθοδος TUNEL υπερέχει τόσο σε ευαισθησία όσο και σε ειδικότητα (102,103). Λεπτομέρειες για την μέθοδο της *in situ* σήμανσης θα αναφερθούν στο ειδικό μέρος της παρούσας μελέτης.

Η μέθοδος αννεξίνης V βασίζεται στην προκαλούμενη ασυμμετρία φωσφολιπιδίων και στην παρουσία φωσφατιδυλσερίνης στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής

μεμβράνης των αποπτωτικών κυττάρων. Η φωσφατιδυλσερίνη έχει την ιδιότητα να συνδέεται με την αντιπηκτική ουσία αννεξίνη V , η οποία έχει κατάλληλα σημανθεί με φθορίζουσα χρωστική και επιτρέπει την ταυτοποίηση των αποπτωτικών κυττάρων. Η μέθοδος αννεξίνης συνδυάζεται με κυτταρομετρία ροής και χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό του ρυθμού απόπτωσης των αιματολογικών παθήσεων (104).

Η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην απόπτωση όπως η ιστική transγλουταμινάση, το TRPM-2, το bcl-2, το P53, το MDM-2, το RP-8 κ.λ.π. μπορεί να διακριθεί με την ταυτοποίηση του μεσολαβητή ή των πρωτεϊνών στα κύτταρα ή τους ιστούς χρησιμοποιώντας πολλές τεχνικές όπως την ανοσοϊστοχημεία ή την έκφραση των πρωτεϊνών και τον *in situ* υβριδισμό.

Επίλογος

Η απόπτωση είναι το αποτέλεσμα ομοιοστατικών λειτουργιών και ρυθμιστικών μηχανισμών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όπου τα θυσιαζόμενα κύτταρα απαλείφονται χωρίς να προκαλούν δυσάρεστες συνέπειες στον οργανισμό. Επειδή η απόπτωση αποτελεί διαδικασία που αφορά φυσιολογικά και νεοπλασματικά κύτταρα, η γνώση των ρυθμιστικών μηχανισμών αποτελεί το κλειδί για την κατανόηση της δράσης των φαρμακευτικών ουσιών για την εφαρμογή νέων θεραπευτικών μεθόδων. Η μεγαλύτερη μέχρι στιγμής ωφέλεια από την μελέτη της απόπτωσης υπήρξε η ανακάλυψη νέων γονιδίων ή νέων ρυθμιστικών-τροποποιητικών επιδράσεων γονιδίων επί του κυτταρικού θανάτου. Η ανάλυση του ογκογονιδίου bcl-2 επέτρεψε τη σημαντική κατανόηση των μηχανισμών καρκινιγένεσεως και παρόμοια ισχύουν για άλλα γονίδια όπως το P53, το WAF, το MDM-2 κ.λ.π. Η μοριακή, βιολογική και γενετική ανάλυση της αποπτώσεως απέδωσε πολλά αντιδραστήρια για πειραματικούς χειρισμούς της κυτταρικής αυτής διαδικασίας και στο άμεσο μέλλον θα μπορεί κανείς, ξεπερνώντας τη μορφολογία, να διερωτηθεί εάν ο φυσιολογικός και ο τυχαίος αποπτωτικός θάνατος συνδέονται, εάν οι μηχανισμοί που ενέχονται στην απόπτωση μπορούν να προκαλέσουν μη αποπτωτικές μορφολογίες και πόση αλληλοεπικάλυψη υφίσταται μεταξύ αποπτώσεως και νεκρώσεως²⁰. Είναι πολύ πιθανό η εντατική έρευνα που διεξάγεται διεθνώς στα ερευνητικά και κλινικά εργαστήρια στο

φαινόμενο του κυτταρικού θανάτου να συμβάλει αποφασιστικά στην ευρύτερη κατανόηση της παθογένειας τόσο της νεοπλασματικής εξαλλαγής όσο και των άλλων παθολογικών εξεργασιών και να επιτρέψει αποφασιστικούς θεραπευτικούς χειρισμούς που θα βασίζονται στους μηχανισμούς της απόπτωσης.

Βιβλιογραφία

- 1) Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death; the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306
- 2) Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis; A different type of cell death. *FASEB J* 1992; 6: 2450-2455.
- 3) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- 4) Rosser B, Gores G. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995; 108: 252-275.
- 5) Fawthrop D, Boobis A, Davis D. Mechanisms of cell death. *Arch Toxicol* 1991; 65: 437-444.
- 6) Kerr J, Searle J, Harmon B, Bishop C. Apoptosis. In: Potten C, ed. *Perspectives on mammalian cell death*. Oxford: Oxford University Press, 1987: 93-128.
- 7) Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984; 142: 67-77.
- 8) Ishak KG, Walker DH, Coetzer JAW, Gardner JJ, Gorelkin L. Viral hemorrhagic fevers with hepatic involvement: pathologic aspects with clinical correlations. In: Popper H, Schaffner F, eds. *Progress in liver diseases, Vol 7*. New York: Grune & Stratton, 1982; 495-515.
- 9) Searle J, Harmon BV, Bishop CJ, Kerr JFR. The significance of cell death by apoptosis in hepatobiliary disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1987; 2: 77-96.
- 10) Dienes HP, Popper H, Arnold W, Lobeck H. Histologic observations in human hepatitis non-A, non-B. *Hepatology* 1982; 2: 562-571.
- 11) Klion FM, Schaffner F. The ultrastructure of acidophilic « Councilman-like » bodies in the liver. *Am J Pathol* 1966; 48: 755-767.
- 12) Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-2026.
- 13) Williams GT, Smith CA, McCarthy NJ, Grimes EA. Apoptosis: final control point in cell biology. *Trends Cell Biol* 1992; 2: 263-267. Arends M, Wyllie A. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991; 32: 223-254.

- 14) Smets LA. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anti-Cancer Drugs* 1994; 5: 3-9.
- 15) Arends M, Wyllie A. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991;32:223-254.
- 16) Trump BF, Berezesky IK, Cowley RA. The cellular and subcellular characteristics of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium. In: Cowley RA, Trump BF (eds) *Pathology of shock, anoxia and ischemia*. Baltimore MD, Williams and Wilkins, 1982: 6-64.
- 17) Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980, 284: 555-556.
- 18) Fesus L, Thomazy V, Falus A. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett* 1987; 224: 104-108.
- 19) McCabe MJ, Nicotera P, Orrenius S. Calcium-dependent cell death. Role of the endonuclease, protein kinase C, and chromatin conformation. *Ann NY Acad Sci* 1992; 663: 269-278.
- 20) Ray SD, Kamendulis LM, Gurule MW, Yorkin RD, Corcoran GB. Ca²⁺ antagonists inhibit DNA fragmentation and toxic cell death induced by acetaminophen. *FASEB J* 1993; 7: 453-463.
- 21) Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 1995; 82: 349-352.
- 22) Duvall E, Wyllie AH, Currie AR. Death and the cell. *Immunol Today* 1986, 7: 115-119.
- 23) Compton MM, Cidlowski JA. Rapid in vivo effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 1986, 118: 38-45.
- 24) Bursch W, Paffe S, Putz B, Barthel G, Schulte-Hermann R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 1990; 11:847-853.
- 25) Bosman FT, Visser BC, van Oeveren J. Apoptosis: Pathophysiology of programmed cell death. *Path Res Pract* 1996;192:676-683.
- 26) Migheli A, Cavala P, Marino S et al. A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end labeling of DNA strand breaks. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53:606-616.

- 27) Gerald MC. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
- 28) Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990, 384: 334-336.
- 29) Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce C. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985, 228: 1440-1443.
- 30) Zhao M, Zhang NX, Economou M et al. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in liver lesions: bcl-2 protein is expressed in hepatocellular carcinomas but not in liver cell dysplasia. *Histopathology* 1994;25:237-245.
- 31) Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124: 1-6.
- 32) Charlotte F, L'Hermine A, Martin N, Geleyn Y, Nollet M, Gaulard P, Zafrani ES. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver. *Am J Pathol* 1994; 144: 460-465.
- 33) Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Miyashita T, Wang GH, Reed JC. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of bax, a dominant inhibitor of bcl-2. *Am J Pathol* 1994, 145: 1323-1336.
- 34) Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619.
- 35) Reed J. Bcl-2 and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6.
- 36) Reed JC. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol* 1995;7:541-546.
- 37) Hikim APS, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 1995, 136:2770-2775.
- 38) Clark AR, Gledhill S, Hooper ML. P53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. *Oncogene* 1994;9:1767-1773.
- 39) Strasser A, Harris AW, Jacks T. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by bcl-2. *Cell* 1994;79:329-339.

- 40) Gotz C, Montenarh M. DNA damage , DNA repair, and apoptosis. *Int J Oncology* 1995;1129-1135
- 41) Caelles C , Helmborg A, Karin M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 1994;370:220-223
- 42) Haupt Y , Rowan S, Shaulian E et al. Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev* 1995;9:2170-2183.
- 43) El-Deiry WS , Tokino T, Velculescu VE et al. Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817-825.
- 44) Xiong Y , Hannon GJ, Zhang H et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993;366:701-704..
- 45) El-Deiry WS , Harper JW, Oconnor PM, Velculescu VE et al. Waf1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994;54:1169-74.
- 46) Argarwal ML et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8493-8497.
- 47) Fan S , El Deiry WS, Bael et al. p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells DNA damaging agents. *Cancer Res* 1994;54:5824-5830.
- 48) Chen CY , Oliner JD, Zhan Q et al. Interactions between p53 and mdm-2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*;91:2684-2688.
- 49) Miyashita T , Krajewska M, Wang HG et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994;9:1799-1805.
- 50) Fakharzadeh SS , Trusko SP, George DL. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified mouse tumor cell line. *EMBO J* 1991;10:1565-1569.
- 51) Oliner JD , Kinzler KW, Meltzer PS et al. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992;358:80-83.
- 52) Ladanyi M , Cha C, Lewis R, Jhanwar SC et al. Mdm-2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Res* 1993;53:16-18.
- 53) Leach FS , Tokino T, Burrell M et al. p53 mutation and mdm-2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1993;53:2231-2234.
- 54) Cardon-Cardo C et al. *Cancer Res* 1993;54:794-799.
- 55) Landers JE , Haines DS, Strauss JF, et al. Enhanced translation: a novel

- mechanism of mdm-2 oncogene overexpression identified human tumor cells. *Oncogene* 1994;9:2745-2750.
- 56) Momand JE , Zambetti GP, Olson DC et al. The mdm-2 oncogene products forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation . *Cell* 1992;69:1237-1245.
- 57) Barak Y , Juven T, Haffner R, Oren M. Mdm-2 expression is induced by wild type p53 protein activity. *EMBO J* 1993;12:461-468.
- 58) Oliner JD , Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J et al. Oncoprotein mdm-2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 1993;362:857-860.
- 59) De-Oca Luna RM , Wagner DS, Lozano G. Rescue of early embryonic lethality in mdm-2-deficient mice by absence of p53 . *Nature* 1995;378:203-206.
- 60) Jones SN , Roe AE, Donehower LA, Bradley A. Rescue of embryonic lethality in mdm-2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 1995;378:206-208.
- 61) Martin K , Trouche D, Hagemeyer C, Stensén TS et al. Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by mdm-2 oncoprotein. *Nature* 1995;375:691-694.
- 62) Xiao ZX , Chen J, Levine AJ et al. Interaction between retinoblastoma protein and the oncoprotein mdm-2. *Nature* 1995;375:694-698.
- 63) El Deiry WS , Tokino T, Waldman T et al. Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1995;55:2910-2919.
- 64) Harper JW et al. *Cell* 1993;75:805-816.
- 65) Gu Y et al. *Nature* 1993;336:707-710.
- 66) Xiong Y et al. *Cell* 1992;71:505-514.
- 67) Xiong Y , Zhang H, Beach D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev* 1993;7:1572-1583.
- 68) Agarwal ML Agarwal A, Taylor WR et al. p53 controls both G2/M and G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8493-8497.
- 69) Michieli P , Chedid M, Lin D, Pierce JH et al. Induction of Waf1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* 1994;54:3386-3395.
- 70) Elbendary A , Berchuck A, Davis P et al. Transforming growth factor beta 1 can

- induce CIP1/WAF1 expression independent of pathway in ovarian cancer cells .
Cell Growth Diff 1994;5:1301-1307.
- 71) Chen YQ et al. Int J Oncology 1995;7:889-893.
 - 72) Deng C , Zhang P, Harper JW et al. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. Cell 1995;82:675-684.
 - 73) Waldman T , p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. Cancer Res 1995;55:5187-5190.
 - 74) Li R , Waga S, Hannon GJ, Beach D et al. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. Nature 1994;371:534-537..
 - 75) Noda A et al . Expl Cell Res 1994;211:90-98
 - 76) Cohen JJ. Apoptosis. Immunol Today 1993, 14: 126-130.
 - 77) Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocytic recognition of cells undergoing apoptosis. Immunol Today 1993, 14: 131-136.
 - 78) Blackwood EM, Eisenman RN. Max: a helixloop –helix zipper protein that forms a sequence –specific DNA-binding complex with Myc. Sciences 1991;251:1211-1217,
 - 79) Evan GL, Wyllie AH, Gilbert CS et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. Cell1992;69:119-128.
 - 80) Kontogeorgos G, Kovacs K. Apoptosis in endocrine glands. Endocr Pathol 1995;6:257-265.
 - 81) Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995;267:1456-1462.
 - 82) Folkman J. Angiogenesis inhibitors generated by tumors. Mol Med 1995;1:120-122.
 - 83) Henderson S, Rowe M, Gregory C et al. Induction of bcl2 expression by Epstein Barr virus latent membrane protein protects B cells from programmed cell death. Cell 1991;1107-1115.
 - 84) Henderson S, Huen D, Rowe M et al. EBV coded BHRF1 protein, a viral homologue of bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. Proc Natl Acad Sci USA ;90:8479-8483.
 - 85) Lane S, Wells M. Human papillomaviruses, p53, and cervical neoplasia. J

- Pathol 1994;172:299-300.
- 86) Westerndrop M, Frank O, Ochsenbauer C et al. Sensitization of T cells to CD-95-mediated apoptosis by HIV-1 tat and gp120. *Nature* 1995;375:497-500.
 - 87) Loo DT, Copani A, Pike CJ et al. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7951-7955.
 - 88) Barry BA, Benhke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin and other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 1990;40:2353-2362.
 - 89) Miyashita T, Reed C. Bcl-2 gene transfer increase relative resistance of S49.1 and WEH17.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapy drugs. *Cancer Res* 1992;52:5407-5411.
 - 90) Lowe SW. Cancer therapy and p53. *Curr opin Oncol* 1995;7:547-553
Debbas M, White E. Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A which is inhibited by E1B. *Genes Dev* 1993; 7: 546-554.
 - 91) Strasser A, Harris AW, Jacks T et al. DNA damage can induce apoptosis in independent lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by bcl-2. *Cell* 1994;79:329-339.
 - 92) Popper H. Hepatocellular degeneration and death. In: Arias I, Jakoby W, Popper H, Schacter D, Shafritz D, eds. *The liver: biology and pathobiology*. Ed 2. New York: Raven Press, 1988: 1087-1184.
 - 93) Debbas M, White E. Wild type p53 mediates apoptosis by E1A which is inhibited by E1B. *Genes Dev* 1993;7:546-554.
 - 94) Bursch W, Oberhammer F, Jirtle RL, Askari M, Sedivy R, Grasl-Kraupp B, Purchio A, et al. Transforming growth factor- β 1 as a signal for induction of cell death by apoptosis. *Br J Cancer* 1993; 67: 531-536.
 - 95) Gavrieli Y, Scherman Y, Ban-Seasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992, 119: 493-501.
 - 96) Crompton T, Peitch MC, McDonald HR, Tschopp J. Propidium iodide staining correlates with the extent of DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, 183: 532-537.
 - 97) Wijman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van De Velde CJH, Cornelisse CJ, Van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end labelling of

- fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993, 41: 7-12.
- 98) Sasano H, Imatani A, Souichirou S, Suzuki T, Naguara H. Cell proliferation and apoptosis in normal and pathologic human adrenals. *Mod Pathol* 1995, 8: 11-17.
- 99) Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992, 13: 798-808.
- 100) Sasano H. In situ end labelling and its applications to the study of endocrine disease: How can be study programmed cell death in surgical pathology means? *Endocr Pathol* 1995, 6: 87-89.
- 101) Dowsett M, Jonston SRD, Newby J, Golding M, Sacks N, Smith IE. Mechanisms of hormone response: a role for apoptosis. *Endocr Relat Cancer* 1995, 2: 3-11.
- 102) Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F et al. In situ apoptotic cell labelling by TUNEL method. Improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem* 1996;44:959-968.
- 103) Mundle S, Gao XZ, Khani S et al. Two in situ labeling techniques reveal different patterns of DNA fragmentation during spontaneous apoptosis in vivo and induced apoptosis in vitro. *Anticancer res* 1995;15:1895-1904.
- 104) Koopman G, Reuterlingsperger CPM, Kuijten GAM et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84:1415-1420.
- 105) Martin SJ, Amarante-Mendes GP, Shi E et al. The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/Ced-3 family protease, Cpp32, via a novel two step mechanism. *EMBO J* 1996;15:2407-2416. Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am J Pathol* 1995; 146: 16-19.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΕΣ

Εισαγωγή

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, δηλαδή ο θάνατος από την απόπτωση, είναι σύνηθες φαινόμενο στις ανθρώπινες ηπατοπάθειες και συνεισφέρει στη φλεγμονή, στην οργανική δυσλειτουργία και πιθανόν στην ινωγένεση.

Οι πρωτεάσες που είναι γνωστές με το όνομα κασπάσες παίζουν ένα κεντρικό ρόλο στην εκτέλεση του προγράμματος κυτταρικού θανάτου και γιαυτό αποτελούν ελκυστικούς φαρμακολογικούς στόχους στην αναστολή της απόπτωσης.

Η ενεργοποίηση των κασπασών στην απόπτωση συμβαίνει με ένα από τους δύο μηχανισμούς: 1) ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου του κυτταρικού υποστρώματος και 2) με τις οδούς του ενδοκυττάριου στρες, όπου προκαλούν δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων.

Η αναστολή της απόπτωσης στο ήπαρ, θα μπορούσε να βοηθήσει στη βελτίωση οξέων και χρόνιων φλεγμονωδών νόσων, δεδομένου ότι η επαγωγή της απόπτωσης σε αυτοαντιδραστικούς T-κυτταρικούς κλώνους θα μπορούσε να ωφελήσει τις αυτοάνοσες ηπατοπάθειες. Επιλεκτική επαγωγή της απόπτωσης σε κακοήθη κύτταρα αποτελεί στρατηγική για τη θεραπεία των πρωτοπαθών νεοπλασμάτων του ήπατος.

Όλα τα ανωτέρω, αποτελούν ενδιαφέροντα σημεία για τα οποία η κατανόηση της απόπτωσης και η συμβολή της στις ηπατοπάθειες, αποτελεί αναγκαιότητα για τον σύγχρονο κλινικό και εργαστηριακό επιστήμονα.

Μορφολογική και βιοχημική άποψη για την απόπτωση στο ήπαρ

Αν και το γενικό πλαίσιο των μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών της απόπτωσης έχει περιγραφεί λεπτομερώς στο προηγούμενο κεφάλαιο, η ειδική περιγραφή των μεταβολών που επισυμβαίνουν στον ηπατικό ιστό αποτελούν αναγκαιότητα. Η απόπτωση είναι ένα γρήγορο φαινόμενο. Στο ήπαρ των ποντικών, η διάρκεια της απόπτωσης στα ηπατοκύτταρα έχει υπολογιστεί ότι είναι περίπου τρεις

ώρες **(1)**. Σε αντίθεση με την νέκρωση, η απόπτωση είναι εμφανής σε ένα και μόνο κύτταρο, και μερικές φορές είναι πολύ δύσκολό να διαπιστωθεί το γεγονός στο κύτταρο **(2)**. Επιπλέον το πρώτο βήμα του φαινομένου είναι πολύ δύσκολο να αναλυθεί στο κοινό οπτικό μικροσκόπιο **(2)**. Προς το παρόν το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι η τεχνική επιλογής για την αναγνώριση και τη μελέτη των διαφόρων σταδίων της απόπτωσης, είναι όμως χρονοβόρα τεχνική και δύσκολη για να εφαρμοστεί σαν ρουτίνα. Τελευταία έχουν εισαχθεί για τη μελέτη της απόπτωσης, νέες μορφολογικές μέθοδοι, που βασίζονται στην μοριακή βιολογία **(3,4)**. Παρόλα αυτά όμως, συζητείται η δυσκολία για τη διάκριση της απόπτωσης από τη νέκρωση **(5,6)**.

Όλες οι παραπάνω σημειώσεις ίσως εξηγούν το γιατί στερούμαστε από ακριβέστερες και πιο συγκεκριμένες πληροφορίες για την απόπτωση στο κανονικό ήπαρ των ενηλίκων. Παρόλα αυτά γνωρίζουμε ότι η απόπτωση συμβαίνει κυρίως στα ηπατοκύτταρα που βρίσκονται γύρω από τις κεντρολοβιακές φλέβες. Ο Benedetti et al **(7)**, χρησιμοποιώντας μορφομετρικές μεθόδους, παρατήρησε ότι οι πρώτοι δύο στοίχοι ηπατοκυττάρων που βρίσκονται γύρω από τις κεντρολοβιακές φλέβες περιέχουν το 80% και το 95% των αποπτωτικών σωματίων αντίστοιχα, στο ανθρώπινο ήπαρ και στο ήπαρ των ποντικών, ενώ τα αποπτωτικά κύτταρα μειώνονται διαδοχικά μετά τον δεύτερο στοίχο ηπατοκυττάρων ενώ λείπουν τελείως ή είναι πολύ σπάνια μετά τον πέμπτο στοίχο. Οι πληροφορίες αυτές επιβεβαιώθηκαν πρόσφατα στο ήπαρ των ποντικών **(8)**.

Η παρουσία του μεγαλύτερου αριθμού ηπατοκυττάρων που υφίστανται απόπτωση στη ζώνη 3, υποστηρίζει άμεσα στη ηπατική θεωρία «ποταμό» που προτείνει ότι τα ηπατοκύτταρα αποδημούν από την περιπυλαία ζώνη προς την κεντρο-λοβιακή ζώνη, με τα γηραιότερα ηπατοκύτταρα να τοποθετούνται στην δεύτερη. Παρόλα αυτά, η παρουσία της απόπτωσης στη ζώνη 3, δεν σημαίνει ότι τα ηπατοκύτταρα της ζώνης αυτής είναι τα γηραιότερα αφού η απόπτωση δεν μπορεί να εξομοιωθεί με την γήρανση, ένα άλλο φαινόμενο που χαρακτηρίζεται τουλάχιστον in vitro από την απώλεια της ικανότητας της κυτταρικής διαίρεσης **(9)**. Επιπλέον όπως αναφέρουν και άλλοι συγγραφείς η απόπτωση μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε ζώνη του ηπατικού λοβίου **(10)**. Σε οποιαδήποτε περίπτωση πάντως, η απόπτωση, σε φυσιολογικές συνθήκες, θεωρείται ότι είναι μια διαδικασία ηπατοκυτταρικής ανανέωσης **(11)**. Εάν το ποσοστό των αποπτωτικών ηπατοκυττάρων είναι πολύ

χαμηλό (1/2000) (12), θεωρείται επαρκές για να ισορροπήσει με το χαμηλό ρυθμό της μίτωσης στο φυσιολογικό ήπαρ. Σε αντίθεση με τα ηπατοκύτταρα, η συμπεριφορά των άλλων ηπατικών κυττάρων στην εκτίμηση της απόπτωσης παραμένει λιγότερο διευκρινισμένη. Η απόπτωση συμβαίνει πιθανόν, όπως θα περιγραφεί παρακάτω και στα κύτταρα των χοληφόρων, και στα κύτταρα των κολποειδών στο ήπαρ των ενηλίκων. Εν τούτοις γνωρίζουμε ότι η απόπτωση συμβαίνει στο ανθρώπινο εμβρυϊκό ήπαρ, ειδικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ενδοηπατικών χοληφόρων και των ηπατοκυττάρων **(13)** και ότι εξαρτάται από την έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν την απόπτωση για τα οποία έγινε εκτενής αναφορά στο κεφάλαιο 3.

Η απόπτωση αρχίζει με δύο κυτταρικές τροποποιήσεις που εμφανίζονται στους πυρήνες και το κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων. Γενικά, οι πυρηνικές αλλαγές εμφανίζονται πρώτες και χαρακτηρίζονται από την συγκέντρωση της χρωματίνης η οποία αντί με ότι κανονικά συμβαίνει, κατανέμεται κατά μήκος της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, αποτελώντας ένα λεπτό, πλήρη ή σχεδόν πλήρη δακτύλιο στη περιφέρεια του πυρήνα. Αυτή η πολύ ενδιαφέρουσα μορφολογική αλλαγή η οποία αποτελεί το πιο χαρακτηριστικό μορφολογικό στοιχείο της απόπτωσης **(14)**, συνοδεύεται από άλλες αλλαγές στον πυρήνα οι οποίες μεταβάλλουν τη δομή πολλών πυρηνικών συστατικών **(14)**. Την ίδια στιγμή τα κυτταροπλασματικά οργανίδια και κυρίως τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο, συναθροίζονται, αλλά παραμένουν άθικτα. Σαν αποτέλεσμα όλων αυτών των κυτταροπλασματικών μετατροπών, το κύτταρο γίνεται σφαιρικό και εμφανίζεται κάποια διαστολή των μεσοκυττάρων διαστημάτων που συνοδεύεται από μεταβολή των μεσοκυττάρων συνάψεων. Στη δεύτερη φάση, η απόπτωση χαρακτηρίζεται από την κλασματοποίηση του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, με κάποια γενικότερη ρίκνωση του κυττάρου μαζί με το σχηματισμό ογκωδών εκβλαστήσεων που περιέχουν μορφολογικά τουλάχιστον άθικτα οργανίδια. Αυτή η συστολή χαρακτηρίζεται από συμπύκνωση όλων των οργανιδίων τα οποία δύσκολα μπορούν να αναγνωριστούν. Η πυρηνική δομή γίνεται πολύ ακανόνιστη όταν συμβούν έντονες αλλαγές στον κυτταροσκελετό και στην κυτταρική μεμβράνη **(14)**. Στη φάση αυτή το αλλοιωμένο ηπατοκύτταρο αποσπάται από τα άλλα κύτταρα. Στην τρίτη φάση το συμπυκνωμένο ηπατοκύτταρο ή τα κλάσματα του απομονώνονται από τα άλλα επιθηλιακά κύτταρα και φαγοκυτταρώνονται είτε από τα κύτταρα του Kupffer είτε από γειτονικά ηπατοκύτταρα **(15)**. Είναι πολύ σημαντικό να σημειωθεί ότι μετά την

απόπτωση δεν παρατηρείται καμία φλεγμονώδης αντίδραση ούτε κάποιο σημείο ινώσεως μετά τον κυτταρικό θάνατο. Όλοι αυτοί οι μορφολογικοί προσανατολισμοί κάνουν την απόπτωση πολύ διαφορετικό πράγμα από την νέκρωση όπου το κύτταρο διαστέλλεται, τα οργανίδια αλλοιώνονται και καταστρέφονται και που χαρακτηρίζεται από φλεγμονώδη αντίδραση και για κάποιο διάστημα από την ανάπτυξη ίνωσης μαζί με τροποποίηση της αρχιτεκτονικής του ήπατος.

Βιοχημικοί προσανατολισμοί

Οι βιοχημικές αλλαγές στην απόπτωση μελετήθηκαν σε άλλα κύτταρα εκτός των ηπατοκυττάρων και ειδικά στα T-λεμφοκύτταρα (16). Πρόσφατες σχετικά μελέτες επιβεβαιώνουν ότι πολλές βιοχημικές αλλαγές που καταγράφονται στα κύτταρα αυτά, παρουσιάζονται και στα ηπατικά κύτταρα. Σε αντίθεση με την νέκρωση και παρά τις μορφολογικές αλλαγές του πυρήνα, η απόπτωση είναι ένα ενεργητικό κυτταρικό φαινόμενο που χαρακτηρίζεται από αύξηση του RNA και της πρωτεϊνικής σύνθεσης (17). Αυτό το κεφαλαιώδους σημασίας γεγονός είναι πολύ καλά τεκμηριωμένο αν και η αλληλουχία αυτών των γεγονότων είναι ακόμα υπό συζήτηση (18). Η αυξημένη σύνθεση ξεκινά με την αύξηση της δραστηριότητας διαφόρων πυρηνικών και κυτταροπλασματικών ενζύμων. Ένα από αυτά τα ένζυμα είναι και η ενδονουκλεάση που εξαρτάται από το ασβέστιο και το μαγνήσιο, της οποίας η ταυτοποίηση είναι ακόμα αβέβαιη. Έχουν προταθεί διάφοροι υποψήφιοι όπως η NUC 18, DNase I, DNase II (19), αλλά άλλες επίσης έχουν ταυτοποιηθεί στους πυρήνες ηπατικών κυττάρων ποντικών (20) και η φύση των ενδονουκλεασών που είναι υπεύθυνες για τις πυρηνικές αλλαγές δεν είναι γνωστή αυτή τη στιγμή. Ένα άλλο ένζυμο, είναι η κυτταροπλασματική τρανσγλουταμινάση που βρίσκεται στο ήπαρ (21) και εξαρτάται επίσης από το ασβέστιο. Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια της απόπτωσης η αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου είναι πολύ συχνή (22,23). Πρόσφατα έχει εστιαστεί το ενδιαφέρον σε μια τρίτη ομάδα ενζύμων που αποτελείται από πρωτεάσες, ειδικά εκείνη της οικογένειας της interleukin-1β converting enzyme (24), η οποία δρα στις πυρηνικές πρωτεΐνες. Αυτές οι πρωτεάσες που ονομάστηκαν κασπάσες αναπτύχθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Σε αυτό το σημείο θα περιγραφεί ο πιθανός μηχανισμός δράσης των (25). Οι κασπάσες συντίθενται σαν ζυμογόνα. Παρόλα αυτά όμως για την ενεργοποίηση των προαποπτωτικών οδών τα ένζυμα αυτά ενεργοποιούνται πρωτεολυτικά. Η ειδικότητα

του υποστρώματος είναι ειδική για τις πρωτεάσες αυτές, με τον τρόπο που προσκολλώνται στην καρβοξυλική πλευρά του ασπαρτικού οξέος. Η προσκόλληση αυτή είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των κασπάσων. Έχουν κλωνοποιηθεί πάνω από 14 κασπάσες. Τα μεγάλα pro-domain όπως στις κασπάσες 2,8,9 και 10 αποτελούν τις αρχικές κασπάσες (initiator). Αντίθετα τα μικρά pro-domain όπως στις κασπάσες 3,6, και 7 αποτελούν τα υπεύθυνα τμήματα για την εκτέλεση του προγράμματος του κυτταρικού θανάτου. Οι επαγωγείς (initiators) κασπάσες προσκολλώνται και ενεργοποιούν τις κασπάσες εκτελεστές. Το κυτταρικό υπόστρωμα θανάτου για τις πρωτεάσες αυτές, παραμένει αδιευκρίνιστο. Η αναστολή των πρωτεασών αυτών, συχνά καταργεί την απόπτωση σε πολλά μοντέλα ηπατικής βλάβης και γι' αυτό οι πρωτεάσες αυτές αποτελούν ελκυστικούς φαρμακολογικούς στόχους για την αναστολή της απόπτωσης.

Έχουν ταυτοποιηθεί δύο γενικοί δρόμοι που ενεργοποιούν τις κασπάσες: 1) η απόπτωση που αρχίζει από την οικογένεια των υποδοχέων θανάτου και 2) κυτταρικός θάνατος που αρχίζει από σήματα ενδοκυττάριου στρες (26). Με τον πρώτο δρόμο η απόπτωση αρχίζει με τον υποδοχέα Fas, όπου με την ενεργοποίηση του από την ολιγομερισμό του, καθιστά το FADD (Fas associated death domain) και την προκασπάση 8 ικανές να συνδεθούν με το σύμπλεγμα των υποδοχέων. Το σύμπλεγμα αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης 8. Η κασπάση 8 στη συνέχεια ενεργοποιεί άμεσα ή έμμεσα δια οδών των μιτοχονδρίων την κασπάση 3 που καταλήγει τελικά σε απόπτωση.

Με το δεύτερο δρόμο οι προαποπτωτικές πρωτείνες της οικογένειας bcl-2 (bax, bid, bim, blk, bad, bak, bok e.t.c) προκαλούν απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια το οποίο ενεργοποιεί τον Araf1 (apoptosis activating factor) μέσα στο κυτταρόπλασμα. Ο Araf1 ενεργοποιεί την κασπάση 9 προκαλώντας τελικά απόπτωση.

Η αύξηση της δραστηριότητας των ενδονουκλεασών και των προτεασών συνοδεύεται από μια μυστηριώδη τροποποίηση του πυρηνικού DNA, αλλά όχι του μιτοχονδριακού, το οποίο στην αρχή τεμαχίζεται σε κλάματα των 50-300 kbp (112), στη συνέχεια σε ολιγονουκλεοσώματα και νουκλεοσώματα των 180 bp, δίνοντας μια χαρακτηριστική μορφή στην ηλεκτροφόρηση (ladder pattern) (16). Αυτή η τελευταία αλλαγή περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Wyllie(16) σε αποπτωτικά θυμοκύτταρα, που παρουσίαζαν τους βιοχημικούς χαρακτήρες της απόπτωσης (27).

Η κυτταροπλασματική τρανσγλουταμινάση δρα δημιουργώντας πρωτεϊνικές γέφυρες ανάμεσα στη γλουταμίνη και την λυσίνη (21), μια σχέση η οποία αποτελεί την μοριακή βάση για την συνάθροιση των οργανιδίων, την συμπύκνωση του κυτταροπλάσματος και τη συστολή του κυττάρου εν γένει (28). Εν τούτοις η εγκατάσταση της τρανσγλουταμινάσης στο κανονικό ηπατοκύτταρο δεν οδηγεί απαραίτητα σε απόπτωση (29). Οι αλλαγές στην ενζυμική δραστηριότητα συνοδεύονται ακόμα από κάποιες τροποποιήσεις ειδικά στο cAMP (30) και την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), η οποία άρχισε να ερευνάται στα αποπτωτικά ηπατοκύτταρα (31-33). Εμφανέστατες βιοχημικές αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη συμβαίνουν επίσης μαζί με τις μορφολογικές αλλαγές (15). Οι Fesus et al (34) παρατήρησε ότι τα αποπτωτικά ηπατοκύτταρα των ποντικών γίνονται αδιάλυτα σε διάφορα απορρυπαντικά (detergents) , εξαιτίας του σχηματισμού κερατινίου περιτυλίγματος όμοιου με αυτό που σχηματίζεται με την επίδραση της τρανσγλουταμινάσης των κερατινοκυττάρων στην επιδερμίδα. Η ειδική αναγνώριση των αποπτωτικών σωματίων από τα μακροφάγα οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το βιοχημικό περιεχόμενο της κυτταρικής μεμβράνης είναι τροποποιημένο. Έχουν επίσης διαπιστωθεί αλλαγές στους υδατάνθρακες και στη λιπιδική μεμβράνη (35), και οι υποδοχείς ασιαλογλυκοπρωτεΐνης των ηπατοκυττάρων μπορούν να δράσουν στην κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων από το ήπαρ (36). Στα κύτταρα Kupffer, η δραστηριότητα των υποδοχέων γαλακτόζης αυξάνεται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης πριν από την αύξηση της δραστηριότητας των υποδοχέων ασιαλογλυκοπρωτεΐνης (37).

Τέλος η απόπτωση χαρακτηρίζεται από τις αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που είναι ικανά να προάγουν ή να αναστείλουν την απόπτωση. Για το θέμα αυτό έγινε εκτενής αναφορά στο κεφάλαιο 3. Παρακάτω θα γίνει ειδικός σχολιασμός κάποιων από αυτά τα γονίδια που αφορά τον ηπατικό ιστό.

Η **bcl-2** πρωτεΐνη δεν βρέθηκε στο ήπαρ (38) αν και πρόσφατες ανοσοιστοχημικές τεχνικές έδειξαν ότι το **bcl-2** βρίσκεται στα πυλαία χοληφόρα και τα μικρά στα ενδολοβιακά χοληφόρα (39,40), αλλά όχι στα ηπατοκύτταρα (39,40). Ο Krajewski et al (41) προσπάθησε να δικαιολογήσει το γεγονός υποστηρίζοντας ότι η πρωτεΐνη **bax** που σχετίζεται με την **bcl-2** και αποτελεί ένα ισχυρό αναστολέα της (42), βρίσκεται στα ηπατοκύτταρα. Η **bax** είναι γνωστό ότι σχηματίζει ετεροδιμερή **bcl-**

2/bax in vivo (42). Η υπεροχή της bax εις βάρος της bcl-2 προάγει την απόπτωση ενώ αναστέλλεται η απόπτωση σε υπεροχή της bcl-2.

Το σύμπλεγμα **Fas ligand/Fas-*apo1*** σχηματίζεται από δύο μεμβρανικές πρωτεΐνες, το Fas ligand, μια γλυκοπρωτεΐνη 40kDa η οποία βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των λεμφοκυττάρων και την Fas-*apo1* (CD 95) γλυκοπρωτεΐνη από 45 kDa που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη διαφόρων κυττάρων, ειδικά στα ηπατοκύτταρα στα οποία αφθονεί. Το Fas ligand ανήκει στην οικογένεια του παράγοντα νέκρωσης των όγκων, ενώ το Fas-*apo1* ανήκει στους υποδοχείς του TNF (43). Το παραπάνω σύμπλεγμα μελετήθηκε περισσότερο στην ανοσολογία εξαιτίας του ρόλου που έχει στη κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από τα T-λεμφοκύτταρα (43). Η χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά του Fas-*apo1* προκαλεί μαζική απόπτωση των ηπατοκυττάρων στα ποντίκια η οποία μοιάζει με την κεραυνοβόλο ηπατίτιδα (44), γεγονός που υποστηρίζει ότι η κεραυνοβόλος ηπατίτιδα στους ανθρώπους πρέπει να εξαρτάται από το Fas (43). In vivo έχει δειχτεί ότι anti-Fas αντισώματα που χορηγήθηκαν σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων ποντικών, προκάλεσαν κυτταρικό θάνατο από απόπτωση (33,45).

Το Fas-*apo1* βρέθηκε επίσης σε μεγάλες ποσότητες στις κυτταρικές μεμβράνες σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα σε ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα C (46). Εδείχθη ακόμα ότι η έκφραση του Fas-ligand είναι εκτεταμένη στα μονοπύρρηνα κύτταρα που διηθούν το ήπαρ σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (47), μια παρατήρηση που υποστηρίζει ότι το σύμπλεγμα Fas-ligand/Fas-*apo1* μπορεί να παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στις ανθρώπινες χρόνιες ηπατοπάθειες. Αξίζει να σημειωθεί ξανά ότι η απόπτωση αναγνωρίζεται σε περιοχές με piecemeal νέκρωση κατά τη διάρκεια της χρόνιας ενεργού ηπατίτιδας (48). Τα γονίδια που ελέγχουν τις πρωτεΐνες του συμπλέγματος έχουν ταυτοποιηθεί (43).

Απόπτωση στην αλκοολική νόσο του ήπατος

Η απόπτωση στην αλκοολική νόσο του ήπατος συμβαίνει κυρίως στα περιπυλαία κύτταρα. Ενώ στο φυσιολογικό ήπαρ η απόπτωση των ηπατοκυττάρων παρατηρείται στους δύο πρώτους στοίχους ηπατοκυττάρων γύρω από τις πυλαίες φλέβες (7,8), σε ζώα που εκτέθηκαν σε τοξικούς παράγοντες η απόπτωση παρατηρείται μετά τον

πέμπτο η τον έβδομο στοιχείο κυττάρων **(8,49)**. Οι αλλαγές που παρατηρούνται χαρακτηρίζονται επίσης από κάποια αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού **(50)** πράγμα που σημαίνει ότι η ηπατοκυτταρική αναγέννηση διατηρείται κατά τη διάρκεια της χρόνιας χρήσης αλκοόλ, και ότι η κυτταρική αναγέννηση αντισταθμίζει την απώλεια των κυττάρων. Ο Goldin et al **(8)** παρατήρησε ότι μετά την άρση της χορήγησης αλκοόλ σε ποντίκια η κατάσταση επιστρέφει στο κανονικό μετά από πολύ μικρή διάρκεια.

Ο Yasoub et al **(51)** παρατήρησαν ότι η απόπτωση συμβαίνει σε μεγάλο βαθμό σε αλκοολικά ποντίκια μόνο κάτω από ορισμένες διατροφικές καταστάσεις και σε παρουσία ηπατικής βλάβης.

Στην αλκοολική νόσο του ήπατος η απόπτωση παρουσιάζεται με τη μορφή των οξύφιλων κοκκίων. Παράλληλα φαίνεται ότι τα σωμάτια του Mallory και η απόπτωση στα ηπατοκύτταρα, εμφανίζονται μαζί, πράγμα που σημαίνει ότι αυτά τα κύτταρα απομακρύνονται από τον ηπατικό ιστό με την απόπτωση **(52)**. Διάφοροι άλλοι μηχανισμοί εμπλέκονται επίσης με την απόπτωση στην αλκοολική νόσο του ήπατος. Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο η αλκοολική νόσος συνδέεται με το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την παραγωγή ενδιάμεσων παραγώγων οξυγόνου. Ένας σημαντικός μηχανισμός για το σχηματισμό ενεργών ενδιάμεσων ενώσεων οξυγόνου και λιπιδικών υπεροξειδίων φαίνεται ότι είναι η επαγωγή του κυτοχρώματος P4502E1 (CY2E1) που εκφράζεται πολύ έντονα στο ήπαρ **(53)**. Η επαρκής δημιουργία ενδιάμεσων ενώσεων οξυγόνου από αυτό το ενζυμικό σύστημα μπορεί να προκαλέσει απόπτωση των ηπατοκυττάρων εξαιτίας της οξειδωτικής βλάβης των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA.

Το Fas και Fas-ligand εμπλέκονται επίσης στους μηχανισμούς απόπτωσης στην αλκοολική νόσο του ήπατος. Αν και τα ηπατοκύτταρα εκφράζουν το Fas δεν εκφράζουν κανονικά το Fas-ligand ως συνδυασμένη έκφραση του υποδοχέα θανάτου και το ligand οδηγεί σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό θάνατο. Πράγματι σε ασθενείς με αλκοολική νόσο του ήπατος η de novo έκφραση του Fas ligand mRNA ταυτοποιήθηκε στα ηπατοκύτταρα **(54)**. Τα ηπατοκύτταρα δηλαδή που εκτίθενται σε αιθανόλη, παράγοντας ενδιάμεσα προϊόντα οξυγόνου από την επαγωγή του κυτοχρώματος P450 2E 1 (CYP2E1), οδηγούνται στην επαγωγή της έκφρασης του Fas ligand λόγω του οξειδωτικού στρες με συνέπεια την παρακρινική δολοφονία των

ηπατοκυττάρων που είναι θετικά στον Fas υποδοχέα. Ο TNFa επίσης εμπλέκεται στην απόπτωση της αλκοολικής νόσου και έχει ήδη αναπτυχθεί **(55)**.

Ηπατίτιδες

Φαίνεται ότι η απόπτωση παίζει ένα σημαντικό ρόλο στις ιογενείς ηπατίτιδες. Είναι από παλιά γνωστό ότι στη βλάβη του ήπατος στις ιογενείς ηπατίτιδες εμπλέκονται τα T-λεμφοκύτταρα (CTL). Οι αποπτωτικές οδοί εμπλέκονται στη βλάβη με τα συστήματα Fas, TNFα όπως και με το σύστημα granzyme. Το παλαιότερο παράδειγμα απόπτωσης σε ηπατοκύτταρα ήταν ο κίτρινος ιογενής πυρετός **(56)**. Διάφοροι άλλοι σπάνιοι ιοί είναι επίσης ικανοί να προκαλέσουν απόπτωση στο ήπαρ **(56)** και οι αλλοιώσεις που έχουν περιγραφεί αναφέρονται στους συχνότερους ηπατοτρόπους ιούς **(11)**.

Οι ηπατίτιδες B και C είναι οι κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες της χρόνιας ηπατικής νόσου. Τα αποπτωτικά ηπατοκύτταρα είναι άφθονα στην οξεία ηπατίτιδα και στις χρόνιες B και C **(57)** αλλά χρειάζονται ποσοτικές μορφολογικές μελέτες για να επιβεβαιώσουν αυτό το σημείο. Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι πολλοί από τους ιούς αυτούς προκαλούν μεικτές διαταραχές απόπτωσης και νέκρωσης **(56,57)**.

Οι ιοί φαίνεται να ευαισθητοποιούν τα ηπατοκύτταρα στην απόπτωση αλλά επίσης μπορούν να αναστείλουν την απόπτωση ανάλογα με την ιική πρωτεΐνη που εκφράζεται. Στα ηπατοκύτταρα ποντικών για παράδειγμα, ο TNFα προάγει την απόπτωση που συμβαίνει στα κύτταρα που εκφράζουν ένα υψηλό επίπεδο HBV. Η ευαισθητοποίηση των ηπατοκυττάρων στο αποπτωτικό ερέθισμα κατά τη διάρκεια της HBV λοίμωξης συνδέεται με το γονίδιο X που παράγει ο HBV **(58)**. Ομοίως στην HCV λοίμωξη η ιική πυρηνική πρωτεΐνη (core) μπορεί και συνδέεται με το κυτταροπλασματικό domain του TNF-R1 **(59)**. Αυτή η αντίδραση προάγει τον κυτταρικό θάνατο από απόπτωση δια της οδού του TNF σήματος στα ποντίκια και στον άνθρωπο. Ο μηχανισμός της ευαισθητοποίησης είναι ακόμα άγνωστος αλλά φαίνεται να είναι ανεξάρτητος από την απορύθμιση από τον TNF-R1. Οι ιοί για να συμπληρώσουν τον κυτταρικό τους κύκλο και να εμποδίσουν την κάθαρση των φλεγμονωδών κυττάρων, ανέπτυξαν μηχανισμούς για να μπλοκάρουν την απόπτωση. Παράδειγμα η NS3 πρωτεΐνη του HCV, η οποία μπορεί να καταστείλει την απόπτωση που προκαλείται από την ακτινομυκίνη σε μια πειραματική μελέτη **(60)**. Η συνολική δράση των ιικών πρωτεϊνών στην απόπτωση πιθανόν να εξαρτάται από τα αποπτωτικά ερεθίσματα, το κυτταρικό πλαίσιο και τη σχετική έκφραση των διαφόρων ιικών πρωτεϊνών.

Υπάρχει μια σειρά από κλινικές μελέτες που δείχνουν ένα ανοσολογικό μηχανισμό της απόπτωσης στις χρόνιες HBV, HCV ηπατίτιδες. Μελετήθηκε η έκφραση του Fas και του HCV core αντιγόνων ανοσοιστοχημικά σε μια σειρά 40 ασθενών με χρόνια HCV λοίμωξη **(46)**. Η έκφραση του fas στα ηπατοκύτταρα με θετικό HCV core αντιγόνο, ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με μη μολυσμένα κύτταρα. Βρέθηκε ακόμα ένα ενεργό σύστημα Fas σε ήπαρ ασθενών με HBV χρόνια λοίμωξη και είναι ενδιαφέρον ότι βρέθηκε σε περιοχές με διήθηση από λεμφοκύτταρα, πράγμα που δείχνει ότι ενέχεται ένας CTL-εξαρτώμενος μηχανισμός στα θετικά φλεγμονώδη ηπατοκύτταρα.

Χολοστατικές νόσοι του ήπατος

Η χολοστατικές νόσοι του ήπατος όπως η πρωτοπαθής χολική κίρρωση και η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτις, χαρακτηρίζονται από μια αρχική βλάβη στο επιθήλιο. Η βλάβη στα ηπατικά χοληφόρα οδηγεί σε μια εξασθένιση της ροής, που προκαλεί το σύνδρομο της χολόστασης που οδηγεί τελικά σε κίρρωση. Πρόσφατες ενδείξεις προτείνουν ότι και οι δύο διαδικασίες, δηλαδή και η βλάβη των χοληφόρων και η παρεγχυματική ηπατική βλάβη οφείλονται σε απόπτωση. Για παράδειγμα η απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων έχει αποδειχτεί σε νόσους όπως η πρωτοπαθής χολική κίρρωση **(61)**. Πιθανόν η απόπτωση στα ηπατικά κύτταρα των χοληφόρων να οφείλεται σε ανοσολογικούς μηχανισμούς όπως περιγράφηκε παραπάνω για τις ιογενείς ηπατίτιδες. Η προκαλούμενη χολόσταση από τα ηπατικά χοληφόρα οδηγεί σε απόπτωση τα ηπατοκύτταρα. Η απόπτωση στα ηπατοκύτταρα στη χολόσταση είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης των υδροφοβικών τοξικών χολικών αλάτων μέσα στο ήπαρ **(62)**. Η τοξικότητα των χολικών αλάτων φαίνεται ότι προκαλεί απόπτωση με τον άμεσο ερεθισμό του Fas υποδοχέα κυτταρικού θανάτου **(63)**. Είναι ενδιαφέρον ότι η συγχορήγηση του ουρσοδεοξυχολικού οξέως (UDCA) ενός μη τοξικού υδροφιλικού χολικού άλατος μαζί με ένα τοξικό χολικό άλας έδειξε ότι ελαττώνει την απόπτωση σε ανθρώπινες ηπατοκυτταρικές σειρές. Η προστατευτική δράση του UDCA φαίνεται ότι σχετίζεται με την ικανότητα του να αναστέλλει του μιτοχονδριακούς δρόμους της απόπτωσης **(64)**. Έτσι η ηπατολογία φαίνεται να είναι ο πρώτος επιστημονικός κλάδος που χρησιμοποιεί αντιαποπτωτικά φάρμακα σε ανθρώπινη νόσο.

Νεοπλάσματα

Η απόπτωση έχει περιγραφεί σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο **(11)** και σε παιδικά ηπατώματα **(65)**. Είναι πολύ συχνό φαινόμενο η απόπτωση σε κακοήγη νεοπλάσματα **(66)**, ένα φαινόμενο που αποτελεί την βάση για να στηριχθεί η θεωρία για το ρόλο της στον καρκίνο, που αναπτύχθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο **(67,68)**, ότι δηλαδή η καρκινική ανάπτυξη είναι το αποτέλεσμα μιας ανισορροπίας μεταξύ ακανόνιστης μίτωσης του κυττάρου και της απόπτωσης με την πρώτη να υπερέχει της δεύτερης. Σαν λογικό επακόλουθο της θεωρίας αυτής θα ήταν η προώθηση της απόπτωσης από τους ογκολόγους με χημειοθεραπεία για να περιορίσουν τις συνέπειες της κυτταρικής υπερανάπτυξης **(68)**. Η επίπτωση της απόπτωσης στον πρωτοπαθή ηπατοκυτταρικό καρκίνο παραμένει άγνωστη προς το παρόν, αν και μερικά δεδομένα που υπάρχουν μιλούν για μικρότερη παρουσία αποπτωτικών κυττάρων παρά καρκινικών σε ανθρώπινους όγκους αλλά και σε ποντίκια **(69)**.

. Το ογκογονίδιο bcl-2 πάντως φαίνεται ότι υπερεκφράζεται στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο πράγμα που δείχνει ότι το κύριο αντιαποπτωτικό γονίδιο είναι ενεργοποιημένο στην ηπατοκαρκινογένεση **(40)**. Πολύ πρόσφατα λήψη YVADcmk, που είναι ένας αναστολέας πρωτεάσης, από ποντίκια, τα προστάτεψε από προσβολή κεραυνοβόλου ηπατίτιδος που προκαλείται με τη χορήγηση anti-Fas αντισωμάτων, γεγονός που ανοίγει νέους δρόμους στην θεραπεία της ιογενούς κεραυνοβόλου ηπατίτιδος **(113)**.

Διάφορες άλλες καταστάσεις

Αποπτωτικά σωματίδια παρατηρούνται στο ήπαρ κατά την απόρριψη αλλομοσχεύματος, είτε στα ηπατοκύτταρα είτε στα κύτταρα των χοληφόρων **(70,71,72)**. Η υπερμικροσκοπική εμφάνιση των αποπτωτικών κυττάρων των χοληφόρων κατά την απόρριψη, είναι πολύ όμοια με αυτή που παρατηρείται κατά την πρωτοπαθή χολική κίρρωση **(73)** ή κατά την απόρριψη μοσχεύματος εναντίον ξενιστή **(73)**. Απόπτωση παρατηρείται επίσης κατά την χορήγηση διαφόρων ουσιών όπως αμιοδαρόνη, μεθοτρεξάτη και 6-μερκαπτοπουρίνη **(74)**.

Απόπτωση μετά από έκθεση του ήπατος σε εξωτερικούς παράγοντες

Πολλές πειραματικές καταστάσεις χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση απόπτωσης των κυττάρων του ήπατος. Οι καταστάσεις αυτές μιμούνται ανθρώπινες ηπατικές νόσους. Η απόπτωση όμως εντοπίστηκε και *in vitro* σε πρωτογενείς καλλιέργειες ηπατοκυττάρων και σε κυτταρικές σειρές ηπατώματος .

Η ατροφία του ηπατικού λοβού που ακολουθεί την απολίνωση της πυλαίας φλέβας, έχει σαν αποτέλεσμα μια εκτεταμένη αποπτωτική απάλειψη των ηπατοκυττάρων **(15,75)**. Η επάνοδος της υπερπλασίας του ήπατος παρακινείται από απλή χορήγηση νιτρικού μολύβδου **(12)**, από χορήγηση για μια εβδομάδα οξικής κυπροτερόνης **(76)** ή από ενδοπεριτοναϊκή ένεση κυττάρων ηπατώματος της σειράς AH-130 **(77)** που οδήγησαν επίσης σε σημαντική αύξηση της απόπτωσης **(78)**. Ομοίως , η υποχώρηση της υπερπλασίας των χοληφόρων που ακολουθείται από χρόνια χορήγηση ναφθυλισοθειοκυανίου προκαλείται από την απόπτωση **(78)**.

Γνωρίζουμε ακόμα ότι η απόρριψη ηπατικού μοσχεύματος από χοίρο συνοδεύεται από απόπτωση **(79)** και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος παρατηρείται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών όταν φυλάσσονται σε ένα διάλυμα U.W σε κανονική θερμοκρασία **(80)**. Μια άλλη μελέτη προτείνει ότι η απόπτωση των ηπατοκυττάρων αυξάνεται μετά από ορθοτοπική μεταμόσχευση ήπατος **(81)**, ένα εύρημα που προτείνει ότι η απόπτωση τόσο στα ποντίκια όσο και στον άνθρωπο μπορεί να συμβάλει στην απόρριψη του μοσχεύματος.

Σε καρκίνους του ήπατος που προκαλούνται από χημικά καρκινογόνα όπως η διμεθυλυδραζίνη **(82)**, το ακετυλαμινοφλουορένιο **(82)** ή η νιτροσομορφολίνη, η επίπτωση της απόπτωσης αυξάνεται τόσο στις προνεοπλασματικές εστίες **(82)** όσο και στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα **(82,83)**. Σε μια εργασία του Zerbran et.al **(83)**, όπου μελετήθηκε ο κυτταρικός κύκλος και το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων στα ίδια τεμάχια ηπατικού ιστού, βρέθηκε ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και ο θάνατος ήταν στενά συσχετιζόμενα μόνο όταν ήταν παρόν ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος αλλά όχι κατά την διάρκεια προκαρκινικών σταδίων. Τα ευρήματα αυτά προτείνουν ότι ο κυτταρικός θάνατος θα μπορούσε να εξαρτάται κατά ένα μέρος τουλάχιστον με τον φαινότυπο της ηπατικής αλλοίωσης **(83)**. Μερικοί επαγωγείς των όγκων όπως είναι η φαινοβαρβιτάλη μπορούν να καταστείλουν την απόπτωση και

επομένως να επάγουν την ανάπτυξη των όγκων **(1)**. Δύο άλλες εργασίες επιβεβαίωσαν τον ρόλο της διατροφής η οποία μπορεί να αυξήσει την απόπτωση των ηπατοκυττάρων και να μειώσει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων κάτω από ορισμένες διατροφικές συνθήκες στα ποντίκια ή στους αρουραίους **(84,85)**.

Άλλα φάρμακα που μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση σε περιφερικά ηπατοκύτταρα είναι η διμεθυλνιτροσαμίνη **(86,87)**, η θειοκεταμίδη **(88)**, η κοκαΐνη **(89)**, και η κυκλοεξιμίδη **(90,91)**. Πολλές φορές οι ουσίες αυτές περιπλέκονται και με τους δύο τρόπους κυτταρικού θανάτου, την νέκρωση και την απόπτωση **(88)**. Μετά τη χορήγηση θειοκεταμίδης παρατηρείται 70 φορές αύξηση των αποπτωτικών κυττάρων μαζί με μια σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της τρανσγλουταμινάσης **(88)**. Ο ρόλος της κυκλοεξιμίδης στην πρόκληση απόπτωσης αποτελεί ιδιάζουσα περίπτωση. Η κυκλοεξιμίδη είναι γνωστή σαν αναστολέας της πρωτεϊνικής σύνθεσης και η ανασταλτική της δράση στην απόπτωση χρησιμοποιήθηκε για να αποδείξει ότι η απόπτωση είναι μια ενεργός διαδικασία κυτταρικού θανάτου **(17,18)** σε αντίθεση με τη νέκρωση. Παρόλα αυτά όμως σε κανονικές δόσεις η κυκλοεξιμίδη μπορεί να προκαλέσει απόπτωση στα ηπατικά κύτταρα ποντικού **(90,91)**. Αυτή η δράση είναι πολύ γρήγορη και ορατή στο ήπαρ δύο ώρες μετά την χορήγηση, ενώ το ποσοστό της αυξάνεται με τη δόση του φαρμάκου, είναι δηλαδή δοσο-εξαρτώμενη **(90)**. Ανάμεσα στους τοξικούς παράγοντες που δρουν στην ίδια λοβιακή ζώνη του ηπατικού λοβού, είναι και ο τετραχλωράνθρακας, **(92)**, η γαλακτοσαμίνη **(93)**, η αφλατοξίνη **(94)** η ο χαλκός που προκαλούν απόπτωση σε όλες τις ζώνες τη ηπατικού λοβού.

Πολλά αντικαρκινικά φάρμακα και η ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει απόπτωση **(68)**. Μερικά φάρμακα μάλιστα δοκιμάστηκαν σε κυτταρικές καλλιέργειες ηπατοκυττάρων όπως η ετοποσίδη **(95,96)**, η μιτομικίνη **(95)** και η βινπλαστίνη **(32)**. Η δράσεις της βινπλαστίνης και της κολχικίνης αναλύθηκαν λεπτομερώς σε πρωτογενείς καλλιέργειες ηπατοκυττάρων **(32)**. Στις καταστάσεις αυτές φαίνεται ότι ο ρόλος του ασβεστίου, της πρωτεϊνικής σύνθεσης και της δραστηριότητας του PCK φαίνεται ότι είναι πολύ σημαντικός για την πρόκληση της απόπτωσης **(32)**. Η ναφenoπίνη, ένας πολλαπλασιαστής των υπεροξεισωματίων, μπορεί να αναστείλει in vitro την απόπτωση που προκαλείται από την ετοποσίδη και άλλα αντικαρκινικά φάρμακα **(96)**. Οι ίδιες δράσεις της ναφenoπίνης παρατηρήθηκαν όταν αυτή

χορηγήθηκε *in vivo* σε φυσιολογικά ποντίκια όπου παρατηρήθηκε μια εντυπωσιακή μείωση των αποπτωτικών κυττάρων μετά από δεκαήμερη χορήγηση της ναφenoπίνης (97).

Με την χορήγηση UV ακτινοβολίας παρατηρήθηκαν αντιφατικά αποτελέσματα: ενώ σε κύτταρα ηπατώματος με τη χορήγηση UV ακτινοβολίας παρατηρήθηκε απόπτωση σε άλλα κύτταρα ηπατώματος δεν παρατηρήθηκε το ίδιο (98).

Σε κάποιες κυτταροκαλλιέργειες παρατηρήθηκε ότι μπορεί να σημειωθεί αυτόματα απόπτωση και ότι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος εξαρτάται από την κυτταρική πυκνότητα (99). Ο Patel et al (20,99), έδειξαν καθαρά ότι το χολικό άλας γλυκοδεοξυχολικό μπορεί να προκαλέσει απόπτωση σε ηπατοκύτταρα ποντικών αυξάνοντας την συγκέντρωση του Mg και ερεθίζοντας μια ενδονουκλεάση μαγνησίου. Οι Corcoran et al (23,101) ανέλυσαν λεπτομερώς τους παράγοντες που προκαλούν απόπτωση με τη χορήγηση ακεταμινοφαίνης. Στη μελέτη τους έδειξαν ότι το aurin-tricarboxylic οξύ, ένας αναστολέας της ενδονουκλεάσης ασβεστίου και το EGTA που είναι χηλοποιός ουσία του ασβεστίου ελαττώνει την κλασματοποίηση του DNA, όπως οι αναστολείς του γονιδίου έλλειψης της γλουταθειόνης. Οι Natoli et al (102) έδειξαν ότι μόνο η μία από τις κυτταρικές σειρές ηπατώματος που μελέτησαν, παρουσίασε απόπτωση μετά από θεραπεία με anti-Fas αντισώματα. Δεν εξηγήθηκε ξεκάθαρα η ανθεκτικότητα των άλλων κυτταρικών σειρών αλλά μάλλον οφείλεται στην αλλαγές της δομής της τρoνσμεμβρανικής πρωτεΐνης apo-1.

Απόπτωση μπορεί να προκληθεί είτε *in vivo* είτε *in vitro* από διάφορα φυσικά μόρια, όπως ο TGFβ1. Ο TGFβ1 είναι γνωστός αναστολέας της σύνθεσης του DNA και θεωρείται αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου. Ο ρόλος του στην πρόκληση της απόπτωσης μελετήθηκε σε πειραματικό μοντέλο ηπατικής υπερπλασίας (103) και *in vitro* σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων ηπατώματος και ηπατοκυττάρων (103-105). Εδείχθη ότι τα ηπατοκύτταρα πλησίον των κεντρικών φλεβών είναι πιο ευαίσθητα στην δράση του προαποπτωτικού παράγοντα TGFβ1 παρά τα περιπυλαία κύτταρα (106,107). Η ακτιβίνη η οποία ανήκει στην μεγάλη οικογένεια του TGF αρχικά περιγράφηκε σαν ένα πεπτίδιο των γονάδων το οποίο έχει σχέση με τη ρύθμιση της FSH, αλλά έχει και άλλες δράσεις όπως η επίδραση στην κυτταρική διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό (108). *In vitro* όπως και *in vivo* (5,108) η ακτιβίνη μπορεί να προκαλέσει σημαντική απώλεια ηπατοκυττάρων με την απόπτωση. Είναι ενδιαφέρον ότι *in vivo* παρατηρήθηκε μείωση του βάρους του

ήπατος πάνω από το ένα τρίτο μετά από χορήγηση ακτιβίνης μια μέρα μετά ενώ τρεις μέρες μετά πάνω από το μισό **(5)**. Η ακτιβίνη όμως είναι λιγότερο δραστική από τον TGFβ1 **(5)**.

Ο TNFα επίσης εδείχθη ότι επάγει *in vivo* **(109,110)** και *in vitro* **(109,111)** την απόπτωση των ηπατοκυττάρων. Η δράση του TNF *in vitro* φαίνεται ότι είναι δυνατή μόνον με την παρουσία ιντερφερόνης-γ **(110)**. Ο TNFα είναι διαφορετικός από το Fas ligand αν και ανήκουν στην ίδια μοριακή οικογένεια.

Συμπεράσματα

Στο ήπαρ η απόπτωση αποτελεί μορφή κυτταρικού θανάτου και έχει πολύ καλά χαρακτηριστεί μορφολογικά, βιοχημικά, γενετικά ενώ τα στοιχεία δείχνουν την διαφορετικότητα της από τη νέκρωση. Μπορεί να συμβεί τόσο στο ανθρώπινο ήπαρ όσο και σε πειραματικά μοντέλα θηλαστικών. Μπορεί να χαρακτηρίζει τόσο το φυσιολογικό ήπαρ όσο και τις διάφορες κλινικές οντότητες. Ρυθμίζεται από γονίδια είτε θετικά είτε αρνητικά, ενώ πολλοί εξωτερικοί παράγοντες μπορούν να την προκαλέσουν.

Οι φαρμακολογικές προσεγγίσεις της απόπτωσης άπτονται τριών βασικών θεραπευτικών στρατηγικών: 1) στο να μπλοκάρουμε την απόπτωση σε κύτταρα στόχους που υπόκεινται φλεγμονώδη διαδικασία 2) στη δυνατότητα πρόκλησης απόπτωσης σε κύτταρα που προκαλούν ιστική βλάβη και 3) στη δυνατότητα να προκαλέσουμε απόπτωση στα κακοήθη κύτταρα.

Βιβλιογραφία

- 1) Bursch W, Paffe S, Putz B et al. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatitis foci of rats. *Carcinogenesis* 1990; 11:847-53.
- 2) Popper H. Hepatocellular degeneration and death. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schacter D, Shafritz DA, eds. *The liver. Biology and Pathobiology*. 2nd edn. New York: Raven Press, 1988;1087-103.
- 3) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992, 119: 493-501.
- 4) Wijsman JH, Jonker RR, Keizer R et al. A new method to detect apoptosis in paraffin section: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993;41: 7-12.
- 5) Hully JR, Chang L, Schwall RH et al. Induction of apoptosis in the murine liver with recombinant human activin A. *Hepatology* 1994;20: 854-61.
- 6) Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H et al. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995;21: 1465-8.
- 7) Benedetti A, Jezequel AM, Orlandi F. Preferential distribution of apoptotic bodies in acinary zone 3 of normal human and rat liver. *J Hepatol* 1988; 7: 319-24.
- 8) Goldin RD, Hunt NC, Clark J et al. Apoptotic bodies in a murine model of alcoholic liver disease: reversibility of ethanol-induced changes. *J Pathol* 1993;171: 73-6.
- 9) Barrett JC, Preston G. Apoptosis and cellular senescence: forms of irreversible growth arrest. In: Tomei LD, Cope FO eds. *Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994;253-81.
- 10) Scothorne RJ, MacSween RNM. The streaming liver: a slow, divided flow. *Hepatology* 1986;6: 1050-2.
- 11) Searle J, Harmon BV, Bishop CJ, Kerr JFR. The significance of cell death by apoptosis in hepatobiliary disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1987; 2: 77-96.

- 12) Columbano A, Ledda-Colubano GM, Coni PP, Faa G, Liguori C et al. Occurrence of cell death (apoptosis) during the involution of liver hyperplasia. *Lab Invest* 1985; 52: 670-5.
- 13) Terada T, Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol* 1995; 146: 67-74.
- 14) Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Pathol* 1991;32:223-54.
- 15) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
- 16) Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284: 555-6.
- 17) Wyllie AH, Morris RG, Smith AL et al. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984; 142: 67-77.
- 18) Martin SJ. Apoptosis :suicide, execution or murder? *Trends Cell Biol* 1993; 3:141-4.
- 19) Peitsch MC, Mannherz HG, Tschoop J. The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death? *Trends Cell Biol* 1994; 4: 37-41.
- 20) Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995;21:1725-41.
- 21) Fesus L, Thomazy V, Falus A. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett* 1987;224:104-8.
- 22) McCabe MJ, Nicotera P, Orrenius S. Calcium-dependent cell death. Role of the endonuclease, protein kinase C, and chromatin conformation. *Ann NY Acad Sci* 1992; 663: 269-78.
- 23) Ray SD, Kamendulis LM, Gurule MW, Yorkin RD et al. Ca antagonists inhibit DNA fragmentation and toxic cell death induced by acetaminophen. *FASEB J* 1993; 7:453-63.
- 24) Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 1995; 82:349-52.
- 25) Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;91:443-450.

- 26) Fygera DR et al. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998;94:695-698.
- 27) Compton MM. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metast Rev* 1992;11:105-19.
- 28) Piacentini M, Davies PJA, Fesus L. Tissue transglutaminase in cells undergoing apoptosis. In: Tomei LD, Cope FO, eds. *ApoptosisII: The molecular basis of apoptosis in disease*. New York: Cold Spring harbor Laboratory Press, 1994: 143-64.
- 29) Piacentini M, Ceru MP, Dini L, Di Rao M et al. In vitro induction of tissue transglutaminase in rat hepatocytes by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1135: 171-9.
- 30) Mc Conkey DJ, Orrenius S. Signal transduction pathways to apoptosis. *Trends Cell Biol* 1994;4:370-5.
- 31) Sanchez V, Lucas M, Sanz A et al. Decreased protein kinase C activity is associated with programmed cell death (apoptosis) in freshly isolated rat hepatocytes. *Biosci rep* 1992; 12:199-205.
- 32) Tsukidate K, Yamamoto K, Snyder JW et al. Microtubule antagonists activate programmed cell death (apoptosis) in cultured rat hepatocytes. *Am J Pathol* 1993;143:918-25.
- 33) Ni R, Tomita Y, Matsuda K et al. Fas-mediated apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. *Exp Cell Res* 1994;215:332-7.
- 34) Fesus L, Thomazy V, Autuori F et al. Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *Febs Lett* 1989;245:150-4.
- 35) Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 131-6.
- 36) Dini L, Authori F, Lentini A et al. The clearance of apoptotic cells in the liver is mediated by the asialoglycoprotein receptor. *Febs Lett* 1992;296:174-8.
- 37) Dini L, Falasa L, Lentini A, et al. Galactose-specific receptor modulation related to the onset of apoptosis in rat liver. *Eur J Cell Biol* 1993;61:329-37.
- 38) Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6.

- 39) Charlotte F, L'Hermine A, Martin N, Geleyn Y, Nollet M et al. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver. *Am J Pathol* 1994;144:460-5.
- 40) Zhao M, Zhang NX, Economou M et al. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in liver lesions: Bcl-2 protein is expressed in hepatocellular carcinoma but not in liver cell dysplasia. *Histopathology* 1994;25:237-45.
- 41) Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A et al. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of bax, a dominant inhibitor of bcl-2. *Am J Pathol* 1994;145:1323-36.
- 42) Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
- 43) Nagata S, Golstein P. The fas death factor. *Science* 1995; 267:1449-55.
- 44) Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M et al. Lethal effect of the anti-fas antibody in mice. *Nature* 1993;364:806-9.
- 45) Rouquet N, Allemand I, Molina T et al. Fas-dependent apoptosis is impaired by SV40 t-antigen in transgenic liver. *Oncogene* 1995; 11:1061-7.
- 46) Hiramatsu n, Hayashi n, Katayama K et al . Immunohistochemical detection of fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994;19:1354-9.
- 47) Mita E, Hayashi N, Lio S et al. Role of fas-ligand in apoptosis induced by hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:469-74.
- 48) Kerr JFR, Searle J, Haliday WJ et al. The nature of piecemeal necrosis in chronic active hepatitis. *Lancet* 1979;ii:827-8.
- 49) Benedetti A, Jezequel AM, Orlandi F. A quantitative evaluation of apoptotic bodies in rat liver. *Liver* 1988; 20:508-13.
- 50) Baroni GS, Marucci L, Benedetti A et al. Chronic ethanol feeding increases apoptosis and cell proliferation in rat liver. *J Hepatol* 1994;20:508-13.
- 51) Yacoub LK, Fogt F, Griniuviene B et al. Apoptosis and bcl-2 protein expression in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19:854-9.
- 52) Matsuda Y, Takase S et al. Is apoptosis involved in alcoholic hepatitis? *Alcohol Alcohol* 1994;29 suppl113-118.

- 53) Galleano M, Cederbaum AI. Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in Hep G2 cells overexpressing human cytochrome P4502E1. *J Biol Chem* 1997; 272:14532-14541.
- 54) Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, Krammer PH, Runkel L. Involvement of the CD-95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 1995; 182:1223-1230.
- 55) Faubion WA, Gores GJ. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology* 1999;29:1-4.
- 56) Ishak KG, Walker DH, Coetzer JAW et al. Viral hemorrhagic fevers with hepatic involvement: pathologic aspects with clinical correlations. In: Popper H, Schaffner F, eds. *Progress in liver diseases*, Vol 7. New York : Grune @Stratton, 1982;495-515.
- 57) Dienes HP, Popper H, Arnold W et al. Histologic observations in human hepatitis nonA, nonB. *Hepatology* 1982;2:562-71.
- 58) Kim H, Lee H, Yun Y. X- gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells. *J Biol Chem* 1998;273:381-385.
- 59) Zhu N, Khoshman A, Schneider R, et al. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 1998; 72:3691-3697.
- 60) Fujita T, Ishito S, Muramatsu S et al. Suppression of actinomycin D induced apoptosis by the NS3 protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229:825-831.
- 61) Harada K, Ozaki S, Gershwin ME et al. Enhanced apoptosis relates to bile duct loss in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997;26:1399-1405.
- 62) Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H et al. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of fas. *J Clin Invest* 1999;103:137-145.
- 63) Kakkar P, Mehrotra S, Viswanathan PN. TBHP induced in vitro swelling of rat liver mitochondria. *Mol Cell Bioch* 1996;154:39-45.
- 64) Rodrigues CMP, Fan G, Xiaoming M et al. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 1998;101:1790-2799.
- 65) Klion FM, Schaffner F. The ultrastructure of acidophilic Councilman-like bodies in the liver. *Am J Pathol* 1966;48:755-67.

- 66) Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-26.
- 67) Williams GT, Smith CA, McCarthy NJ et al. Apoptosis: final control point in cell biology. *Trends cell Biol* 1992;2:263-7.
- 68) Smets LA. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anti-Cancer Drugs* 1994;5:3-9.
- 69) Schulte-Hermann R, Bursch W, grasl-Kraup B. Active cell death (apoptosis) in liver biology and diseases. In: Boyer JL, Ockner RK, eds. *Progress in liver diseases*. Philadelphia:Saunders, 1995, Vol 13:1-35.
- 70) Snover DC, Sibley RK, Freese DK et al. Orthotopic liver transplantation: a pathological study of 63 serial liver biopsies from 17 patients with special reference to the diagnostic features and natural history of rejection. *Hepatology* 1984;4:1212-22.
- 71) Nawaz S, Fennell RH. Apoptosis of bile duct epithelial cells in hepatic allograft rejection. *Histopathology* 1994; 25:137-42.
- 72) Afford SC, Hubscher S, Strain AJ et al. Apoptosis in the human liver during allograft rejection and end-stage liver disease. *J Pathol* 1995;176:373-80.
- 73) Bernuau D, Feldmann G, Degott C et al. Ultrastructural lesions of bile ducts in primary biliary cirrhosis. A comparison with the lesions observed in graft versus host disease. *Hum Pathol* 1981; 12:782-93.
- 74) Philips MJ, poucell S, Patterson J et al. *The liver. An Atlas and text of ultrastructural pathology*. New York: raven Press, 1987.
- 75) Ikeda K, Kinoshita H, Hirohashi K et al. The ultrastructural kinetics and intralobular distribution of apoptotic hepatocytes after portal branch ligation with special reference to their relationship to necrotic hepatocytes. *Arch Histol Cytol* 1995;58:171-84.
- 76) Bursch W, Taper HS, Lauer B et al. Quantitative histological and histochemical studies on the occurrence and stages of controlled cell death (apoptosis) during regression of rat liver hyperplasia. *Virchows Arch* 1985;50:153-66.
- 77) Tessitore L, Valente G, Bonelli G, et al. Regulation of cell turnover in the livers of tumour-bearing rats: occurrence of apoptosis. *Int J Cancer* 1989;44:697-700.
- 78) Bhathal PS, Gall JAM. Deletion of hyperplastic biliary epithelial cells by apoptosis following removal of the proliferation stimulus. *Liver* 1985;5:311-25.

- 79) Searle J, Kerr JFR, Battersby C et al. An electron microscopic study of the mode of donor cell death in unmodified rejection of pig liver allografts. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1977;55:401-6.
- 80) Astarcioglou I, Delautier D, Adam R et al. The influence of temperature of storage on survival and ultrastructure of transplanted UW-preserved rat liver grafts. *Transplantation* 1993;55:230-4.
- 81) Krams SM, Egawa H, Quinn MB et al. Apoptosis as a mechanism of cell death in liver allograft rejection. *Transplantation* 1995;59:621-5.
- 82) Columbano A, Ledda-Columbano GM, Rao PM et al. Occurrence of cell death (apoptosis) in preneoplastic and neoplastic liver cells. A sequential study. *Am J Pathol* 1984;116:441-6.
- 83) Zerban H, Radig S, Kopp-Schneider A et al. Cell proliferation and cell death (apoptosis) in hepatic preneoplasia and neoplasia are closely related to phenotypic cellular diversity and instability. *Carcinogenesis* 1994;15:2467-73.
- 84) Grasl-Kraupp B, Bursch W, Ruttkey-Nedecky B et al. Food restriction eliminated preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9995-9.
- 85) James SJ, Muskhelishvili L. Rates of apoptosis and proliferation vary with caloric intake and may influence incidence of spontaneous hepatoma in C57BL/6xC3HF1 mice. *Cancer Res* 1994;54:5508-10.
- 86) Pritchard DJ, Butler WH. Apoptosis-The mechanism of cell death in dimethylnitrosamine-induced hepatotoxicity. *J Pathol* 1989;158:253-60.
- 87) Ray SD, Sorge CL, Kamendulis LM et al. Ca⁺⁺ activated DNA fragmentation and dimethylnitrosamine-induced hepatic necrosis: effects of Ca⁺⁺-endonuclease and poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263:347-52.
- 88) Ledda-Columbano GM, Coni P, Curto M, et al. Induction of two different modes of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide. *Am J Pathol* 1991;139:1099-109.
- 89) Cascales M, Alvarez A, Gasco P et al. Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed death of hepatocytes. *Hepatology* 1994;20:992-1001.

- 90) Ledda-Columbano GM, Coni P, Faa G et al. . Rabbit induction of apoptosis in rat liver by cycloeximide. *Am J Pathol* 1992;140:545-9.
- 91) Faa G, Ledda-Colubano GM, Ambu R et al. An electron microscopic study of apoptosis induced by cycloeximide in rat liver. *Liver* 1994;14:270-8.
- 92) Bursch W, Oberhammer F, Schulter-Hertmann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* 1992 ;13:245-51.
- 93) Medline A, Schaffner F, Popper H. Ultrastructural features in galactosamine-induced hepatitis. *Exp Mol Pathol* 1970;12:201-11.
- 94) Bose S, Mathur M, nayak NC et al. A ligant and electron microscopic study on apoptotic bodies in acute aflatoxin B1 induced injury in the rat liver. *Indian J Med res* 1991;94:134-8.
- 95) Kaneko Y, Tsukamoto A. Apoptosis and p53 protein expression in human hepatoma cells induced by etoposide, mitomycine C and thapsigargin. *Inten Hepatol Commun* 1994;2:305-9.
- 96) Bayly AC, Roberts RA, Dive C. Suppression of liver cell apoptosis in vitro by the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopin. *J Cell Biol* 1994;125:197-203.
- 97) Roberts RA, Soames AR, Gill JH et al. Non-genotoxic hepatocarcinogenes stimulate DNA synthesis and their withdrawal induces apoptosis, but in different hepatocyte populations. *Carcinogenesis* 1995;16:1693-8.
- 98) Laukka MA, Wang KK, Bonner JA et al. Apoptosis occurs in lymphoma cells but not in hepatoma cells following ionizing radiation and photodynamic therapy. *Dig Dis Sci* 1994;39:2467-75.
- 99) Maeda S, Kimura H, Koga N et al. Cell density-depentet DNA fragmentation and suppression by heparin in primary culture of adult rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195:270-5.
- 100) Patel T, Bronk SF, Gores GJ. Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1994;94:2184-92.
- 101) Shen W, Kamendalis LM, Ray S et al. Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes effects of Ca⁺⁺-endonuclease DNA fragmentation and cell death. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;112:32-40.

- 102) Natoli G, Ianni A, Costanzo A et al. Resistance to fas-mediated apoptosis in human hepatoma cells. *Oncogene* 1995;11:1157-64.
- 103) Oberhammer FA, Pavelka M, Sharma S et al. Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor β 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5408-12.
- 104) Oberhammer FA, Bursch W, Parzefall W et al. Effect of transforming growth factor β on cell death of cultured rat hepatocytes. *Cancer Res* 1991;51:2478-85.
- 105) Lin JK, Chou CK. In vitro apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor β 1. *Cancer Res* 1992;52:385-8.
- 106) Ohno K, Amman P, Fasciati R et al. Transforming growth factor β 1 preferentially induces apoptotic cell death in rat hepatocytes cultured under pericentral-equivalent conditions. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;132:227-36.
- 107) Benedetti A, DiSario A, Baroni GS, et al. Transforming growth factor β 1 increases the number of apoptotic bodies and decreases intracellular pH in isolated perip[ortal and perivenular rat hepatocytes. *Hepatology* 1995;22:1488-98.
- 108) Schwall RH, Robins K, Jardieu P et al. Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro. *Hepatology* 1993;18:347-56.
- 109) Leist M, Gantner F, Bohlinger I et al. Murine hepatocyte induced in vitro and in vivo by TNF- α requires transcriptional arrest. *J Immunol* 1994;153:1778-88.
- 110) Leist M, Gantner F, Bohlinger I et al. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am J Pathol* 1995;146:1220-34.
- 111) Shinagawa T, Yoshioka K, Kakumu S et al. Apoptosis in cultured rat hepatocytes: the effects of tumour necrosis factor α and interferon γ . *J Pathol* 1991;165:247-53.
- 112) Oberhammer F, Wilson JW, Dive C et al. Apoptosis death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 1993;12:3679-84
- 113) Rouquet N et al. *Curr Biol* 1996;6:1192-1195.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η ανοσοϊστοχημική μελέτη του μηχανισμού της αποπτώσεως και η μελέτη της παραγωγής πρωτεολυτικών ενζύμων από τα κύτταρα του Kupffer κατόπιν διεγερτικής δράσεως κυτταροκινών σαν πιθανοί μηχανισμοί καταστροφής των ηπατοκυττάρων σε χρόνιες ηπατοπάθειες.

Υλικά

Ανοσοϊστοχημεία: Για τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα μονοκλωνικά αντισώματα MoAb: p53 (D-07, M7001, DACO), bcl-2 (M0887, DACO), mdm-2 (Ab-1, OP46, ONGOGENE), waf1/p21 (AB-1, OP64, ONGOGENE).

Για τη μέθοδο TUNEL όλα τα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από την BOEHRINGER MANNHEIM, ενώ την διαμινοβενζιδίνη, το cobalt chloride και το BSA (bovine serum albumin) από τη SIGMA.

Ζυμογραφία: Χρησιμοποιήθηκαν gels πάχους 1mm, τα οποία αποτελούνταν από Tris-Glycine 10%, με 0.1% ενσωματωμένη ζελατίνη από την εταιρεία NOVEX. Οι δραστικές μορφές των ενζύμων MMP-2 και MMP-9 που χρησιμοποιήθηκαν ως standards για την μέτρηση των δειγμάτων στην ζυμογραφία προέρχονταν από την εταιρεία ONCOGENE. Tris, Γλυκίνη και sodium dodecyl-sulphate (SDS) αγοράστηκαν από την εταιρεία SIGMA.

ELISA: Για τη μέθοδο ELISA χρησιμοποιήθηκαν τα kits 96-well enzyme linked immunosorbent assay για τον προσδιορισμό των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-1, MMP-2, MMP-3 και MMP-9 της εταιρείας BIOTRAK.

Ασθενείς

Ανοσοιστοχημεία: Το υλικό της μελέτης ελήφθη από τα αρχεία του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και περιελάμβανε 67 συνολικά περιπτώσεις που αφορούσαν βιοψίες ήπατος, που ελήφθησαν από την Γαστρεντερολογική κλινική του ίδιου νοσοκομείου. Τα περιστατικά περιελάμβαναν τις πιο κάτω νοσολογικές οντότητες : 7 περιπτώσεις χρόνιας ηπίας ηπατίτιδας C, 23 χρόνιας βαρείας ηπατίτιδας (11 HBV και 12 HCV) , 8 περιπτώσεις κίρρωσης (4 HBV, 4HCV), 12 περιπτώσεις πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης, 12 περιπτώσεις στεατοηπατίτιδας και 5 περιπτώσεις αντιδραστικής ηπατίτιδας. Τα περιστατικά με ηπατίτιδα ήταν είτε HBV DNA είτε HCV RNA θετικά τεκμηριωμένα με PCR.

Οι ασθενείς με PBC (πρωτοπαθής χολική κίρρωση) διαγνώστηκαν με βάση την παρουσία αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων και τη συμβατή βιοψία ήπατος, ενώ 3 από αυτούς ήταν αντι-HCV θετικοί. Οι 5 ήταν σταδίου I και II ενώ 7 ήταν σταδίου III και IV, σύμφωνα με τη σταδιοποίηση κατά Scheuer (1). Τα περιστατικά με στεατοηπατίτιδα και αντιδραστική ηπατίτιδα (17 σε αριθμό) χρησιμοποιήθηκαν σαν περιστατικά ελέγχου και ήταν όλα αρνητικά για ιούς .

Οι τομές ήταν εγκλεισμένες σε παραφίνη.

Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές ασθενών με νόσο του Hodgkin , οι οποίες ήταν θετικές για τα p53, mdm-2, p21/waf1, ενώ για το bcl-2 χρησιμοποιήθηκαν τομές από ανθρώπινες αμυγδαλές. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές από τις οποίες παραλείφθηκε η τοποθέτηση αντισώματος.

Ζυμογραφία: Με τη μέθοδο της ζυμογραφίας μελετήθηκαν οι οροί 28 ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα (23 HCV θετικοί, 5 HBSAg θετικοί) προ και μετά θεραπεία με ιντερφερόνη (5MU ιντερφερόνη τρεις φορές την εβδομάδα επί 6 μήνες), για τα επίπεδα των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9. Για τις ίδιες μεταλλοπρωτεάσες μελετήθηκαν επίσης οι οροί 12 ασθενών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση. Ως ομάδα ελέγχου εχρησιμοποιήθηκαν 16 φυσιολογικά άτομα.

ELISA: Με τη μέθοδο ELISA μετρήθηκαν τα επίπεδα των πρωτεολυτικών ενζύμων του ορού 16 ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα (11 HCV θετικοί, 5 HbsAg DNA PCR θετικοί) και συγκρίθηκαν με 10 φυσιολογικούς μάρτυρες. Η μελέτη έγινε προ και μετά θεραπεία με ιντερφερόνη ως ανεφέρθη. Η ίδια μελέτη (εκτός της θεραπείας με ιντερφερόνη) έγινε για ορούς 12 ασθενών με PBC. 6 από αυτούς ήσαν στάδια I και II και 6 στάδια III και IV.

Μέθοδος

Ανοσοιστοχημεία: Η έκφραση των πρωτεϊνών mdm-2, p21/waf1, και bcl-2 μελετήθηκε με την ανοσοιστοχημική μέθοδο της αλκαλικής φωσφατάσης-αντιαλκαλικής φωσφατάσης (APAAP) ενώ η έκφραση της πρωτεΐνης p53 μελετήθηκε με τη μέθοδο της αλκαλικής φωσφατάσης (2). Από την αποκτηθείσα εμπειρία διαπιστώθηκε ότι η μέθοδος αυτή έχει υψηλότερη ευαισθησία και η χρώση της είναι

σαφώς καλύτερη και ευκρινέστερη σε σχέση με τη μέθοδο της υπεροξειδάσης και δεν έχει σημαντικές διαφορές με τη χρώση που παρατηρείται σε νωπούς ιστούς **(3)**.

Στάδιο 1- Αποπαραφίνωση και ενυδάτωση : Τα πλακίδια μπαίνουν σε ξηρό κλίβανο με αέρα στους 37 βαθμούς για 16 ώρες και στη συνέχεια στους 56 βαθμούς για 1 ώρα, με σκοπό να κολλήσει η τομή στο πλακίδιο και να καθαρίσει από την παραφίνη. Για την πλήρη αποπαραφίνωση τα πλακίδια εμβαπτίζονται σε 3 διαδοχικά λουτρά ξυλόλης για 5 λεπτά το καθένα. Για την ενυδάτωση γίνεται διαδοχική εμβάπτιση επί τρεις φορές σε διαδοχικές πυκνότητες οιοπνεύματος 100%,96%, 80%, 70% επί πέντε λεπτά την κάθε φορά.

Τεχνική αποκάλυψης του αντιγόνου: Μετα την αποπαραφίνωση και το ξέπλυμα σε απεσταγμένο νερό τα πλακίδια μπαίνουν σε φούρνο μικροκυμάτων τρεις φορές για πέντε λεπτά , εμβαπτισμένα σε διάλυμα εργασίας μικροκυμάτων. Το διάλυμα εργασίας παρασκευάζεται από κιτρικό νάτριο, κιτρικό οξύ και απεσταγμένο νερό και έχει pH = 6. Στο φούρνο μικροκυμάτων μένουν στα 750 W τα p53,bcl-2 και mdm-2 ενώ το p21/waf1 μένει στα 500W. Στα μεσοδιαστήματα της έκθεσης στον φούρνο μικροκυμάτων, μένουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος επί 10 λεπτά.

Η λογική της τοποθέτησης στο φούρνο μικροκυμάτων είναι αποκάλυψη των επιτόπων για διερεύνηση των πρωτεϊνών-αντιγόνων που πολλές φορές είναι πολύ δύσκολη στους ιστούς που είναι μονιμοποιημένοι σε φορμόλη **(4)**.

Προεπώαση : Στη συνέχεια γίνεται ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό και εμβάπτιση σε υλικό εργασίας TBS (Tris Buffer Saline pH 7,6). Το TBS παρασκευάζεται με 175,35 gr NaCl (3M) και 121,14 gr (1M) Tris για κάθε λίτρο διαλύματος το οποίο αραιώνεται 20 φορές. Η εμβάπτιση διαρκεί 5 λεπτά και γίνεται 2 φορές. Για την δέσμευση των μη ειδικών αντιγονικών παραγόντων του ιστού που θα μπορούσαν να προκαλέσουν μη ειδική χρώση, τα πλακίδια επωάζονται για 30 λεπτά σε υγρό θάλαμο με αντίσωμα από φυσιολογικό ορό κουνελιού (normal rabbit serum, DAKO X902), σε αραιώση 1:20 με TBS.

Επώαση με τα υπο μελέτη κύρια αντισώματα: Μετά την προηγούμενη επώαση, έγινε αφαίρεση του ορρού κουνελιού με τίναγμα του πλακιδίου και τοποθέτηση των κυρίως αντισωμάτων ως εξής:

P53, σε αραιώση 1/100 με TBS και επώαση για 1 ώρα

Bcl-2 σε αραιώση 1/20 με TBS και επώαση για 2 ώρες

Mdm-2 σε αραιώση 1/20 με TBS και επώαση over night

P21/waf1 σε αραιώση 1/25 και επώαση για 1 ώρα

Στα πιο πάνω αντισώματα προστίθεται και BSA (bovine serum albumin) σε αραιώση 1/100, το οποίο περιγράφεται ότι ενισχύει τη δράση του X902, δεσμεύοντας τις μη ειδικές αντιγονικές θέσεις . Αμέσως μετά, τα πλακίδια εμβαπτίζονται σε TBS δύο φορές για 5 λεπτά.

Τεχνική της αλκαλικής φωσφατάσης (AP) για την πρωτεΐνη p53: Στη συνέχεια γίνεται επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με την αλκαλική φωσφατάση (D314 ,DAKO)(rabbit anti mouse conjugated alkaline phosphatase immunoglobulin) σε αραιώση 1/50 με TBS και προσθήκη 1/20 BSA και επώαση για 30 λεπτά. Το δευτερογενές αντίσωμα συνδέεται με το κυρίως αντίσωμα και η συνδεδεμένη αλκαλική φωσφατάση ανιχνεύεται από το σύστημα υποστρώματος χρωμογόνου που είναι το επόμενο βήμα.

Τεχνική αλκαλικής – αντιαλκαλικής φωσφατάσης (APAAP): Για τις mdm-2, bcl-2, p21/waf1 εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλκαλικής - αντιαλκαλικής φωσφατάσης και διπλή ενίσχυση ως ακολούθως.

Το δευτεροταγές αντίσωμα που είναι rabbit anti mouse immunoglobulins (Z0259, DAKO) αραιώνεται 1/25 με το TBS και πρόσθεση BSA 1/20 και επώαση 30 λεπτών. Η λογική της χρησιμοποίησης αυτού του αντισώματος είναι για να αποτελέσει τον συνδετικό κρίκο μεταξύ του κυρίως αντισώματος (mouse monoclonal antibody) και του αντισώματος της επόμενης φάσης (mouse conjugated alkaline – antialkaline phosphatase Ig). Το αντίσωμα που αποτελεί τον συνδετικό κρίκο είναι από διαφορετικό είδος (rabbit anti-mouse) από τα είδη που είναι το κυρίως αντίσωμα και το αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με το σύμπλεγμα αλκαλικής –αντιαλκαλικής

φωσφατάσης(mouse). Ακολουθεί έκπλυση του Z0259 με TBS δύο φορές επί 5 λεπτά κάθε φορά και τοποθετείται το σύμπλεγμα αλκαλικής φωσφατάσης – αντιαλκαλικής φωσφατάσης (D0651, DAKO, mouse APAAP immunoglobulins) σε αραίωση 1/25 με TBS και προσθήκη BSA 1/20 και επώαση 30 λεπτών.

Διπλή ενίσχυση: Προκειμένου να επιτευχθεί ενίσχυση της αντίδρασης γίνεται επανάληψη της φάσης του δευτεροταγούς αντισώματος και του APAAP συμπλέγματος για να έχουμε εντονότερο χρώμα στη συνέχεια. Συγκεκριμένα γίνεται επανάληψη της επώασης με το δευτεροταγές αντίσωμα (Z0259) και APAAP συμπλέγματος (D0651) με 10 λεπτά χρόνο επώασης το καθένα και ξανά επανάληψη με Z0259 και D0651 για 5 λεπτά το καθένα. Δεν παραλείπεται στα ενδιάμεσα διαστήματα η έκπλυση με διάλυμα υλικού εργασίας (TBS).

Χρώση: Μετά το πέρας των προηγούμενων τεχνικών, τόσο για το p53 όσο και για τα υπόλοιπα αντισώματα γίνεται έκπλυση των πλακιδίων με TBS για 5 λεπτά, δύο φορές και επώαση για 30 λεπτά με το σύστημα υπόστρωμα –χρωμογόνο FAST RED DAKO, K699.

Ακολουθεί ξέπλυμα με άφθονο νερό βρύσης για 10 λεπτά και γίνεται εμβάπτιση σε διάλυμα αιματοξυλίνης 4-5 φορές. Ακολουθεί ξανά ξέπλυμα με άφθονο νερό για 10 λεπτά και τοποθετούνται καλυπτρίδες οι οποίες εφαρμόζουν με το glycergel στο πλακίδιο. Στη συνέχεια γίνεται ανάγνωση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων στο οπτικό μικροσκόπιο.

Μέθοδος TUNEL

Για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων εφαρμόστηκε η *in situ* σήμανση του κατακερματισμένου DNA το οποίο περιλαμβάνει ελεύθερα τα 3' OH άκρα. Η βασική αρχή στηρίζεται στη χρήση του ενζύμου πολυμεράση το οποίο αρχικά σχηματίζει 5' προεκτάσεις (*over hangs*) σε κάθε 3'OH άκρο και στην ακόλουθη κάλυψη των διακένων με ενσωμάτωση σημασμένων μονονουκλεοτιδίων. Τα στάδια αυτά ολοκληρώνονται με ανίχνευση των θέσεων με συστήματα ανοσοουπεροξειδάσης (5).

Η μέθοδος εφαρμόστηκε στο ηπατολογικό εργαστήριο της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Κόπηκαν τομές μονιμοποιημένες σε φορμόλη και εγκλεισμένες σε παραφίνη, πάχους 4μm και τοποθετήθηκαν σε πλακίδια *superfrost-plus* (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Οι τομές υπέστησαν αποπαραφίνωση δια μέσου ξυλόλης και κατιούσας οιοπνευμάτωσης, πλύθηκαν και επώαστηκαν (*digested*) με *proteinase K* για 15 λεπτά σε 23C. Στη συνέχεια πλύθηκαν και μπλοκαρίστηκαν από την ενδογενή υπεροξειδάση με 2% H₂O₂ για 5 λεπτά. Ακολούθησε προεπάση με *terminal transferase buffer* (200mM potassium cacodylate, 0.2 mM EDTA, 25 mM TRIS-HCL, bovine serum albumine 0.25 mg/ml, PH=6.6 (Boehringer Mannheim) για 10 λεπτά.

Ακολούθησε επώαση στους 37⁰C για 90 λεπτά με το ίδιο *buffer* στο οποίο προστέθηκε 1mM cobalt chloride (SIGMA), *terminal transferase* (0.5 U/μL) και 0.4 μM digoxigenin-11-deoxyuridine triphosphate (d-UTP), όλα προϊόντα της *Boehringer*. Η αντίδραση τερματίστηκε με διάλυμα 300mM sodium chloride και 30 mM sodium citrate και πλύσιμο των πλακιδίων. Ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε 2% bovine serum albumine (BSA) και 5 λεπτά σε phosphate buffered saline (PBS).

Η αποκάλυψη του ενσωματωμένου digoxigenin-11-dUTP επιτεύχθηκε με την επώαση με peroxidase conjugated Fab Fragments of anti-digoxigenine (*Boehringer*)

σε συγκέντρωση 1/300 σε 100mM TRIS-HCL, 150 mM NaCl pH=7.5 σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

Ακολούθως τα πλακάκια πλύθηκαν σε νερό και 0.1 M acetate buffer, pH=6, και εκτέθηκαν σε φρέσκοπαρασκευασμένη diaminobenzidine (DAB) 1%(Sigma), με επίταση απεικονίσεως με νικέλιο για 20 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε counterstaining με πράσινο του μεθυλενίου, αφυδάτωση και τοποθέτηση καλυπτρίδος. Στη συνέχεια μελετήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο.

Τόσο για τα αντισώματα όσο και για τη μέθοδο TUNEL για την μέτρηση των αποτελεσμάτων και την αξιολόγηση τους, μελετήθηκαν περιοχές της τομής γύρω από δύο πυλαία διαστήματα και δύο κεντρικές φλέβες, με X40. Υπολογίστηκε ως μέγιστος αριθμός ηπατοκυττάρων τα 400, και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν το ποσοστό των θετικών κυττάρων στη χρώση για τις υπο μελέτη πρωτείνες. Τα κύτταρα των κολποειδών δεν αξιολογήθηκαν ποσοτικά καθώς καμία μέθοδος δεν ήταν κατάλληλη για την αρίθμηση όλων των κυττάρων των κολποειδών σε κάθε τομή. Θετικές θεωρήθηκαν οι τομές που ήταν θετικές για τα p53, mdm-2, bcl-2, και p21/waf1, τουλάχιστον στο 10% των κυττάρων.

Ζυμογραφία: Τα προπαρασκευασμένα gels για τη ζυμογραφία τοποθετήθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης X-cell II Mini cell (BIO-RAD). Πριν από αυτό τα δείγματα ανθρωπίνου ορού αραιώθηκαν σε αναλογία 1:4 χρησιμοποιώντας φυσιολογικό ορό 0.9gr% NaCl . Το μείγμα συμπληρώθηκε με ίσο όγκο 5% w/v Tris Glycine SDS buffer pH6.8, και αφέθη να σταθεροποιηθεί για 10 λεπτά πριν τοποθετηθεί στο gel. Την ίδια ώρα η έτοιμη κασέτα του gel τέθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, και στο πάνω και κάτω μέρος του gel τοποθετήθηκε Tris-Glycine

0.1% SDS Running Buffer pH6.8. Συγκεκριμένα 10 μl δείγματος τοποθετήθηκαν σε κάθε gel και έτρεξαν στα 125 V voltage και ρεύμα 35mA/gel. Ο χρόνος τρεξίματος ήταν 100 λεπτά μέχρι η χρωστική σήμανσης κυανού της βρωμοφαινόλης να φτάσει στο τέρμα του gel..

Μετά το τέλος του τρεξίματος, το gel αποκολλήθηκε από την κασέτα και τοποθετήθηκε για μια ώρα στο διάλυμα επαναφοράς στη φυσιολογική κατάσταση που περιείχε 2.5%(v/v) TritonX-100, ένα μη ιονικό απορρυπαντικό που επιτρέπει την επαναφορά του ενζύμου στη φυσική του κατάσταση μετά την μετουσίωση που υφίσταται από το SDS. Τα gels έμειναν όλη τη νύκτα για σταθεροποίηση στους 37⁰C στο Buffer εμφάνισης (NOVEX) το οποίο προσθέτει ένα δισθενές μεταλλικό κατιόν που χρειάζεται για την ενζυματική δραστηριότητα. Μετά από αυτή τη διαδικασία το gel χρώστηκε με 0,5% (w/w) Coomassie R-250, σε 20% methanol και 10% acetate και αποχρωματίστηκε σε 20% MeOH, 10% AcOH (6).

ELISA: Οι MMPs υπολογίστηκαν με το σύστημα Biotrack ELISA. Τα δείγματα και τα standards ετοιμάστηκαν ακριβώς σύμφωνα με τις οδηγίες που συνόδευε το κάθε kit ELISA. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε για όλα τα kit στα 450nm όπως συνιστάται, και οι συγκεντρώσεις των MMPs μετρήθηκαν ακριβώς σύμφωνα με την καμπύλη των standard που γινόταν σε κάθε σειρά μετρήσεων.

Φωτογράφιση και ποσοτικοποίηση : Τα gels φωτογραφήθηκαν με τη χρήση της φωτογραφικής συσκευής BIORAD's GelDoc 1000, και οι μπάντες της ζελατίνης αναλύθηκαν με το Quantiscan densitometry software της εταιρείας BIOSOFT.

Στατιστική ανάλυση: Για τη σύγκριση των ποσοστών των θετικών κυττάρων ανάμεσα στις διαφορετικές νοσολογικές οντότητες που αφορούσαν τις ηπατίτιδες, την κίρρωση και τους μάρτυρες, λόγω των συχτίσεων που αφορά την παθογένεια των νόσων αυτών, χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney τεστ (7,8) (Πιν 1).

Για τη σύγκριση της συχνότητας θετικότητας μεταξύ των ιδίων ομάδων χρησιμοποιήθηκε το Fisher's exact test.

Όσον αφορά την στατιστική ανάλυση που αφορούσε την πρωτοπαθή χολική κίρρωση και τους μάρτυρες χρησιμοποιήσαμε την logit transformation with one way ANOVA και Kruskal-Wallis tests.

Για τη στατιστική αξιολόγηση της ζυμογραφίας και τον προσδιορισμό των μεταλλοπρωτεασών με ELISA χρησιμοποιήθηκε το Student-t- test είτε το απλό είτε το κατά ζεύγη (paired).

Για τη σύγκριση των τιμών μεταξύ ζυμογραφίας και ELISA χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία γραμμικής αναλύσεως με τη μέθοδο των ελαχίστων τατραγώνων (linear regression).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μέθοδος TUNEL

Θετικά θεωρήθηκαν για τη μέθοδο TUNEL, τα κύτταρα που είχαν διακεκομμένο περιφερικό δακτύλιο υπο μορφή μηνίσκου (φωτ.1) ή είχαν πυκνή χρώση (φωτ.2).

Σε όλες τις περιπτώσεις χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας, βρέθηκε μεγάλος αριθμός TUNEL θετικών κυττάρων, κυρίως στις περιοχές περιπυλαίας ηπατίτιδας (piecemeal

νέκρωση) (φωτ.1). Εξίσου μεγάλος αριθμός θετικών κυττάρων βρέθηκε εντός των ηπατικών λοβίων (φωτ.2). Ταυτοποιήθηκαν ακόμη θετικά κύτταρα των κολποειδών.

Επίσης μερικά θετικά κύτταρα βρέθηκαν εντός των πυλαίων περιοχών (φωτ.1).

Στα περιστατικά που αφορούσαν την πρωτοπαθή χολική κίρρωση βρέθηκαν αποπτωτικά κύτταρα σε όλες τις περιπτώσεις, είτε σε πρώιμο είτε σε όψιμο στάδιο.

Τόσο σε κύτταρα του επιθηλίου των χοληφόρων όσο και στα ηπατοκύτταρα γύρω από τα πυλαία διαστήματα διαπιστώθηκαν αποπτωτικά κύτταρα (φωτ.7 και 8).

Σε αντίθεση με τα πιο πάνω, δεν βρέθηκαν αποπτωτικά κύτταρα στις ομάδες ελέγχου.

Τόσο το Fisher's exact test όσο και το Mann-Whitney test δείχνουν μια στατιστικά σημαντική αύξηση των TUNEL θετικών κυττάρων ανάμεσα στις περιπτώσεις χρόνιας ηπατίτιδας και των μαρτύρων ($p=0.01$ και $p<0.001$ για τα δύο τεστ αντίστοιχα).

Έκφραση πρωτεϊνών p53, mdm-2, bcl-2, p21/waf1.

Έκφραση p21/waf1: Η πρωτεΐνη p21/waf1 εκφράστηκε τόσο στην βαρεία χρόνια ηπατίτιδα και την κίρρωση όσο και στην αντιδραστική ηπατίτιδα, αφού τα $\frac{3}{4}$ των ασθενών ήταν θετικά στην πρωτεΐνη αυτή (φωτ.5 και ΠινI). (Πρέπει να σημειώσουμε ότι όλα τα περιστατικά που ήταν θετικά για το p53 (δες κατωτέρω), ήταν επίσης θετικά και για το p21/waf1. Στα περιστατικά με στεατοηπατίτιδα και χρόνια ηπία ηπατίτιδα C, σημειώθηκε επίσης έκφραση του p21/waf1 αλλά στις μισές περιπτώσεις και σε λίγα κύτταρα (ΠινI).

Η σύγκριση των ομάδων με το Fishers exact test, έδειξε ότι δεν υπήρχαν διαφορές ανάμεσα στους ασθενείς και τους μάρτυρες στην έκφραση του mdm-2 και του p21/waf1, είτε όταν οι μάρτυρες συγκρίθηκαν ξεχωριστά (στεατοηπατίτιδες και

αντιδραστικές ηπατίτιδες) είτε όταν εξετάστηκαν ως μια ομάδα ($p=0,91$ και $p=0,79$ αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα για το mdm-2 και το p21/waf1 δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά.

Όμοια αποτελέσματα βρέθηκαν όταν τα ποσοστά των θετικών κυττάρων αναλύθηκαν με το Mann-Whitney test.

Στα περιστατικά με πρωτοπαθή χολική κίρρωση, 11 από τα 12 (92%) , ήταν θετικά (φωτ.11), σε σύγκριση με τους μάρτυρες που ήταν θετικοί 11/17 (65%). Το ποσοστό των ηπατοκυττάρων που εξέφρασαν το p21/waf1, ήταν μεταξύ 5%-30% (Πιν 1). Οι διαφορές δεν ήταν σημαντικές. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα 3 περιστατικά που το 30% των ηπατοκυττάρων ήταν θετικά, είχαν θετικό το anti-HCV. Τα κύτταρα των ηπατικών χοληφόρων ήταν αρνητικά στην PBC. Ο πίνακας 1 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης για την PBC.

Έκφραση p53: Δεν βρέθηκε κανένας θετικός πυρήνας σε καμία περίπτωση των μαρτύρων, ή στη χρόνια ηπία ηπατίτιδα C (φωτ.4). Αντίθετα περίπου το 1/3 των ασθενών με χρόνια βαρεία C και B ή κίρρωση (ΠινI) εξέφρασαν την πρωτεΐνη σε πολλούς πυρήνες, σε περιοχές με περιπυλαία ηπατίτιδα (piecemeal νέκρωση) (φωτ.4).

Υπήρχε σημαντική αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 ανάμεσα στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα και στους μάρτυρες ($p=0,05$ όταν οι μάρτυρες ελήφθησαν υπόψιν ως δύο ξεχωριστές ομάδες και $p=0,015$ όταν οι αντιδραστικές ηπατίτιδες και οι στεατοηπατίτιδες ελήφθησαν υπόψιν ως μία ομάδα). Η σημαντικότητα ήταν πιο ισχυρή όταν οι περιπτώσεις βαρείας ηπατίτιδας συγκρίθηκαν με την ομάδα ελέγχου.

Όμοια αποτελέσματα βρέθηκαν όταν τα ποσοστά των θετικών κυττάρων αναλύθηκαν με το Mann-Whitney test. Η έκφραση της p53 έδειξε μια στατιστική αύξηση ($p=0,01$).

Στα περιστατικά με πρωτοπαθή χολική κίρρωση, μόνο 2 περιπτώσεις (17%) εξέφρασαν την πρωτεΐνη (φωτ.10). Στις 2 θετικές περιπτώσεις θετικό ήταν το 5% και το 10% των ηπατοκυττάρων αντίστοιχα. Οι διαφορές στην PBC δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Επίσης τα κύτταρα των ηπατικών χοληφόρων ήταν αρνητικά για την p53.

Έκφραση bcl-2: Τα κύτταρα των κολποειδών και τα ηπατοκύτταρα ήταν σταθερά αρνητικά για την πρωτεΐνη bcl-2, είτε στις ηπατίτιδες είτε στις κίρρωσεις είτε στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση είτε στους μάρτυρες. Εντούτοις διαπιστώθηκαν θετικά λεμφοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν (φωτ.3).

Στα περιστατικά με PBC η έκφραση της bcl-2 στα κύτταρα των χοληφόρων ήταν διαφορετική σε σχέση με τους μάρτυρες. Η πρωτεΐνη εκφράστηκε ομοιογενώς σε όλα τα χολαγγεία των πυλαίων διαστημάτων σε όλες τις περιπτώσεις που αφορούσαν τους μάρτυρες, αλλά σε 7 από τις 12 περιπτώσεις της PBC, διαπιστώθηκε μια ασθενέστερη έκφραση της πρωτεΐνης σε μερικά επιθηλιακά κύτταρα των χολαγγείων (φωτ.9). Το εύρημα αυτό διαπιστώθηκε και στα 3 περιστατικά με πρόιμη PBC και στα 4 περιστατικά με όψιμη PBC. Στις υπόλοιπες (5/12) περιπτώσεις η έκφραση της πρωτεΐνης ήταν όπως και των μαρτύρων.

Έκφραση mdm-2: Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε σε λίγες περιπτώσεις που αφορούσαν ηπατίτιδες και κίρρωση (ΠινI, φωτ.6), κυρίως σε εκείνες τις περιπτώσεις

που η έκφραση του p53 ήταν σταθερά αρνητική (αντιδραστική ηπατίτιδα και χρόνια ηπία ηπατίτιδα). Η μόνη εξαίρεση ήταν στις στεατοηπατίτιδες όπου σε όλες εκτός μίας περίπτωσης η mdm-2 ήταν αρνητική και η p53 ήταν επίσης σταθερά αρνητική (ΠινI,II).

Η σύγκριση των ομάδων με το Fishers exact test , έδειξε ότι δεν υπήρχαν διαφορές ανάμεσα στους ασθενείς και τους μάρτυρες στην έκφραση του mdm-2 και του p21/waf1, είτε οι μάρτυρες συγκρίθηκαν ξεχωριστά (στεατοηπατίτιδες και αντιδραστικές ηπατίτιδες) είτε όταν εξετάστηκαν ως μια ομάδα ($p=0,91$ και $p=0,79$ αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα για το mdm-2 και το p21/waf1 δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά.

Όμοια αποτελέσματα βρέθηκαν όταν τα ποσοστά των θετικών κυττάρων αναλύθηκαν με το Mann-Whitney test.

Στις περιπτώσεις PBC 2 από τις 12 περιπτώσεις (17%), ήταν θετικές, αλλά μόνο στο 5% των ηπατοκυττάρων. Στο συνολικό αριθμό των μαρτύρων (στεατοηπατίτις και αντιδραστική ηπατίτις) , 3/17 ήταν θετικοί(18%). Τα κύτταρα των ηπατικών χοληφόρων ήταν αρνητικά.

ELISA

Χρόνιες ηπατίτιδες

Τα αποτελέσματα για τις διάφορες ομάδες είχαν ως ακολούθως:

α) Επίπεδα MMP-1 (κολλαγενάση).

Μάρτυρες : 121.79 +/- 18.31 SE ng/ml

Χρόνια ηπατίτιδα C: 50.85 +/- 12.31 ng/ml προ θεραπείας με ιντερφερόνη. $p < 0.02$

71.52 +/- 12.15 ng/ml μετά θεραπεία με ιντερφερόνη. NS

Χρόνια ηπατίτιδα B: 117.91 +/- 43.8 ng/ml προ θεραπείας με ιντερφερόνη. NS

78.34 +/- 16.99 ng/ml μετά θεραπεία με ιντερφερόνη. NS

Χρόνια ηπατίτιδα B + C συνολικά πρό θεραπείας : $p < 0.02$

Χρόνια ηπατίτιδα B + C συνολικά μετά θεραπεία : $p < 0.05$

Παρατηρήσεις : Στη χρόνια ηπατίτιδα C τα επίπεδα της MMP-1 είναι σημαντικά μειωμένα σε σχέση με τους μάρτυρες, και αυξήθηκαν ελαφρά αλλά χωρίς στατιστική σημαντικότητα μετά τη θεραπεία με ιντερφερόνη.

Στη χρόνια ηπατίτιδα B τα επίπεδα ήταν σχεδόν ίδια με τους μάρτυρες και μειωμένα αλλά χωρίς στατιστική σημαντικότητα μετά θεραπείαν.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα εμφανίζονται στις εικόνες 1 και 2.

β) Επίπεδα MMP-2

Μάρτυρες : 1554.79 +/- 132.61 SE ng/ml

Χρόνια ηπατίτιδα C: 1104.63 +/- 84.55 ng/ml προ θεραπείας $p < 0.05$

1204.692 +/- 97.55 ng/ml μετά θεραπείαν $p < 0.02$

Χρόνια ηπατίτιδα B: 770.24 +/- 119.11 ng/ml προ θεραπείας $p < 0.002$

869.94 +/- 176.51 ng/ml μετά θεραπείαν $p < 0.01$

Χρόνια ηπατίτιδα B + C συνολικά πρό θεραπείας : $p < 0.01$

Χρόνια ηπατίτιδα B + C συνολικά μετά θεραπεία : $p<0.005$

Παρατηρήσεις : Τα επίπεδα στη χρόνια ηπατίτιδα C είναι χαμηλότερα σε σχέση με τους μάρτυρες και αυξήθηκαν ελαφρώς μετά θεραπεία με ιντερφερόνη χωρίς στατιστική σημαντικότητα.

Στη χρόνια ηπατίτιδα B τα επίπεδα είναι σχεδόν τα μισά των μαρτύρων και αυξάνονται ελαφρά χωρίς στατιστική σημαντικότητα μετά θεραπεία.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα εμφανίζονται στις εικόνες 3 και 4.

γ)Επίπεδα MMP-3

Μάρτυρες : 23.47 +/- 5.28 SE ng/ml

Χρόνια ηπατίτιδα C: 21.32 +/-7.58 ng/ml προ θεραπείας NS

19.13 +/-5.6 ng/ml μετά θεραπεία NS

Χρόνια ηπατίτιδα B: 30.41 +/- 7.76 SE ng/ml προ θεραπείας NS

41.38 +/- 7 ng/ml μετά θεραπεία NS

Χρόνια ηπατίτιδα B + C συνολικά πρό θεραπείας : NS

Χρόνια ηπατίτιδα B + C συνολικά μετά θεραπεία : NS

Παρατηρήσεις: Τα επίπεδα είναι περίπου τα ίδια με τους μάρτυρες με ελαφρά μείωση χωρίς στατιστική σημαντικότητα μετά θεραπεία, στη χρόνια ηπατίτιδα C.

Στη χρόνια ηπατίτιδα Β τα επίπεδα είναι μεγαλύτερα από των μαρτύρων και αυξάνονται ακόμη περισσότερο μετά θεραπεία, αλλά οι διαφορές δεν είναι στατιστικώς σημαντικές.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα στις εικόνες 5 και 6.

δ) Επίπεδα MMP-9

Μάρτυρες : 65.14 +/- 9.39 SE ng/ml

Χρόνια ηπατίτιδα C: 25.99 +/- 4.77 ng/ml προ θεραπείας p<0.001

24.47 +/- 6.38 ng/ml μετά θεραπεία p<0.001

Χρόνια ηπατίτιδα B: 23.08 +/- 8.79 ng/ml προ θεραπείας p<0.001

16.33 +/- 3.61 ng/ml μετά θεραπεία p<0.001

Χρόνια ηπατίτιδα B + C συνολικά πρό θεραπείας : p<0.001

Χρόνια ηπατίτιδα B + C συνολικά μετά θεραπεία p<0.001

Παρατηρήσεις: Τα επίπεδα στη χρόνια ηπατίτιδα C είναι πολύ χαμηλότερα των μαρτύρων και σχεδόν το ίδιο χαμηλά μετά θεραπεία με ιντερφερόνη.

Στην χρόνια ηπατίτιδα Β τα επίπεδα είναι πολύ χαμηλότερα των μαρτύρων και ακόμη χαμηλότερα μετά θεραπεία.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα στις εικόνες 7 και 8.

Πρωτοπαθής χολική κίρρωση

α) Επίπεδα MMP-1

Μάρτυρες : 121.79 +/- 18.31 SE ng/ml

PBC: 114.17 +/- 18.86 ng/ml

Παρατηρήσεις: Ουδεμία στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.05$) (Εικ 13).

β) Επίπεδα MMP-2

Μάρτυρες : 1554.79 +/- 132.61 SE ng/ml

PBC: 883.9 +/- 62.75 ng/ml

Παρατηρήσεις: Λίαν στατιστικώς σημαντικό ($p < 0.001$) (Εικ14).

γ) Επίπεδα MMP-3

Μάρτυρες : 23.47 +/- 5.28 SE ng/ml

PBC: 18.61 +/- 1.92 ng/ml

Παρατηρήσεις: Ουδεμία στατιστική σημαντικότητα (Εικ15).

δ) Επίπεδα MMP-9

Μάρτυρες : 65.14 +/- 9.39 SE ng/ml

PBC: 22.01 +/- 2.19 ng/ml

Παρατηρήσεις: Λίαν στατιστικώς σημαντικό ($p < 0.001$) (Εικ16).

Ζυμογραφία

Χρόνιες ηπατίτιδες

α) Επίπεδα MMP-2

Μάρτυρες : 426.08 +/-14.78 SE ng/ml

Χρόνια ηπατίτιδα C: 326.05 +/-18.03 ng/ml προ θεραπείαν $p<0.001$

303.67 +/-15.94 ng/ml μετά θεραπείαν $p<0.001$

Χρόνια ηπατίτιδα B: 342.07 +/- 13.11 ng/ml προ θεραπείαν $p<0.002$

287.99 +/- 11.7 ng/ml μετά θεραπείαν $p<0.001$

Χρόνια ηπατίτιδα B + C συνολικά πρό θεραπείας : $p<0.001$

Χρόνια ηπατίτιδα B + C συνολικά μετά θεραπεία $p<0.001$

Παρατηρήσεις: Τα επίπεδα στη χρόνια ηπατίτιδα C είναι χαμηλότερα σε σχέση με τους μάρτυρες και ελαφρώς πιο μειωμένα μετά θεραπείαν.

Στη χρόνια ηπατίτιδα B τα επίπεδα είναι μειωμένα σε σχέση με τους μάρτυρες και περισσότερο μειωμένα μετά θεραπείαν.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα στις εικόνες 9 και 10.

β) Επίπεδα MMP-9

Μάρτυρες : 5.6 +/- 0.32 SE ng/ml

Χρόνια ηπατίτιδα C: 2.5 +/-0.24 ng/ml προ θεραπείαν $p<0.001$

2.13 +/- 0.22 ng/ml μετά θεραπείαν $p<0.001$

Χρόνια ηπατίτιδα B: 2.6 +/- 0.44 ng/ml προ θεραπείαν $p<0.001$

1.41 +/- 0.18 ng/ml μετά θεραπείαν $p<0.001$

Χρόνια ηπατίτιδα B + C συνολικά πρό θεραπείας : $p<0.001$

Χρόνια ηπατίτιδα B + C συνολικά μετά θεραπεία $p<0.001$

Παρατηρήσεις :Τα επίπεδα στη χρόνια ηπατίτιδα C είναι πολύ μειωμένα σε σχέση με τους μάρτυρες και μειώνονται περισσότερο μετά θεραπεία.

Στη χρόνια ηπατίτιδα B είναι περίπου τα μισά των μαρτύρων και μειώνονται ακόμα περισσότερο μετά θεραπεία.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα στις εικόνες 11 και 12.

Πρωτοπαθής χολική κίρρωση

α) Επίπεδα MMP-2

Μάρτυρες : 426.08 +/- 14.78 SE ng/ml

PBC: 286.17 +/- 19.86 ng/ml

Παρατηρήσεις : Λίαν στατιστικώς σημαντικό ($p < 0.001$) (Εικ17).

β) Επίπεδα MMP-9

Μάρτυρες : 5.6 +/- 0.32 SE ng/ml

PBC: 3.4 +/- 0.29 ng/ml

Παρατηρήσεις : Λίαν στατιστικώς σημαντικό ($p < 0.001$) (Εικ18).

Συσχέτιση των μεθόδων ζυμογραφίας και ELISA

Η σύγκριση του συνόλου των περιστατικών (μάρτυρες, χρόνια ηπατίτιδα, πρωτοπαθής χολική κίρρωση) που μετρήθηκαν με ELISA και ζυμογραφία έδειξε σημαντική συσχέτιση τόσο για την MMP-2 (Εικόνα 19), όσο και για την MMP-9 (Εικόνα 20). Η συσχέτιση παρέμεινε όταν εξετάστηκαν χωριστά οι ομάδες:

Μάρτυρες : MMP-2 $r=0.23$, $p < 0.001$

MMP-9 $r=0.65$, $p < 0.001$

PBC: MMP-2 $r=0.43$, $p=0.05$

MMP-9 $r=0.58$, $p<0.001$

Χρόνια ηπατίτιδα: MMP-2 $r=0.04$, p NS

MMP-9 $r=0.43$, $p<0.001$

Μοναδική εξαίρεση ήταν η MMP-2 στη χρόνια ηπατίτιδα όπου το r ήταν 0.04 και δεν υπήρχε συσχέτιση.

Συζήτηση

Οι ηπατοτρόποι ιοί B, C, D, και οι νεοπεριγραφέντες TTV και G δεν θεωρούνται κυτταροτοξικοί και ο μηχανισμός καταστροφής των ηπατοκυττάρων στη χρόνια ηπατίτιδα αλλά και στη κίρρωση και την πρωτοπαθή χολική κίρρωση παραμένει άγνωστος. Στόχος της εργασίας αυτής είναι να ελέγξει δύο από τους τρεις πιθανούς μηχανισμούς καταστροφής, δηλαδή την απόπτωση, την καταστροφή μέσω κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων και την απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων από τα κύτταρα του Kupffer.

Η απόπτωση μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας **(9)**. Εντούτοις, οι μηχανισμοί που προκαλούν την απόπτωση είναι πολύπλοκοι και όχι πλήρως κατανοητοί. Γονίδια όπως το p53, p21/waf1, Fas και ο TNFα με την ενεργοποίησή τους αυξάνουν την απόπτωση, ενώ άλλα όπως το bcl-2 και το mdm-2 αναστέλλουν την απόπτωση υπο ορισμένες προϋποθέσεις **(9)**.

Επιπρόσθετα, πρωτεΐνες τόσο του HBV όσο και του HCV, μπορούν να επηρεάσουν την αποπτωτική διαδικασία **(9)**.

Το Fas, ένα μόριο το οποίο εμπλέκεται στην επαγωγή της απόπτωσης, υπερεκφράζεται στις μεμβράνες των ηπατοκυττάρων σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα, στις περιοχές με περιπυλαία νέκρωση (piecemeal) και διήθηση από λεμφοκύτταρα κατά τις λοιμώξεις με HBV και HCV, ένα γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει κατά κάποιο τρόπο την παθογένεση του ηπατοκυτταρικού θανάτου. Το Fas-ligand εκφράζεται στην μεμβράνη των διηθητικών λεμφοκυττάρων αλλά όχι στα ηπατοκύτταρα. Το Fas εκφράζεται πιο συχνά στην οξεία ιογενή ηπατίτιδα **(10-16)**.

Ο ρόλος του Fas έχει αποδειχτεί πειραματικά. Η χορήγηση anti-Fas οδηγεί σε μαζικό θάνατο ηπατοκυττάρων στα ποντίκια **(17)** και η απόπτωση που γίνεται δια της μεσολάβησης του Fas, επιβεβαιώθηκε in vitro σε ενεργοποιημένες κυτταρικές σειρές

(18). Ο TNFα μπορεί να προκαλέσει απόπτωση ενώ η πρωτεΐνη core του HCV, έχει βρεθεί ότι δρα σαν ένας ενεργοποιητής μέσω της αλληλεπίδρασης της με το κυτταροπλασματικό άκρο του υποδοχέα TNF 1 **(19)**. Όμως έχει βρεθεί ότι και το αντίθετο μπορεί να ισχύει. Η έκφραση της core πρωτεΐνης του HCV σε άλλα ανθρώπινα κύτταρα και κύτταρα τρωκτικών αναστέλλει την απόπτωση που προκαλείται από την cis-πλατίνη και το c-myc **(20)**. Επιπλέον, η πρωτεΐνη core του HCV εδείχθη ότι καταστέλλει την δραστηριότητα του p21/waf1 και φαίνεται ότι μειώνει την προαγωγή του κυτταρικού θανάτου **(20)**.

Μια άλλη πρωτεΐνη του HCV, η NS3, έχει επίσης αποδειχθεί ότι καταστέλλει την απόπτωση αναστέλλοντας την έκφραση του p53, ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, επαγωγέα της απόπτωσης. Η NS3 δεν έχει καμία δράση πάνω στο μηχανισμό δράσης του p21/waf1 **(21)**.

Σε μια πρόσφατη μελέτη, εξετάστηκαν σχετικά με την απόπτωση 38 ασθενείς με χρόνια HBV ηπατίτιδα **(22)**. Βρέθηκε ότι σε 14/17 περιπτώσεις με ήπιες αλλοιώσεις ή χωρίς περιτυλαία νέκρωση η χρώση TUNEL ήταν αρνητική ή ασθενώς θετική. Η έκφραση του Fas βρέθηκε σε λίγα κύτταρα σε αυτές τις περιπτώσεις. Αντίθετα, 3/14 περιπτώσεις με ενεργό ηπατίτιδα και κίρρωση αρχικού σταδίου, ήταν εντόνως θετικές με τη μέθοδο TUNEL και σε 9/14 των περιπτώσεων, η πρωτεΐνη Fas εκφράστηκε έντονα στα ηπατοκύτταρα. Απόπτωση διαπιστούμενη με τη μέθοδο TUNEL περιγράφηκε να συμβαίνει σε μεγαλύτερο βαθμό στην HCV και HBV χρόνια ηπατίτιδα παρά στην αλκοολική νόσο του ήπατος και την αιμοχρωμάτωση **(23)**. Σημαντικά αυξημένη απόπτωση με την ίδια μέθοδο βρέθηκε ότι συμβαίνει και στη δική μας μελέτη. Αυτά τα αποτελέσματα πρέπει να εξεταστούν με προσοχή καθότι έχουν περιγραφεί ψευδώς θετικά αποτελέσματα με τη μέθοδο TUNEL σε ηπατικό ιστό, που πρέπει να έχει σχέση με το χρόνο επώασης με την πρωτεϊνάση K **(24)** αν

και αναφέρεται ως αξιόπιστη μέθοδος εντόπισης του κλασματοποιημένου DNA των αποπτωτικών κυττάρων στα αρχικά στάδια της απόπτωσης καλύτερα παρα το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (25,26). Επιπλέον ανακοινώθηκε αδυναμία της μεθόδου TUNEL να διακρίνει την απόπτωση, τη νέκρωση και την αυτόλυση (27,28). Εντούτοις τα ευρήματα της αυξημένης απόπτωσης στη δική μας μελέτη διαπιστωμένης με την μέθοδο TUNEL, συσχετίζονται με την αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης p53, η οποία μπορεί και επάγει την απόπτωση κάτω από συγκεκριμένες καταστάσεις. Είναι λοιπόν βέβαιο ότι η αποπτωτική διαδικασία υπερλειτουργεί στην χρόνια ενεργό ηπατίτιδα.

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στις ιστολογικές τομές εκφράζεται το μεταλλαγμένο ή συνδεδεμένο με κάποια πρωτεΐνη p53 και οι θετικές περιπτώσεις που αναφέρονται αφορούν αυτό το p53. Όμως είναι πολύ λογικό να υποθέσει κανείς ότι και το φυσικού τύπου είναι αυξημένο, αλλά αυτό δεν αναδεικνύεται στην παρούσα μελέτη.

Η κατάσταση σχετικά με την HBV λοίμωξη δεν έχει ξεκαθαρίσει. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το HbxAg σχετίζεται με την πρωτεΐνη p53 προκαλώντας ένα λειτουργικό έλλειμμα της τελευταίας (9). Ως αποτέλεσμα έχουμε γονιδιακή αστάθεια, απουσία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, μείωση της απόπτωσης και εξαιτίας αυτού μειωμένη εξαφάνιση των προσβεβλημένων από τον HBV κυττάρων (9). Αυτό, δυνατόν να οδηγήσει σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο (HCC) (29,30). Παρόλα αυτά, σε μια μελέτη Κινέζων ασθενών για ηπατοκυτταρικό καρκίνο, δεν βρέθηκε HBx πρωτεΐνη σε σχέση με το p53. Αντίθετα, οι μεταλλαγές του p53, ήταν πολύ συχνές (31). Αντίθετα αποτελέσματα περιγράφηκαν σε διαγονιδιακά (transgenic) ποντίκια, όπου η πρωτεΐνη HBx οδήγησε σε αύξηση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, όταν δεν εκφραζόταν το p53 (32).

Σε άλλη μελέτη, δεν βρέθηκε καμία έκφραση του p53 σε κανονικό ήπαρ ή σε ήπαρ με χρόνια ηπατίτιδα. Το p53 βρέθηκε μόνο σε 3 από τους 21 κίρρωτικούς ασθενείς που εξετάστηκαν **(33)**. Τα ίδια αποτελέσματα περιγράφηκαν σε μια άλλη μελέτη, όπου το πυρηνικό p53 δεν βρέθηκε σε ασθενείς με χρόνια ηπατοπάθεια **(34)**. Ασθενής κυτταροπλασματική χρώση βρέθηκε μόνο σε μία περίπτωση με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα. Αντίθετα στη δική μας μελέτη, υπερέκφραση του p53 σημειώθηκε στις περιπτώσεις με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β και C, την στιγμή που καμία έκφραση δεν σημειώθηκε στις στεατοηπατίτιδες και τις περιπτώσεις με μικρού βαθμού φλεγμονή. Η διαφορά με τις προηγούμενες αναφορές δεν είναι ξεκαθαρισμένη. Η ειδικότητα του αντιγόνου που χρησιμοποιείται και/ή κατάσταση της μονιμοποίησης (fixation) θα μπορούσαν να εξηγήσουν αυτή τη διαφορά. Σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα, αύξηση της απόπτωσης, τουλάχιστον κατά ένα μέρος, θα μπορούσε να συσχετίζεται με την αύξηση του φυσικού τύπου (wt) p53, αφού όλες οι περιπτώσεις που είναι θετικές για το p53 είναι επίσης θετικές για το p21. Πράγματι, είναι καλά τεκμηριωμένο ότι το wt p53, επάγει την έκφραση του p21 ενώ το μεταλλαγμένο δεν την προάγει **(35,36)**. Παρόλα αυτά πολλές περιπτώσεις στη δική μας μελέτη έδειξαν έκφραση του p21 με υπερέκφραση του μεταλλαγμένου p53, πράγμα που μπορεί να υποδηλώνει επαγωγή του p21 ανεξάρτητη του p53 **(35,36)**. Το p21/waf1 βρέθηκε στο ήπαρ και στις περιπτώσεις στεατοηπατίτιδας. Στην ηπατίτιδα C έχει βρεθεί μια υπερέκφραση του p21/waf1 και συσχετίστηκε με το βαθμό της φλεγμονής και την ίνωση **(37)**. Αν και 7/19 των περιπτώσεων μας είχαν μια μεγαλύτερη έκφραση του p21/waf1 από τους μάρτυρες αυτό δεν φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντικό.

Έχει επίσης περιγραφεί ότι η de novo επαγωγή του p53 σε κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκίνου που δεν εκφράζουν εξαρχής την πρωτεΐνη p53 λόγω

μεταλλαγών (deletion) στο γονίδιο του p53 , οδηγεί σε υπερέκφραση και του p21/waf1 και του bax και αυξάνει την απόπτωση **(38,39)**.

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο mdm-2 αναστέλλει τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης p53, αποκρύβοντας το transactivation domain της, αναστέλλοντας έτσι την απόπτωση με μια αρνητική feed back αγκύλη **(40,41,42)**. Δεν είναι ξεκάθαρο εάν μια τέτοια αγκύλη επενεργεί και στην χρόνια ιογενή ηπατίτιδα, αφού τα δικά μας αποτελέσματα δεν έδειξαν αύξηση του mdm-2 στις περιπτώσεις των χρονίων ηπατιτίδων εν σχέσει προς την ομάδα ελέγχου, ανεξάρτητα από το βαθμό φλεγμονής.

Προηγούμενες αναφορές έδειξαν ότι η bcl-2 πρωτεΐνη βρέθηκε μόνο στα ηπατικά χοληφόρα και στο επιθήλιο των μικρών χοληφόρων **(43,44)**. Σε μια μελέτη με 19 ασθενείς με ηπατίτιδα C, η έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 βρέθηκε στα ηπατικά χοληφόρα, στα διηθητικά μονοπύρηνια και στα κύτταρα των κολποειδών **(45)**. Μόνο 2/9 από τις περιπτώσεις με χρόνια ηπατίτιδα εξέφρασαν την bcl-2 στα ηπατοκύτταρα. Εντούτοις, 9/10 των περιπτώσεων κίρρωτικών ασθενών εξέφρασαν την bcl-2 στα ηπατοκύτταρα το ίδιο καλά **(45)**. Εμείς δεν επιβεβαιώσαμε αυτά τα αποτελέσματα. Είτε στις ηπατίτιδες είτε στις κίρρωσεις, το bcl-2 εκφράστηκε μόνο στα κύτταρα των ηπατικών χοληφόρων και στα μονοπύρηνια κύτταρα που διηθούν τα πυλαία διαστήματα ή τα λόβια.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα μας σχετικά με την αυξημένη απόπτωση των ηπατοκυττάρων στη χρόνια ιογενή ηπατίτιδα , αν τα πάρουμε μαζί με προηγούμενες αναφορές **(10-16)** σχετικά με τις ηπατίτιδες, παρέχουν ενδείξεις υπερλειτουργίας της απόπτωσης σε βαρεία ιογενή ηπατική φλεγμονή. Θα μπορούσε να υποθεθεί ότι η αδυναμία των ηπατοκυττάρων να αυξήσουν την έκφραση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η bcl-2, είναι υπεύθυνη για τον αυξημένο ρυθμό απόπτωσης. Αυξημένη απόπτωση συμβαίνει επίσης και την κίρρωση (p53+/p21+) σε σύγκριση με

την αντιδραστική ηπατίτιδα (p53-/p21+) την στεατοηπατίτιδα (p53-/p21+) και το φυσιολογικό ήπαρ. Επιπλέον ο p53+/p21+ φαινότυπος των ηπατοκυττάρων στις περισσότερες περιπτώσεις χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας και ιογενούς κίρρωσεως προτείνει μια υπερέκφραση και της wild type p53 πρωτεΐνης, που μπορεί να σχετίζεται με την εκτέλεση του αποπτωτικού προγράμματος.

Λίαν ενδιαφέροντα είναι και τα ευρήματα ως προς την πρωτοπαθή χολική κίρρωση όπου είναι πολύ περιορισμένες οι γνώσεις γύρω από την απόπτωση των κυτταρικό κύκλο, και τις πρωτεΐνες που εκφράζουν τα γονίδια p53 και mdm-2.

Από το 1983 και μετά, η απόπτωση περιγράφηκε σαν μηχανισμός καταστροφής των χοληφόρων στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση (46). Στην PBC αποπτωτικά σωμάτια περιγράφηκαν στη στοιβάδα των χοληφόρων από την συμβατική ιστολογία. Εντούτοις συγκρουόμενα αποτελέσματα ενεφανίσθησαν σε κάποιες λεπτομερέστερες μελέτες για την απόπτωση στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση (47-50,33). Γιαυτό ακριβώς το λόγο, στη δική μας μελέτη χρησιμοποιήσαμε και την μέθοδο TUNEL και την ανοσοιστοχημική μελέτη πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απόπτωση.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας, αποδεικνύουν αυξημένη απόπτωση τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων όσο και στα ηπατοκύτταρα, όπως έδειξε η μέθοδος TUNEL. Τα ευρήματα ήταν τα ίδια και στα πρώιμα και στα όψιμα στάδια.

Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με μια πρόσφατη αναφορά στην οποία αναφέρεται αυξημένος ρυθμός της απόπτωσης που εντοπίστηκε με την ίδια μεθοδολογία (47).

Παρόμοια αποτελέσματα, αναφέρθηκαν επίσης σε μια άλλη σειρά 35 περιπτώσεων με PBC, όπου βρέθηκε αυξημένη κλασματοποίηση του DNA στα κύτταρα των ηπατικών χοληφόρων σε σχέση με τους ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα C ή φυσιολογικό ήπαρ (48).

Ανεφέρθησαν όμως και διαφορετικά αποτελέσματα σε μια πρόσφατη αναφορά (49). Σε 9 περιπτώσεις πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης αρχικού σταδίου, εντοπίστηκε απόπτωση μόνο στα φλεγμονώδη κύτταρα των πυλαίων διαστημάτων και των κυττάρων των κολποειδών, όπως και στα ηπατοκύτταρα. Αντίθετα, μόνο 4 κύτταρα χοληφόρων σε 3 βιοψίες παρείχαν ένδειξη απόπτωσης (33). Αν και ο λόγος αυτής της αντίθεσης δεν είναι ξεκαθαρισμένος, πρέπει να λάβουμε υπόψιν την τεχνική της κάθε περίπτωσης και τον τρόπο μονιμοποίησης κάθε φορά.

Όσον αφορά τη μελέτη έκφρασης των γονιδίων p53 και mdm-2 στην PBC, όπως έχει αναφερθεί οι γνώσεις είναι περιορισμένες. Αντίθετα, πολλά ηπατοκύτταρα ήταν θετικά στην έκφραση του waf1/p21, αν και δεν φαινόταν ουσιαστικές διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες. Τα ίδια αποτελέσματα για το p53 ανακοινώθηκαν πρόσφατα σε άλλες ηπατικές νόσους. Καμία περίπτωση δεν ήταν θετική για το p53 στις χρόνιες ηπατίτιδες και μόνο 3/21 περιπτώσεις κίρρωτικών ασθενών ήταν θετικές (33). Μόνο τα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα ήταν σταθερά και εντόνως θετικά.

Ο ανοσοφαινότυπος των ηπατικών χοληφόρων στη πρωτοπαθή χολική κίρρωση είναι p53 αρνητικός, mdm-2 αρνητικός, p21/waf1 αρνητικός και για τα ηπατοκύτταρα είναι p53 αρνητικός mdm-2 αρνητικός και p21/waf1 θετικός. Αυτός ο φαινότυπος δείχνει μάλλον ότι είτε το p21/waf1 εκφράζεται σαν συνεπακόλουθο της κανονικής από το p53 εξαρτώμενης οδού π.χ το p53 γονίδιο είναι στην κανονική wild type μορφή ή/και ότι το p21/waf1 εκφράζεται δια μέσου μιας p53 ανεξάρτητης οδού (35,36). Σε οποιαδήποτε περίπτωση την στιγμή που ο ανοσοφαινότυπος των ηπατικών χοληφόρων είναι αρνητικός και για τις τρεις πρωτεΐνες, ο μηχανισμός της απόπτωσης των ηπατικών χοληφόρων στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση δεν πρέπει μάλλον να επάγεται από το p53.

Υπάρχουν τρεις άλλοι πιθανοί μηχανισμοί που μπορούν να εξηγήσουν την απόπτωση των ηπατικών χοληφόρων στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση. Το CD95-CD95ligand που εμπλέκεται στην απόπτωση είναι η πρώτη πιθανότητα, και η αυξημένη έκφραση του CD95 στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων έχει ανακοινωθεί για την PBC (47,50). Ένας δεύτερος μηχανισμός που πιθανόν να εμπλέκεται, είναι η σερινική πρωτεάση granzyme B των κοκκίων, που απελευθερώνονται από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα και μπορεί να προκαλέσει απόπτωση όταν εισέλθει εντός των κυττάρων (51). Στην ίδια εργασία τα κύτταρα των ηπατικών χοληφόρων που ήταν θετικά για granzyme B ήταν χαρακτηριστικά της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης (25). Ένας τρίτος μηχανισμός που θα μπορούσε να εμπλέκεται στον μηχανισμό της απόπτωσης είναι τα χολικά άλατα τα οποία οδηγούν *in vitro* σε απόπτωση τα απομονωμένα ηπατοκύτταρα (52,53).

Ενδιαφέρον έχουν τα αποτελέσματα μας όσον αφορά την πρωτεΐνη bcl-2 στην PBC. Στο φυσιολογικό ήπαρ φαίνεται ότι η πρωτεΐνη bcl-2 εκφράζεται στα κύτταρα των ηπατικών χοληφόρων αλλά όχι στα ηπατοκύτταρα (43). Εν τούτοις πρόσφατα ανακοινώθηκε έκφραση της bcl-2 σε ηπατοκύτταρα ποντικών, που τους έγινε απολίνωση των ηπατικών χοληφόρων (54).

Στα δικά μας περιστατικά βρέθηκε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2, ήταν χαρακτηριστικό και των λεμφοκυττάρων των πυλαίων διαστημάτων και των ενδολοβιακών λεμφοκυττάρων. Κανένα ηπατοκύτταρο όμως δεν εξέφρασε την πρωτεΐνη bcl-2. Με τα δικά μας αποτελέσματα συμφωνούν και άλλες μελέτες, που μιλούν για μη έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 στα ηπατοκύτταρα, σε μια ποικιλία νόσων του ήπατος στον άνθρωπο (43). Τα αποτελέσματα αυτά διαφέρουν από τα ευρήματα μιας πρόσφατης ανακοίνωσης που μιλά για *de novo* έκφραση της bcl-2 σε ηπατοκύτταρα ασθενών με PBC (48). Δεν είναι ξεκάθαρος ο λόγος αυτής της

αντίθεσης. Η ειδικότητα του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε πιθανόν να εξηγεί αυτή την διαφορά δεδομένου ότι χρησιμοποιήσαμε διαφορετικό αντίσωμα από των Koga et al (48).

Ασθενής έκφραση του bcl-2 σε μερικά ενδολοβιακά ηπατικά χοληφόρα σε σύγκριση με το κανονικό ήπαρ ή τις στεατοηπατίτιδες, βρέθηκε στους δικούς μας ασθενείς με PBC. Αυτό είναι σε συμφωνία με μια άλλη μελέτη που μιλά για μη έκφραση του bcl-2 σε κανένα ηπατικό χοληφόρο(bile duct) η ductule στην PBC (50).

Την στιγμή που φαίνεται ότι η πρωτεΐνη αυτή συντείνει στο πλεονέκτημα επιβίωσης μιας ποικιλίας κυτταρικών τύπων, αναστέλλοντας την απόπτωση που επιφέρει μια ποικιλία ερεθισμάτων (15,55), φαίνεται λογικό να υποθεθεί ότι ανεξάρτητα από τον μηχανισμό της απόπτωσης, αυτά τα ευρήματα, μπορούν να εξηγήσουν τουλάχιστον κατά ένα μέρος την αυξημένη απόπτωση που συμβαίνει στα κύτταρα των χοληφόρων των ασθενών μας. Είναι ενδιαφέρον ότι μια ίδια προς τα κάτω ρύθμιση (downregulation) του bcl-2 περιγράφηκε πρόσφατα σε ανθρώπινα αλλομοσχεύματα (56).

Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη προβάλλει ενδείξεις για αυξημένη απόπτωση στα ηπατικά χοληφόρα στην PBC, σε σύγκριση με το φυσιολογικό ήπαρ και προτείνει η μειωμένη έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 στα κύτταρα των ηπατικών χοληφόρων μπορεί να έχει σχέση με αυτή την διαδικασία. Έτσι, η αύξηση της απόπτωσης μπορεί να παίζει ρόλο στην παθογένεση της PBC.

Ένας πιθανός δεύτερος μηχανισμός θανάτου των ηπατοκυττάρων στην χρόνια ηπατική νόσο, είναι η υπερπαραγωγή ή η μειονεκτική παραγωγή μεταλλοπρωτεασών που παράγονται κυρίως από τα κύτταρα του Kupffer, αλλά και τα αστεροειδή λιποκύτταρα ή κύτταρα του Ito. Οι πρωτεάσες αυτές θα μπορούσαν να ενέχονται στον κυτταρικό θάνατο με δύο μηχανισμούς: Η υπερπαραγωγή κολλαγενάσης (MMP-

1) και γελατινασών A και B (MMP-2, MMP-9) θα μπορούσαν να καταστρέψουν το συνδετικό υπόστρωμα του ήπατος και άρα να αποδιοργανώσουν τις ηπατοδοκίδες και να προκαλέσουν διαταραχή της αιματώσεως και άρα αυξημένη ευαισθησία των ηπατοκυττάρων σε ποικιλία μη ειδικών βλαπτικών μηχανισμών (π.χ ενδοτοξίνες). Αφ'ετέρου, μειωμένη παραγωγή των μεταλλοπρωτεασών θα μπορούσε να οδηγήσει σε αύξηση του συνδετικού ιστού εντός των χώρων του Disse και άρα σε μείωση και πάλιν της αιματώσεως των ηπατοκυττάρων, με τα ίδια αποτελέσματα.

Για να δούμε εάν κάτι από τα ανωτέρω αληθεύει, μελετήσαμε τέσσερις μεταλλοπρωτεάσες, την MMP-1 (κολλαγενάση) την MMP-3 (στρομελυσίνη) και τις MMP-2 και MMP-9 (γελατινάσες A και B αντιστοίχως). Στις δύο τελευταίες μελετήσαμε όχι μόνο την ανοσογόνο ενζυμική πρωτεΐνη, όπως αυτή αποκαλύπτεται με τη μέθοδο ELISA αλλά και τη δραστικότητα των ενζύμων, όπως αυτή αποκαλύπτεται με τη ζυμογραφία, όπου μόνον το ενεργό ένζυμο προσδιορίζεται. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι σχετικά περιορισμένα. Σε προηγούμενη μελέτη τα επίπεδα της MMP-1 ήσαν παρόμοια σε ασθενείς με ηπατίτιδα C προ και μετά θεραπεία με ιντερφερόνη και δεν διέφεραν μεταξύ ανταποκρινομένων στην θεραπεία και εκείνων που δεν ανταποκρίθηκαν (57). Αντιθέτως τα επίπεδα της MMP-2 ήσαν σημαντικώς υψηλότερα σε ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία έναντι εκείνων που ανταποκρίνοντο. Επι πλέον τα επίπεδα είχαν ασθενή αλλά σημαντική στατιστικώς συσχέτιση με το βαθμό της περιπυλαίας νεκρώσεως αλλά και της ινώσεως. Παρόμοια υψηλότερα επίπεδα της MMP-2 ανεφέρθησαν σε χρόνια ηπατίτιδα σε άλλη αναφορά (58). Αντίθετα αποτελέσματα ως προς την MMP-1 παρουσιάζονται σε άλλη λίαν πρόσφατη μελέτη (59). Τα επίπεδα της MMP-1 του ορρού μειωνόταν συνεχώς όσον η βαρύτητα της φλεγμονής ηύξανε και υπήρχε ισχυρή αντίστροφη συσχέτιση με την περιπυλαία νέκρωση, την ενδολοβιακή

νέκρωση και ασθενέστερη με την ίνωση. Η χρήση της ιντερφερόνης προκαλούσε μικρή αλλά όχι σημαντική αύξηση των επιπέδων της MMP-1 στους ανταποκρινομένους, ενώ οι μη ανταποκρινόμενοι εμφάνιζαν συνεχή μείωση των επιπέδων της MMP-1 **(60)**. Ομοίως αντίθετα αποτελέσματα ως προς την MMP-2, αναφέρονται σε άλλη εργασία, όπου τα επίπεδα της MMP-2 του ορού δεν είχαν συσχέτιση είτε με την περιπυλαία νέκρωση είτε με την ίνωση **(61)**. Σε άλλη μελέτη, το επίπεδο της MMP-2 του ορού στην χρόνια ιογενή ηπατίτιδα ευρέθη παρόμοιο με των μαρτύρων, ενώ η ζυμογραφία έδειξε ότι το πλείστον της MMP-2 του ορού, ήταν προ MMP-2 συνδεδεμένη με TIMP-2 **(62)**.

Όσον αφορά στην MMP-9, ελαφρώς μειωμένα επίπεδα ορού έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα **(63)**.

Όσον αφορά στην MMP-3, μόνον μια πρόσφατη αναφορά υπάρχει, η οποία βρήκε 55% χαμηλότερα επίπεδα MMP-3 στην χρόνια ηπατίτιδα **(64)**, σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες.

Στους δικούς μας ασθενείς τα επίπεδα της MMP-3 δεν διέφεραν σε τίποτα από τους φυσιολογικούς μάρτυρες και δεν επηρεάζοντο καθόλου από τη θεραπεία με ιντερφερόνη. Ο λόγος της διαφοράς αυτής είναι πιθανόν η βαρύτητα των ασθενών, δεδομένου ότι όλοι οι δικοί μας είχαν σοβαρού βαθμού ηπατική νέκρωση, ενώ απ'ότι φαίνεται στην προηγούμενη αναφερθείσα εργασία, οι χρόνιες ηπατίτιδες ήσαν ήπιες.

Ως προς την MMP-1 τα αποτελέσματα μας έδειξαν σημαντικώς μειωμένα επίπεδα προ θεραπείας, χωρίς καμιά σημαντική μεταβολή μετά τη θεραπεία με ιντερφερόνη.

Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα προσφάτως δημοσιευθέντα **(59,60)**, δεδομένης της βαρύτητας των δικών μας περιστατικών και της μη ανταποκρίσεως στη θεραπεία των περισσοτέρων ασθενών, δεδομένου ότι το 70% ήσαν γονότυποι 1β, 1α ή 4 δηλαδή λίαν ανθεκτικοί στην θεραπεία με ιντερφερόνη.

Τα ευρήματα ως προς τις MMP-2 και MMP-9 ήσαν εξόχως διαφωτιστικά. Τόσον με τη μέθοδο ELISA όσον και με την ζυμογραφία, τα επίπεδα ήσαν λίαν σημαντικώς μειωμένα, είτε επρόκειτο περι ηπατίτιδος C είτε περί B, είτε η ομάδα εξεταζόταν ως σύνολο. Τα ευρήματα αυτά αντίκεινται ως προς την MMP-2 με προηγούμενα δεδομένα (57,62), αλλά η συμφωνία των δύο μεθόδων που χρησιμοποιήσαμε, δείχνει ότι τα ευρήματα μας είναι πλέον αξιόπιστα.

Επί πλέον τα ευρήματα μας ως προς την MMP-9 συμφωνούν με την μοναδική δημοσιευμένη μελέτη επι του θέματος (63).

Συνοψίζοντας θα μπορούσε κανείς να ισχυριστεί ότι τα ευρήματα της παρούσης εργασίας συμφωνούν με το δεύτερο σκέλος της αρχικώς διατυπωθείσης υποθέσεως. Δηλαδή, ότι το μειωμένο επίπεδο των μεταλλοπρωτεασών MMP-1, MMP-2 και MMP-9 στην χρόνια ηπατίτιδα, πιθανώς υποδηλεί αδυναμία αποδομήσεως του συνδετικού υποστρώματος και άρα δέον να αναμένεται αύξηση του κολλαγόνου στον χώρο του Disse, με άμεση συνέπεια επι της βιωσιμότητας των ηπατοκυττάρων.

Επι πλέον είναι σαφές ότι η θεραπεία με ιντερφερόνη δεν προκαλεί μεταβολές στο επίπεδο των μεταλλοπρωτεασών.

Φυσικά, περισσότερες μελέτες πρέπει να γίνουν ώστε να θεμελιωθεί το συμπέρασμα αυτό, δεδομένου ότι τα συμβαίνοντα στην περιφέρεια ίσως να μην αντανακλούν τα συμβαίνοντα στο αίμα των κολποειδών.

Εξαιρετικά ενδιαφέροντα είναι και τα συμβαίνοντα στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση. Ενώ η MMP-1 και η MMP-3 ουδεμία στατιστική διαφορά παρουσιάζουν ως προς τους μάρτυρες, η MMP-2 και κυρίως η MMP-9 τόσον με τη ζυμογραφία, όσον και με την ELISA, εμφανίζουν εξαιρετικώς σημαντικές μειωμένες τιμές σε σχέση με τους μάρτυρες. Η μοναδική εν προκειμένω αναφορά της βιβλιογραφίας (58, 65), αναφέρεται σε μικρή σειρά οκτώ ασθενών όπου με ELISA διαπιστώθηκαν αυξημένες

τιμές σε σχέση προς τους μάρτυρες. Η ανακοίνωση όμως αυτή, χρησιμοποιεί αντίσωμα του οποίου η ακριβής ειδικότητα δεν καθορίζεται ως προς τις λοιπές μεταλλοπρωτεάσες. Αντιθέτως το αντίσωμα της δικής μας ELISA είναι καλώς χαρακτηρισμένο, χωρίς καμιά διασταυρούμενη ειδικότητα με τις άλλες πρωτεάσες. Επί πλέον τα αποτελέσματα μας είναι σαφώς επιβεβαιωμένα και με μια δεύτερη τεχνική, αυτή της ζυμογραφίας, η οποία επιβεβαιώνει την ELISA.

Το εξαιρετικώς ενδιαφέρον εύρημα επίσης είναι ότι οι μισοί περίπου ασθενείς μας ευρίσκοντο σε πρώιμα στάδια ΠΧΚ (I και II), και τα αποτελέσματα ήσαν εξίσου μειωμένα όσον και εκείνα των ασθενών σε στάδια III και IV. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η μείωση των MMP-2 και MMP-9 είναι πιθανώς πρωτογενές φαινόμενο σχετιζόμενο ίσως με την παθογένεια της νόσου. Το εύρημα αυτό χρήζει περαιτέρω διερευνήσεως.

Τέλος, χρήσιμα συμπεράσματα προκύπτουν από τη σύγκριση της συσχέτισης μεταξύ των τιμών της ELISA με εκείνες της ζυμογραφίας (Εικόνες 19 και 20). Έτσι φαίνεται ότι υπάρχει μεν σημαντική συσχέτιση όχι όμως ιδιαιτέρως ισχυρή. Αυτό υποδηλώνει ότι πιθανόν η δραστηριότητα του ενζύμου να μην έχει απόλυτο αντίκρουσμα με την παραγωγή της πρωτεΐνης του ενζύμου, πράγμα φυσικό, αφού τα ένζυμα αυτά δημιουργούνται ως προένζυμα που απαιτούν πρωτεολυτική σχάση για τη δραστηριοποίησή τους, ενώ υπεισέρχεται και η δράση ποικιλίας ανασταλτών, μερικοί των οποίων είναι ακόμη άγνωστοι.

Αυτό φαίνεται και από την ποσοτική σύγκριση των δύο μεθόδων. Η ELISA δίνει τιμές 2-5 φορές μεγαλύτερες από εκείνες της ζυμογραφίας, πράγμα που επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι σημαντικό μέρος της κυκλοφορούσης πρωτεΐνης είναι ενζυμικώς μη δραστική. Επί πλέον υποδεικνύει και την ανάγκη να προσδιορίζεται ταυτοχρόνως το

ένζυμο με τις δύο μεθόδους, πράγμα που έχει γίνει στην παρούσα εργασία, αλλά όχι στις μέχρι τώρα δημοσιευμένες αναφορές.

Συμπεράσματα

Απόπτωση διαπιστούμενη με τη μέθοδο TUNEL περιγράφηκε να συμβαίνει σε μεγαλύτερο βαθμό στην HCV και HBV χρόνια ηπατίτιδα σε σχέση με τη στεατοηπατίτιδα ή την αντιδραστική ηπατίτιδα.

Τα ευρήματα της αυξημένης απόπτωσης διαπιστωμένης με την μέθοδο TUNEL, συσχετίζονται με την αυξημένη έκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53, πράγμα που πιθανολογεί και συνακόλουθη υπερέκφραση του φυσικού τύπου p53, η οποία μπορεί και επάγει την απόπτωση κάτω από συγκεκριμένες καταστάσεις

Υπερέκφραση του p53 σημειώθηκε στις περιπτώσεις με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β και C, την στιγμή που καμία έκφραση δεν σημειώθηκε στις στεατοηπατίτιδες και τις περιπτώσεις με μικρού βαθμού φλεγμονή.

Εξ'ίσου πιθανόν όμως είναι η έκφραση του p21, να είναι ανεξάρτητη του p53 . Το p21/waf1 βρέθηκε εκτός των περιπτώσεων ηπατίτιδας και στο φυσιολογικό ήπαρ και στις περιπτώσεις στεατοηπατίτιδας. Αν και 7/19 των περιπτώσεων χρόνιας ηπατίτιδας είχαν μια μεγαλύτερη έκφραση του p21/waf1 από τους μάρτυρες αυτό δεν ήταν στατιστικά σημαντικό.

Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν αύξηση του mdm-2 στις περιπτώσεις των χρονίων ηπατιτίδων εν σχέσει προς την ομάδα ελέγχου, ανεξάρτητα από το βαθμό φλεγμονής. Είτε στις ηπατίτιδες είτε στις κίρρωσεις, το bcl-2 εκφράστηκε μόνο στα κύτταρα των ηπατικών χοληφόρων και στα μονοπύρηνια κύτταρα που διηθούν τα πυλαία διαστήματα ή τα λόβια.

Στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση εδείχθη αυξημένη απόπτωση τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων όσο και στα ηπατοκύτταρα, όπως έδειξε η μέθοδος TUNEL. Τα ευρήματα ήταν τα ίδια και στα πρώιμα και στα όψιμα στάδια της νόσου πράγμα ιδιαίτερα σημαντικό για την παθογένεια.

Ο ανοσοφαινότυπος των ηπατικών χοληφόρων στη πρωτοπαθή χολική κίρρωση είναι p53 αρνητικός, mdm-2 αρνητικός, p21/waf1 αρνητικός και για τα ηπατοκύτταρα είναι p53 αρνητικός mdm-2 αρνητικός και p21/waf1 θετικός. Αυτός ο φαινότυπος δείχνει μάλλον ότι είτε το p21/waf1 εκφράζεται σαν συνεπακόλουθο της κανονικής από το p53 εξαρτώμενης οδού π.χ το p53 γονίδιο είναι στην κανονική wild type μορφή ή/και ότι το p21/waf1 εκφράζεται δια μέσου μιας p53 ανεξάρτητης οδού. Σε οποιαδήποτε περίπτωση την στιγμή που ο ανοσοφαινότυπος των ηπατικών χοληφόρων είναι αρνητικός και για τις τρεις πρωτείνες, ο μηχανισμός της απόπτωσης των ηπατικών χοληφόρων στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση δεν πρέπει μάλλον να επάγεται από το p53.

Κανένα ηπατοκύτταρο δεν εξέφρασε την πρωτείνη bcl-2.

Ασθενής έκφραση του bcl-2 σε μερικά ενδολοβιακά ηπατικά χοληφόρα σε σύγκριση με το φυσιολογικό ήπαρ ή τις στεατοηπατίτιδες, βρέθηκε στους ασθενείς με PBC.

Φαίνεται λογικό να υποθεθεί ότι ανεξάρτητα από τον μηχανισμό της απόπτωσης, αυτά τα ευρήματα, μπορούν να εξηγήσουν τουλάχιστον κατά ένα μέρος την αυξημένη απόπτωση που συμβαίνει στα κύτταρα των χοληφόρων των ασθενών.

Όσον αφορά στις μεταλλοπρωτεάσες στις χρόνιες ηπατίτιδες :

α) Τα επίπεδα της MMP-3 δεν διέφεραν σε τίποτα από τους φυσιολογικούς μάρτυρες και δεν επηρεάζοντο καθόλου από τη θεραπεία με ιντερφερόνη.

β) Η MMP-1 ήταν σημαντικώς μειωμένη προ θεραπείας, χωρίς καμιά σημαντική μεταβολή μετά τη θεραπεία με ιντερφερόνη.

γ) Η MMP-2 και η MMP-9 τόσο με τη μέθοδο ELISA όσο και με την ζυμογραφία, είχαν επίπεδα λίαν σημαντικώς μειωμένα, είτε επρόκειτο περι ηπατίτιδος C είτε περι B, είτε η ομάδα εξεταζόταν ως σύνολο και δεν υπήρχε επίδραση από τη θεραπεία με ιντερφερόνη.

Το μειωμένο επίπεδο των μεταλλοπρωτεασών MMP-1, MMP-2 και MMP-9 στην χρόνια ηπατίτιδα, πιθανώς υποδηλεί αδυναμία αποδομήσεως του συνδετικού υποστρώματος και άρα αύξηση του κολλαγόνου στον χώρο του Disse, με άμεση συνέπεια επι της βιωσιμότητας των ηπατοκυττάρων.

Επι πλέον είναι σαφές ότι η θεραπεία με ιντερφερόνη δεν προκαλεί μεταβολές στο επίπεδο των μεταλλοπρωτεασών.

Στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση:

α) Η MMP-1 και MMP-3 δεν παρουσίαζαν καμία διαφορά ως προς τους μάρτυρες.

β) Η MMP-2 και η MMP-9 ήταν σημαντικά μειωμένες τόσο με ζυμογραφία όσο και με ELISA.

Το εξαιρετικώς ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι οι μισοί περίπου ασθενείς ευρίσκοντο σε πρώιμα στάδια ΠΧΚ (I και II), και οι τιμές των ενζύμων ήσαν εξίσου μειωμένες όσο και εκείνες των ασθενών σε στάδια III και IV. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η μείωση των MMP-2 και MMP-9 είναι πιθανώς πρωτογενές φαινόμενο σχετιζόμενο ίσως με την παθογένεια της νόσου. Το εύρημα αυτό χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Περίληψη

Σκοπός της έρευνας ήταν η μελέτη δύο από τους τρεις κυριότερους πιθανούς μηχανισμούς καταστροφής των ηπατοκυττάρων και των άλλων κυττάρων του ήπατος στις χρόνιες ηπατοπάθειες, δηλαδή της απόπτωσης και της παραγωγής μεταλλοπρωτεασών.

Α) Για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων εφαρμόστηκε η *in situ* σήμανση του κατακερματισμένου DNA (TUNEL). Ομοίως μελετήθηκαν πρωτεΐνες που σχετίζονται με την απόπτωση. Η έκφραση των πρωτεϊνών mdm-2, p21/waf1, και bcl-2 μελετήθηκε με την ανοσοιστοχημική μέθοδο της αλκαλικής φωσφατάσης-αντιαλκαλικής φωσφατάσης (APAAP) ενώ η έκφραση της πρωτεΐνης p53 μελετήθηκε με τη μέθοδο της αλκαλικής φωσφατάσης.

Η ανοσοιστοχημική μελέτη περιελάμβανε 67 συνολικά περιπτώσεις εκ των οποίων οι 7 ήταν χρόνιες ήπιες ηπατίτιδες, 23 χρόνιες βαρείες ηπατίτιδες, 8 κίρρωσεις (HBV, HCV), 12 πρωτοπαθείς χολικές κίρρωσεις, 12 μη αλκοολικές στεατοηπατίτιδες και 5 αντιδραστικές ηπατίτιδες.

Από τα αποτελέσματα φάνηκε μεγάλος αριθμός αποπτωτικών κυττάρων κυρίως σε περιοχές περιπυλαίας ηπατίτιδας και εντός των ηπατικών λοβίων όπως και σε όλες τις περιπτώσεις πρώιμης και όψιμης πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης, τόσο στα κύτταρα του επιθηλίου των χοληφόρων όσο και στα ηπατοκύτταρα γύρω από τα πυλαία διαστήματα.

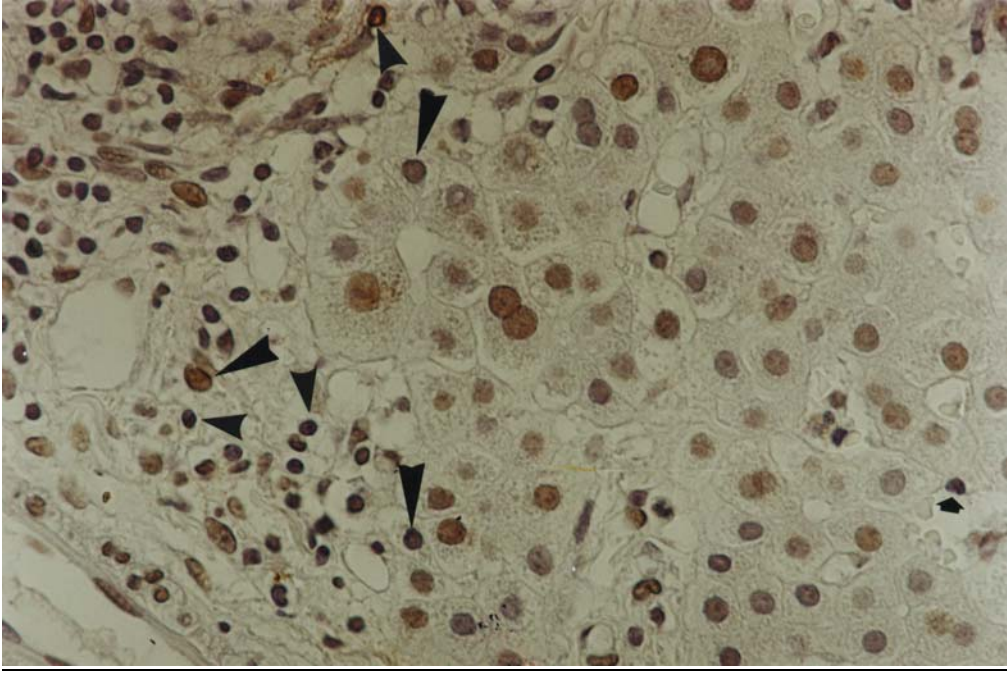
Η αυξημένη έκφραση του p53 σε χρονία βαρεία ηπατίτιδα και σε κίρρωση σε σχέση με τις άλλες νοσολογικές οντότητες, ως επίσης και η μεγάλη έκφραση του Waf1 σε σχέση με το p53 συνηγορούν είτε υπέρ ενεργοποίησης του p53 σε παθήσεις του ήπατος με σοβαρού βαθμού βλάβες των ηπατοκυττάρων είτε υπέρ ύπαρξης p53-ανεξάρτητης ρύθμισης της πρωτεΐνης waf1. Στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση,

διαπιστώθηκε μείωση της έκφρασης του bcl-2 στα χοληφόρα τόσο στα πρώιμα όσο και στα όψιμα στάδια της νόσου, γεγονός με πιθανή παθογενετική σημασία.

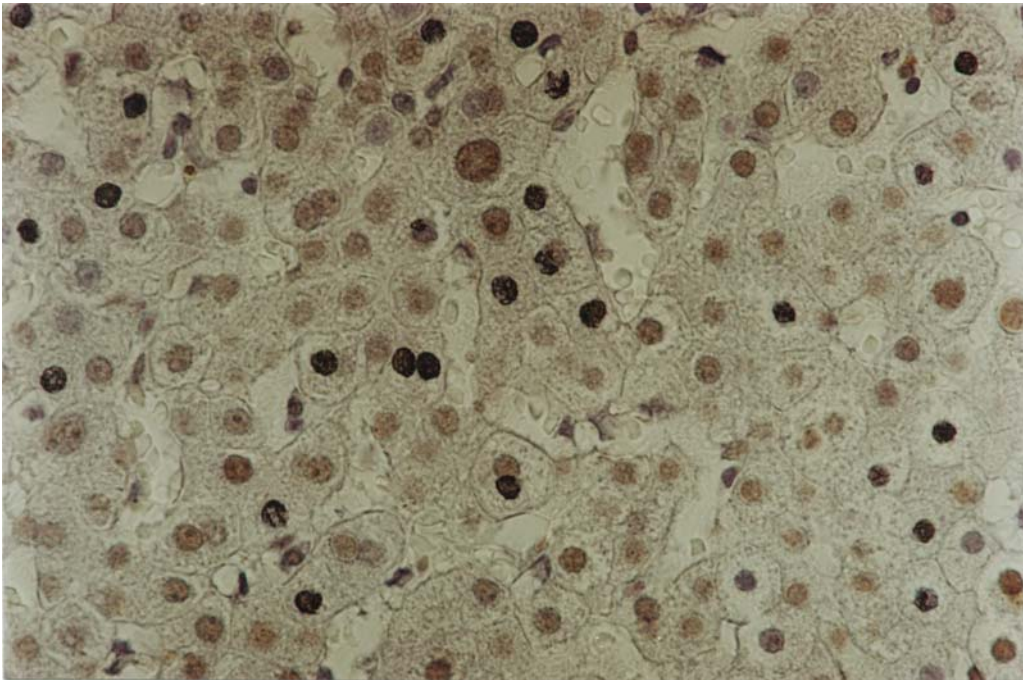
Β) Έγινε ακόμα μελέτη των μεταλλοπρωτεασών MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 με την μέθοδο ELISA , και των MMP-2, MMP-9 με μέθοδο ζυμογραφίας για την παρουσία των μεταλλοπρωτεασών αυτών στον ορό. Στη χρόνια ηπατίτιδα τα επίπεδα των MMP-1, MMP-2 και MMP-9 είναι σημαντικώς μειωμένα και δεν επηρεάζονται από θεραπεία με ιντερφερόνη. Αυτό πιθανόν οδηγεί σε αύξηση του συνδετικού ιστού στον χώρο του Disse με συνακόλουθο βλάβη των ηπατοκυττάρων.

Η MMP-3 δεν επηρεάζεται στη χρόνια ηπατίτιδα.

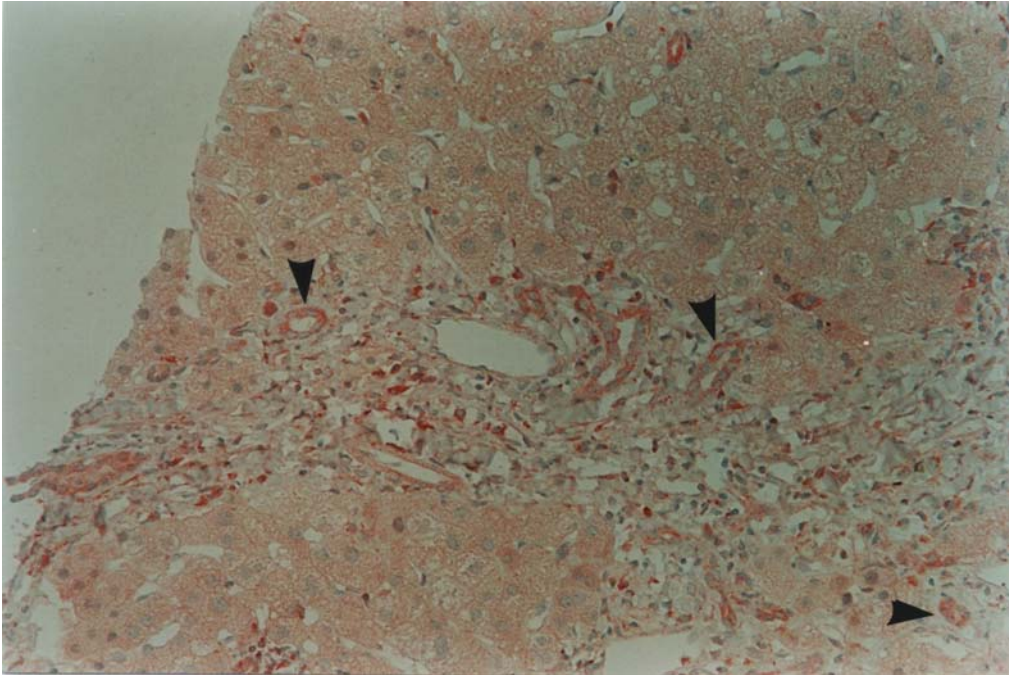
Στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση η MMP-1 και MMP-3 είναι φυσιολογικές, ενώ υπάρχει μεγάλη μείωση της MMP-2 και MMP-9 τόσο στα πρώιμα όσο και στα όψιμα στάδια της νόσου. Το γεγονός αυτό μπορεί να έχει παθογενετική σημασία.



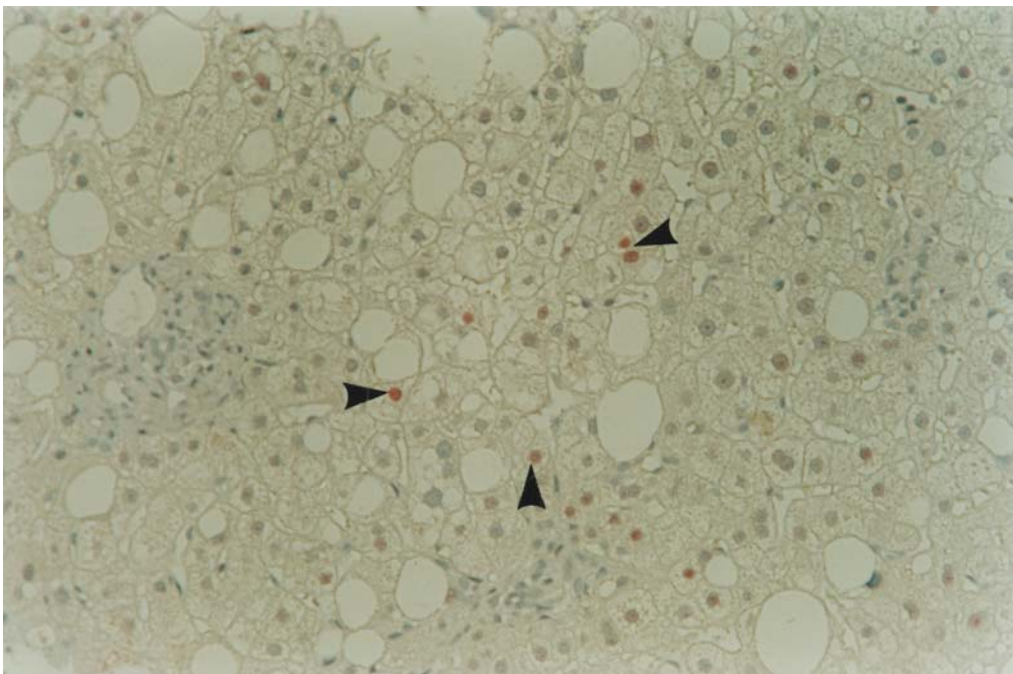
Φωτογραφία 1: Μέθοδος TUNEL. Θετικοί πυρήνες ηπατοκυττάρων σε περιοχές με piecemeal νέκρωση (μεγ. κεφαλές βελών). Θετικά διηθητικά κύτταρα (μικρές κεφαλές βελών). Σημειώνονται ακόμα κάποια θετικά κύτταρα των κολποειδών (βέλη). Χρονία ηπατίτιδα C. Μεγέθυνση X400.



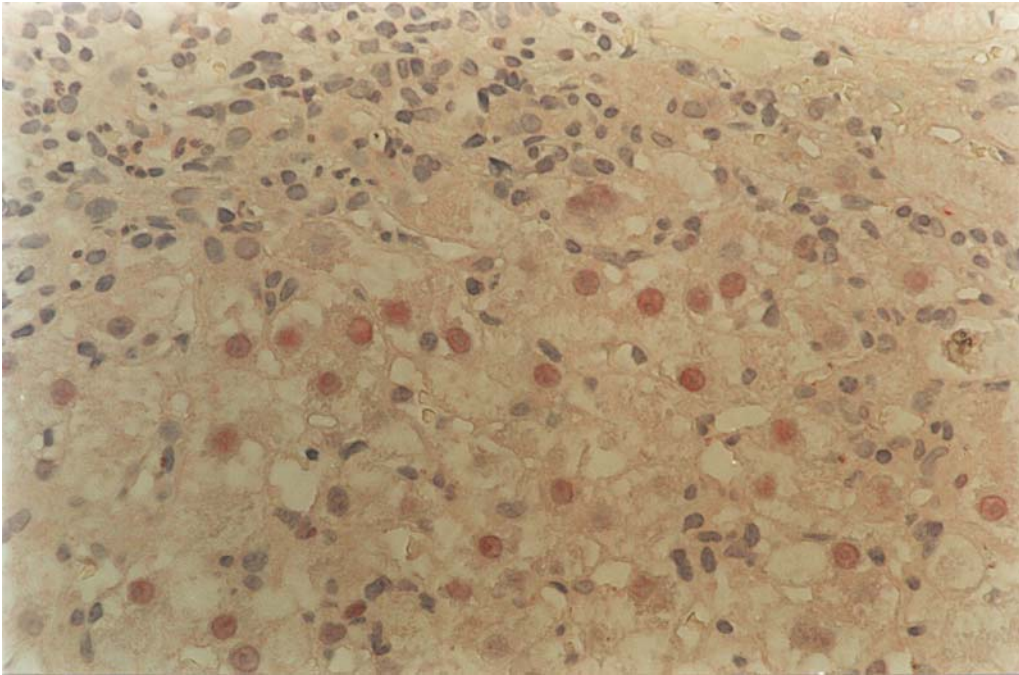
Φωτογραφία 2: Μέθοδος TUNEL. Θετικοί πυρήνες ηπατοκυττάρων σε χρόνια ηπατίτιδα B. Μεγέθυνση X400.



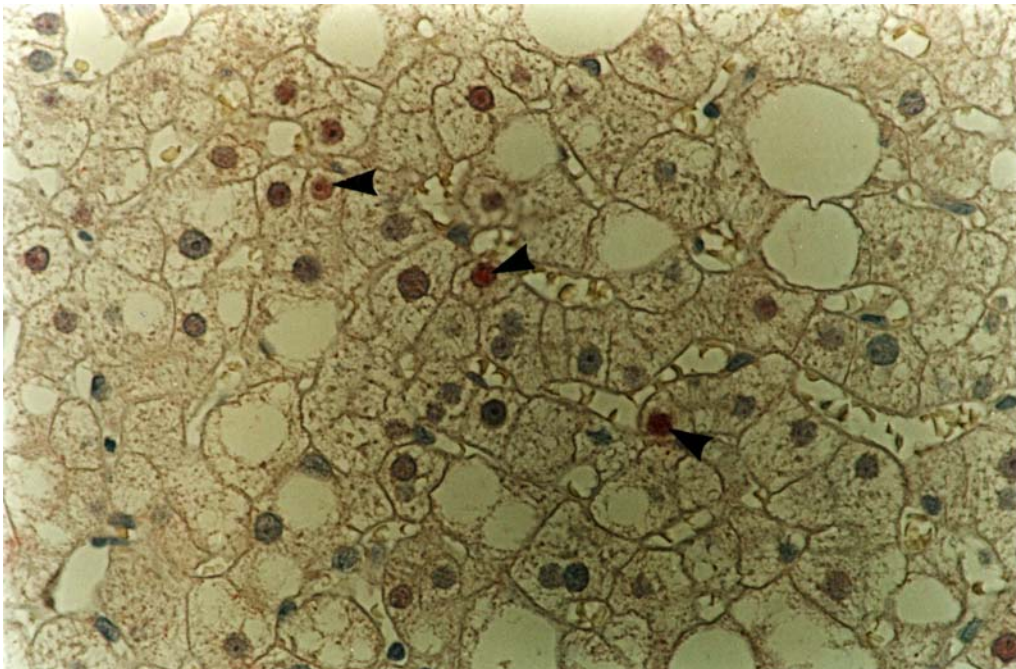
Φωτογραφία 3 :Χρόνια ηπατίτιδα C. Η πρωτεΐνη Bcl-2 εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα κυττάρων των ηπατικών χοληφόρων (δείκτες). Λεμφοκύτταρα των πυλαίων διαστημάτων βάφονται επίσης θετικά. Μεγέθυνση X200.



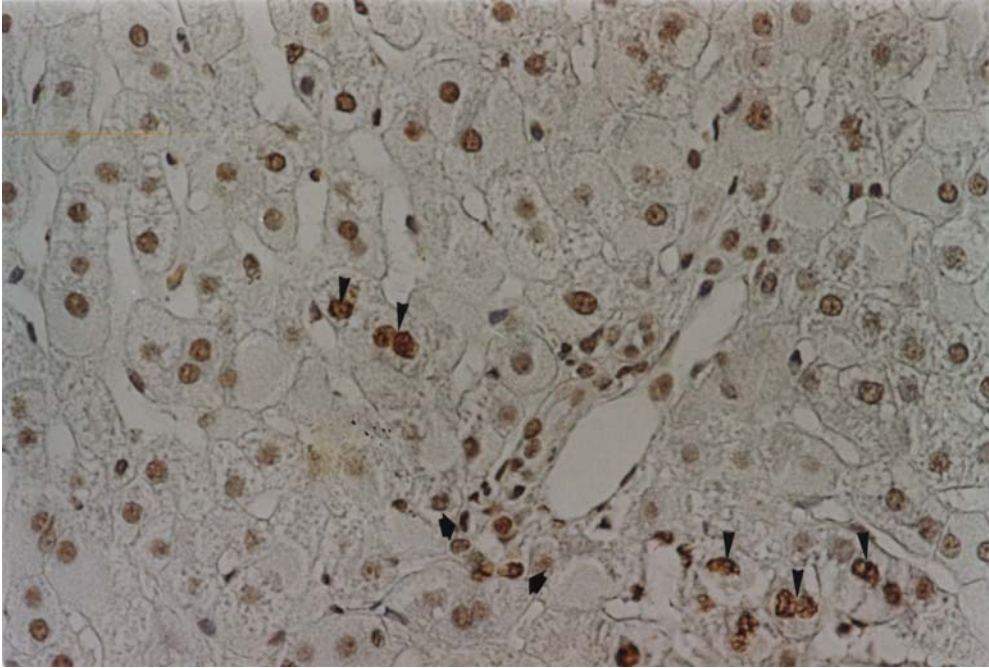
Φωτογραφία 4 : Η πρωτεΐνη p53 εκφράζεται στους πυρήνες των ηπατοκυττάρων (δείκτες). Χρόνια ηπατίτιδα C. Μεγέθυνση X200.



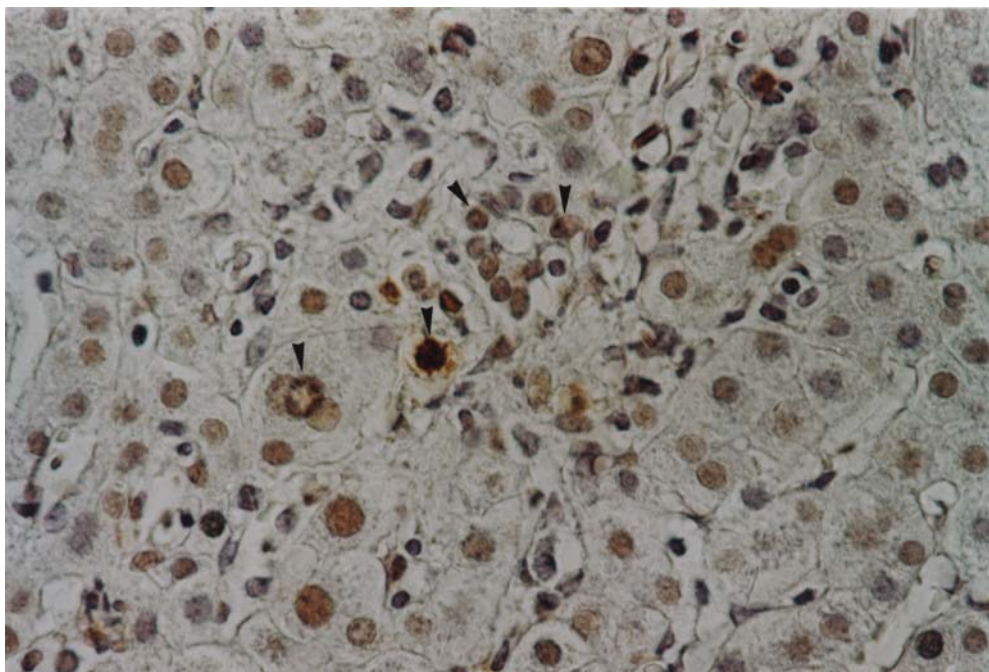
Φωτογραφία 5: Έκφραση της πρωτεΐνης p21/waf-1 σε πολλούς θετικούς πυρήνες των ηπατοκυττάρων σε περιπλαϊές περιοχές με piecemeal νέκρωση. Χρονία ηπατίτιδα C. Μεγέθυνση X400.



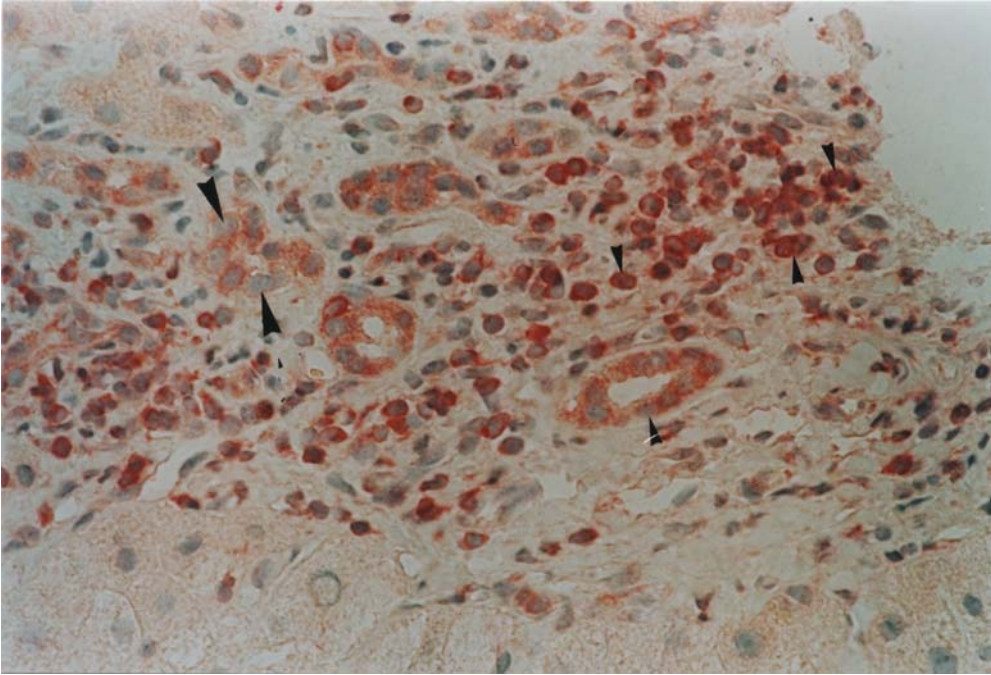
Φωτογραφία 6: Έκφραση της πρωτεΐνης mdm-2 στους πυρήνες ηπατοκυττάρων (δείκτες). Χρονία ηπατίτιδα C. Μεγέθυνση X400.



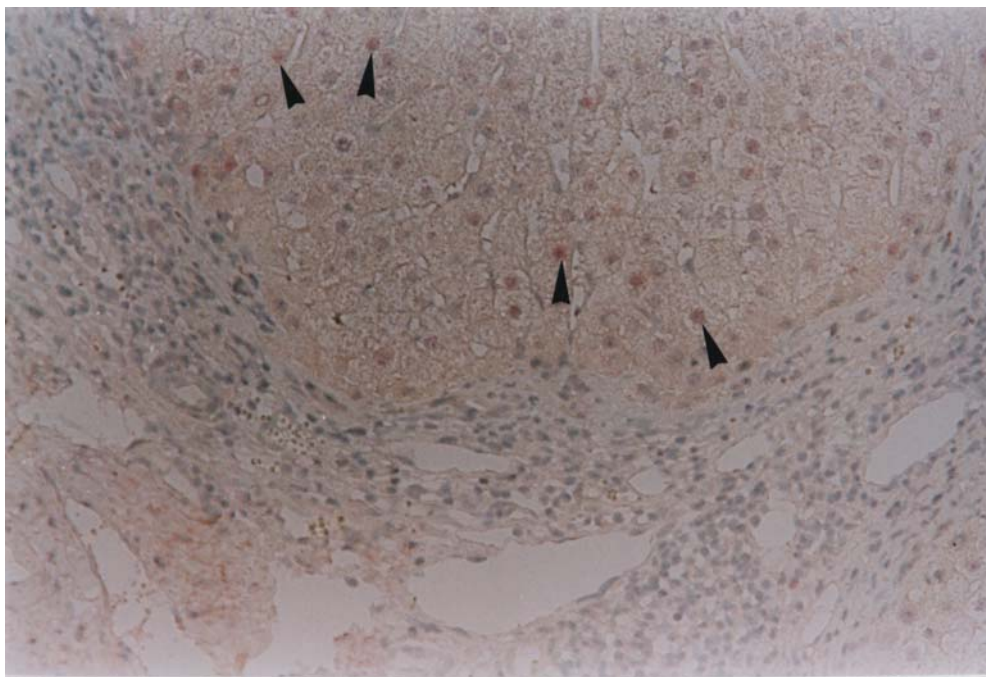
Φωτογραφία 7: Μέθοδος TUNEL. Πρώιμη PBC. Πυλαίο διάστημα. Πολλά αποπτωτικά ηπατοκύτταρα (κεφαλές βελών). Απόπτωση παρατηρείται επίσης στο επιθήλιο των ηπατικών χοληφόρων (βέλη). Μεγέθυνση X400.



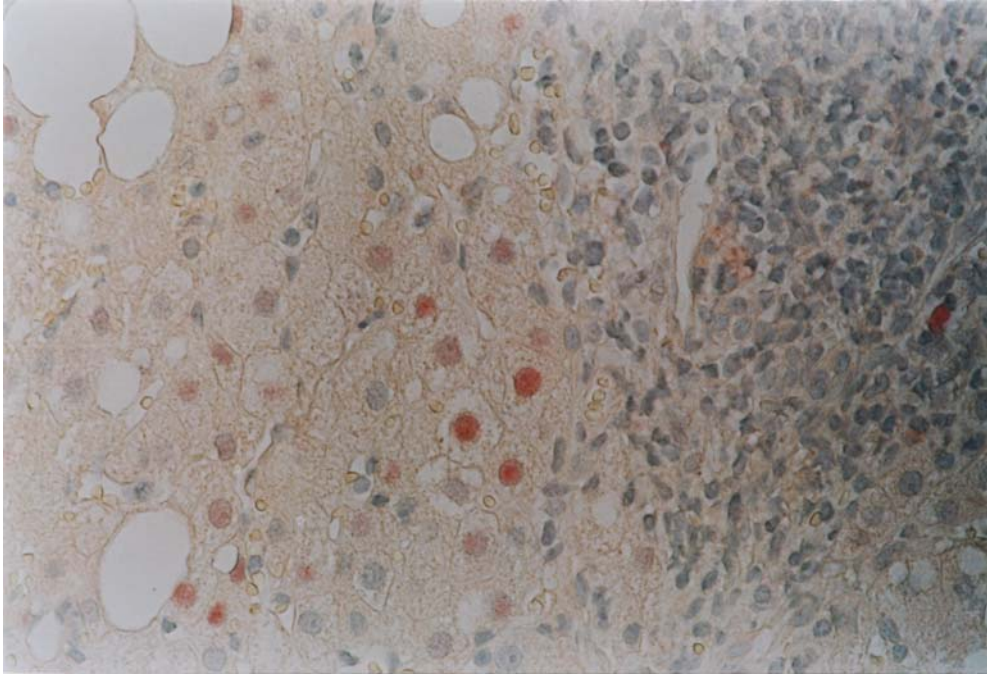
Φωτογραφία 8: Μέθοδος TUNEL. Όψιμη PBC. Αποπτωτικά κύτταρα στα πυλαία διαστήματα. Μερικά θετικά ηπατοκύτταρα (δείκτες). Θετικά κύτταρα χοληφόρων (δείκτες). Μεγέθυνση X400.



Φωτογραφία 9 : Έκφραση της Bcl-2 σε όψιμη PBC. Σημειώνονται τα θετικά λεμφοκύτταρα των πυλαίων διαστημάτων (δείκτες) και τα θετικά κύτταρα των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων (δείκτες). Κύτταρα χοληφόρων με μειωμένη έκφραση της bcl-2 (μεγάλοι δείκτες) συγκρινόμενη με γειτονικά χοληφόρα (δείκτες). Μεγέθυνση X400.



Φωτογραφία 10: Έκφραση της πρωτεΐνης p-53 σε όψιμη PBC. Θετικοί πυρήνες ηπατοκυττάρων. Μεγέθυνση X200.



Φωτογραφία 11: Όψιμη ΡΒC σε ΗCV θετικό ασθενή. Θετικοί για το waf1/p21 πυρήνες ηπατοκυττάρων. Χ400.

Λεζάντες εικόνων

Εικόνα 1: Επίπεδα κολλαγενάσης (MMP-1) στη χρόνια ηπατίτιδα Β και C προ και μετά θεραπεία με ιντερφερόνη. Στατιστική μείωση στη χρόνια ηπατίτιδα C αλλά όχι στη Β (Μέσοι όροι +/- σταθερό σφάλμα).

Εικόνα 2: Επίπεδα κολλαγενάσης (MMP-1) στο σύνολο των χρονίων ηπατιτίδων προ και μετά θεραπείαν. Σημαντική μείωση η οποία δεν αλλάζει μετά τη θεραπεία (ΜΟ +/- ΣΣ).

Εικόνα 3: Γελατινάση Α (MMP-2) του ορού σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β και C προ και μετά θεραπεία με ιντερφερόνη.(ΜΟ +/- ΣΣ).

Εικόνα 4: Γελατινάση Α (MMP-2) στη χρόνια ηπατίτιδα Β και C ως σύνολο, προ και μετά θεραπείαν με ιντερφερόνη. (ΜΟ +/- ΣΣ).

Εικόνα 5: Στρομελυσίνη (MMP-3) του ορού σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β και C προ και μετά θεραπεία με ιντερφερόνη.(ΜΟ +/- ΣΣ).

Εικόνα 6: Στρομελυσίνη (MMP-3) του ορού σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα ως σύνολο προ και μετά θεραπεία με ιντερφερόνη.(ΜΟ +/- ΣΣ).

Εικόνα 7: Γελατινάση Β (MMP-9) του ορού σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β και C προ και μετά θεραπεία με ιντερφερόνη. Σημαντική μείωση η οποία δεν μεταβάλλεται μετά θεραπεία (MO +/- ΣΣ).

Εικόνα 8: Γελατινάση Β (MMP-9) του ορού σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα ως σύνολο προ και μετά θεραπεία με ιντερφερόνη. Σημαντική μείωση που δεν μεταβάλλεται με τη θεραπεία (MO +/- ΣΣ).

Εικόνα 9: Γελατινάση Α (MMP-2) του ορού σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β και C προ και μετά θεραπεία με ιντερφερόνη με τη μέθοδο της ζυμογραφίας.(MO +/- ΣΣ).

Εικόνα 10: Γελατινάση Α (MMP-2) στη χρόνια ηπατίτιδα Β και C ως σύνολο, προ και μετά θεραπείαν με ιντερφερόνη με τη μέθοδο της ζυμογραφίας. Παρόμοια αποτελέσματα με την εικόνα 4. (MO +/- ΣΣ).

Εικόνα 11: Γελατινάση Β (MMP-9) του ορού σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β και C προ και μετά θεραπεία με ιντερφερόνη με τη μέθοδο της ζυμογραφίας. Σημαντική μείωση η οποία δεν μεταβάλλεται μετά θεραπεία (MO +/- ΣΣ).

Εικόνα 12 : Γελατινάση Β (MMP-9) του ορού σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα ως σύνολο προ και μετά θεραπεία με ιντερφερόνη με τη μέθοδο της ζυμογραφίας. Σημαντική μείωση που δεν μεταβάλλεται με τη θεραπεία (MO +/- ΣΣ).

Εικόνα 13: Επίπεδα κολλαγενάσης (MMP-1) στη πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ). Ουδεμία στατιστική διαφορά με τους μάρτυρες. (Μέσοι όροι +/- σταθερό σφάλμα).

Εικόνα 14: Επίπεδα γελατινάσης (MMP-2) στη πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ). Παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική μείωση. (ΜΟ +/- ΣΣ).

Εικόνα 15: Επίπεδα στρομελυσίνης (MMP-3) στη πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ). (ΜΟ +/- ΣΣ).

Εικόνα 16: Επίπεδα γελατινάσης Β (MMP-9) στη πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ). Λίαν σημαντική μείωση (ΜΟ +/- ΣΣ).

Εικόνα 17: Επίπεδα γελατινάσης (MMP-2) στη πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ) με ζυμογραφία. Παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική μείωση. (ΜΟ +/- ΣΣ).

Εικόνα 18: Επίπεδα γελατινάσης Β (MMP-9) στη πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ) με ζυμογραφία. Λίαν σημαντική μείωση (ΜΟ +/- ΣΣ).

Εικόνα 19: Γραμμική συσχέτιση της MMP-2 σε ELISA και ζυμογραφία. Φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση όχι όμως ιδιαίτερα ισχυρή.

Εικόνα 20: Γραμμική συσχέτιση της MMP-9 σε ELISA και ζυμογραφία. Φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση όχι όμως ιδιαίτερα ισχυρή.

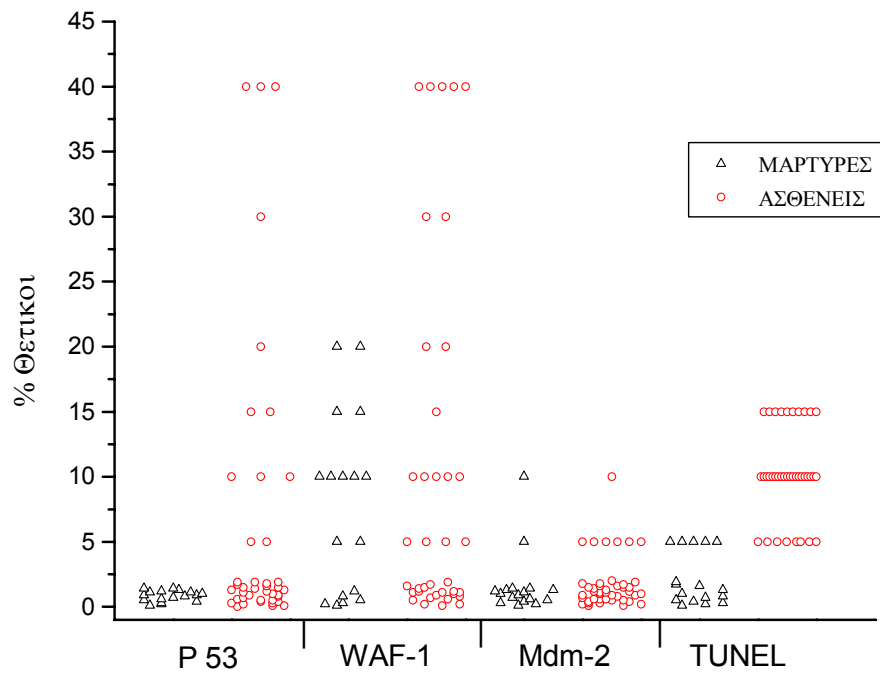
	P53	WAF1	mdm-2	TUNEL
ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C	0/7	4/7 57%	2/7 28.5%	5/7 71%
ΧΡΟΝΙΑ ΒΑΡΕΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ B	5/11 45%	9/11 82%	2/11 18%	11/11 100%
ΧΡΟΝΙΑ ΒΑΡΕΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C	3/12 25%	9/12 75%	3/12 25%	11/12 91%
ΙΟΓΕΝΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗ	3/8 37.5%	6/8 75%	1/8 12.5%	7/8 88%
ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΣΤΕΑΤΟΗΠΑΤΙΤΙΔΑ	0/12	7/12 58%	1/12 8%	4/12 30%
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ	0/5	4/5 80%	2/5 40%	2/5 40%

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Πίνακας 1: Έκφραση % του συνολικού αριθμού των επιμέρους περιστατικών χρονίων ηπατοπαθειών.

Πίνακας 2: Διάγραμμα που παρουσιάζει τα % θετικά ηπατοκύτταρα για το p53, mdm-2, p21/waf1 και μεθόδου TUNEL.

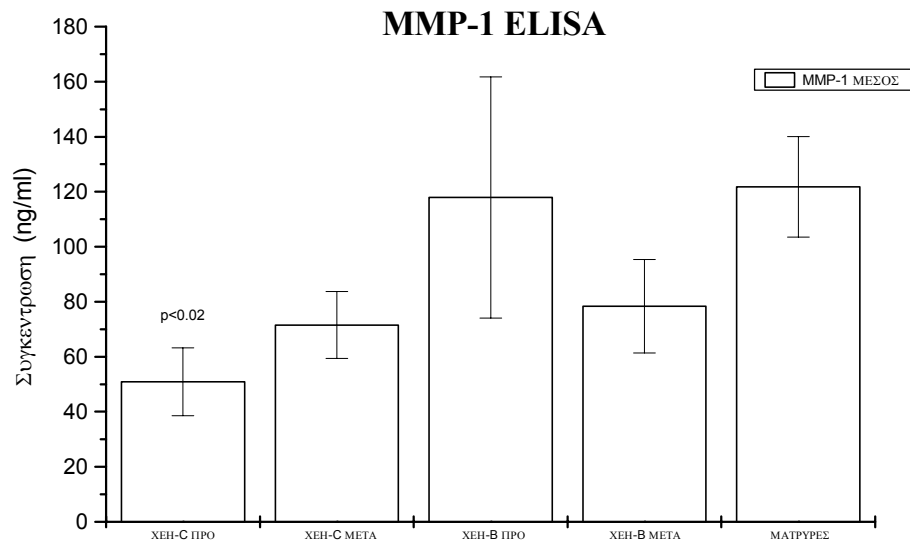
Πίνακας 3: Φαίνονται τα % θετικά στην έκφραση των πρωτινών που σχετίζονται με την απόπτωση ηπατοκύτταρα. Η αριστερή στήλη παρουσιάζει το ποσοστό των θετικών ηπατοκυττάρων.



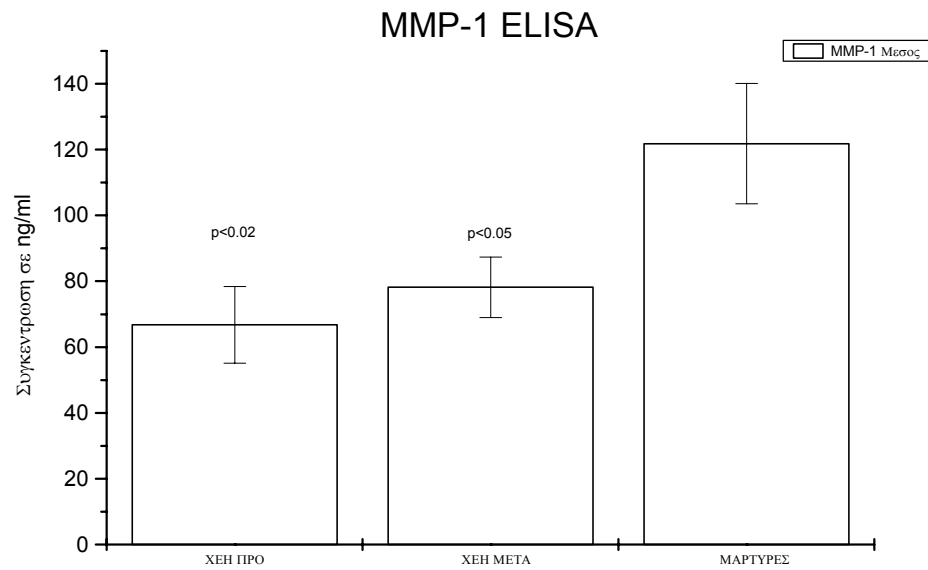
ΠΙΝΑΚΑΣ 2

% θετικά ηπατοκύττα ρα	<i>P53</i>	<i>Waf1/p21</i>	<i>Mdm-2</i>	<i>Bcl-2</i>	
5%	0	2/11	1/2	0	Μάρτυρες
	1/2	3/11	3/3	0	ΠΧΚ
10%	0	5/11	1/2	0	Μάρτυρες
	1/2	4/11	0	0	ΠΧΚ
15%	0	2/11	0	0	Μάρτυρες
	0	0	0	0	ΠΧΚ
20%	0	2/11	0	0	Μάρτυρες
	0	1/11	0	0	ΠΧΚ
30%	0	0	0	0	Μάρτυρες
	0	3/11	0	0	ΠΧΚ

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

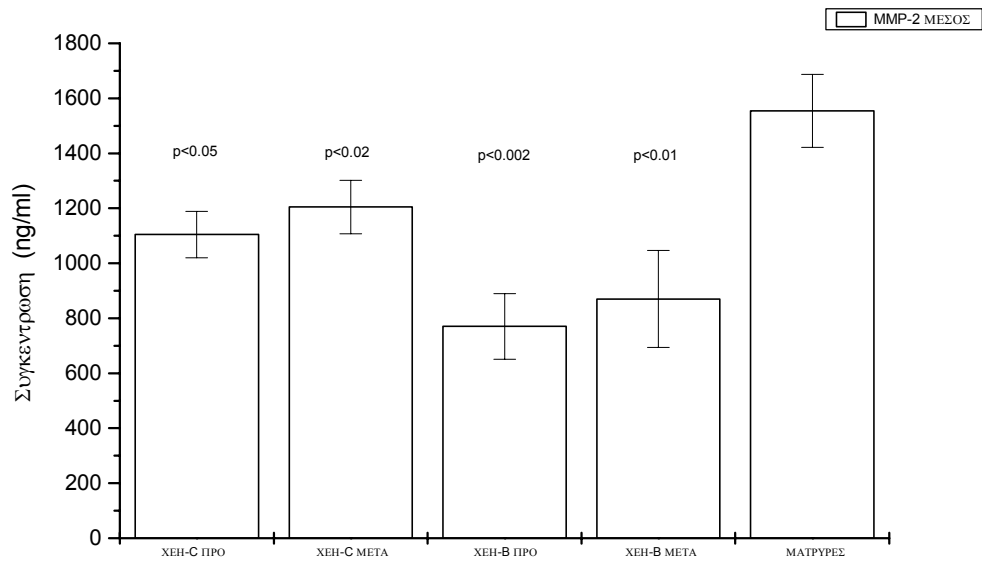


ΕΙΚΟΝΑ 1

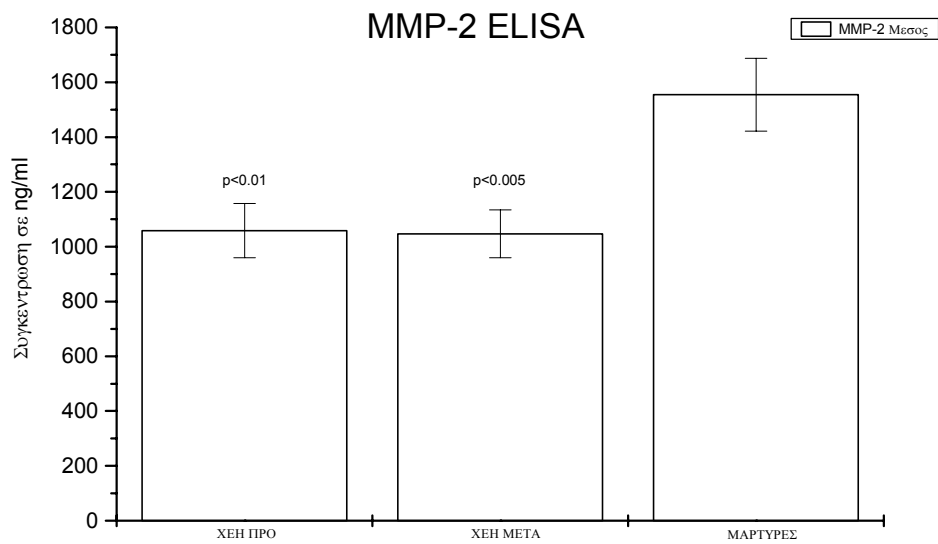


ΕΙΚΟΝΑ 2

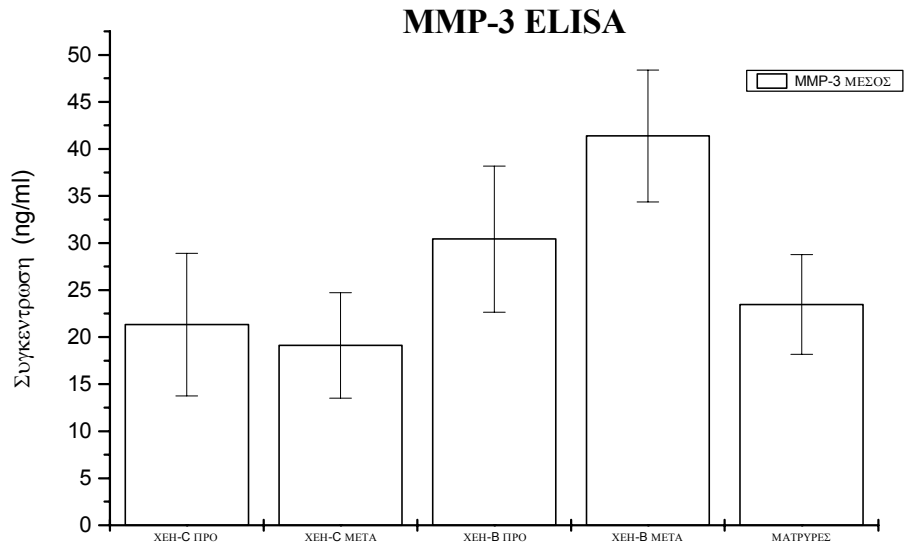
MMP-2 ELISA



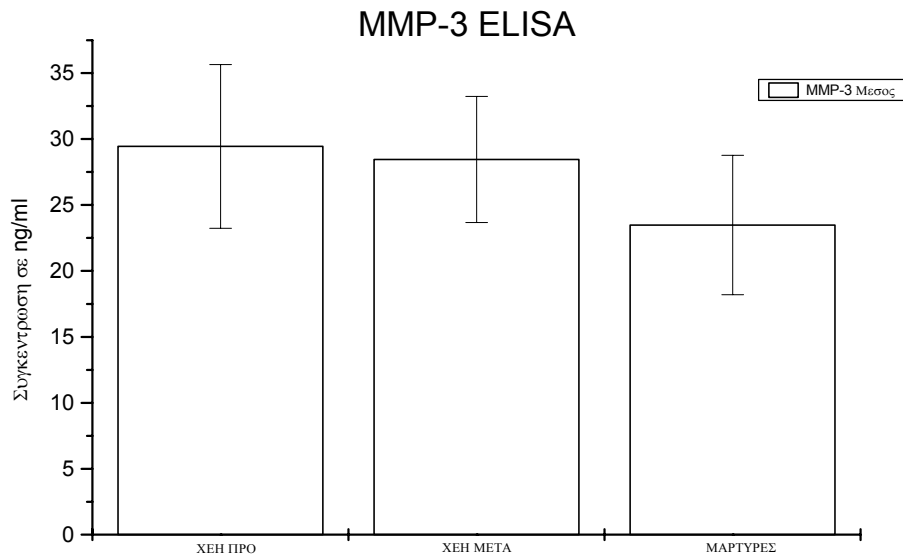
ΕΙΚΟΝΑ 3



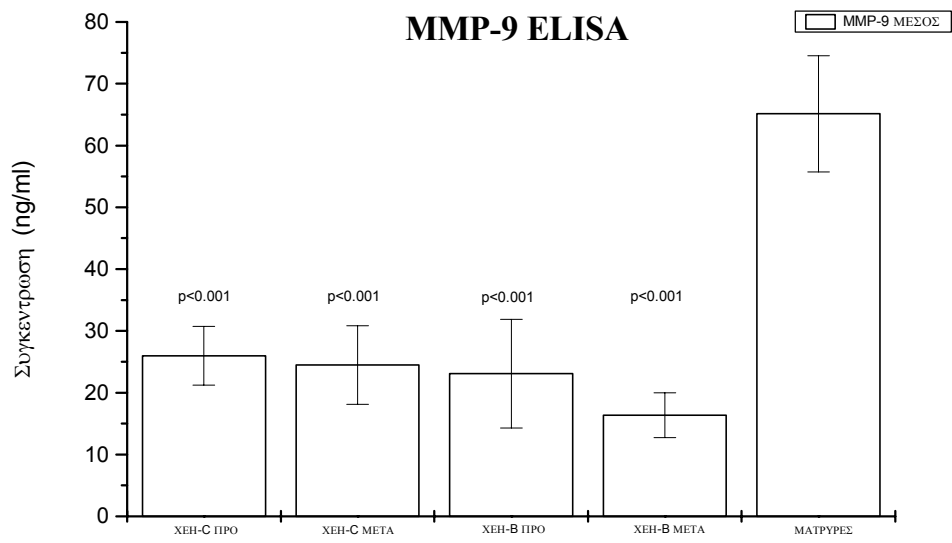
ΕΙΚΟΝΑ 4



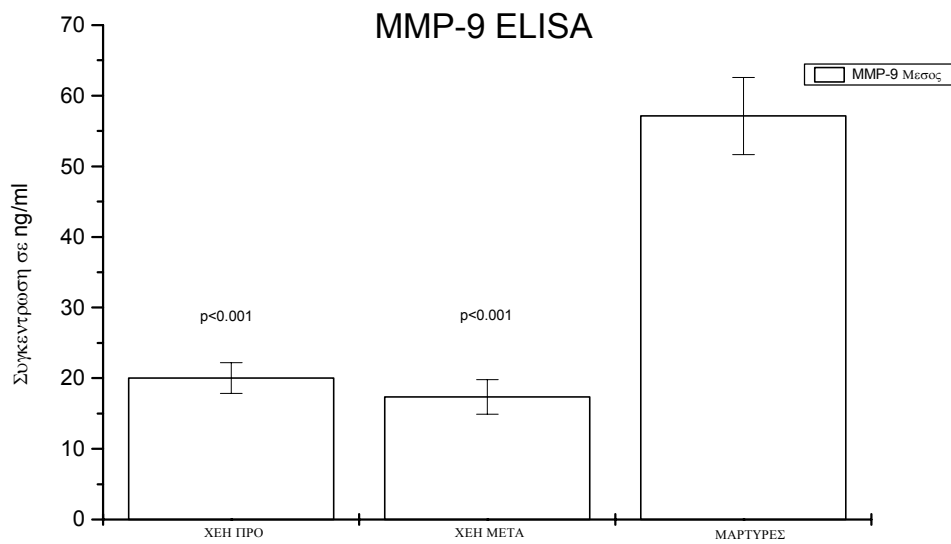
ΕΙΚΟΝΑ 5



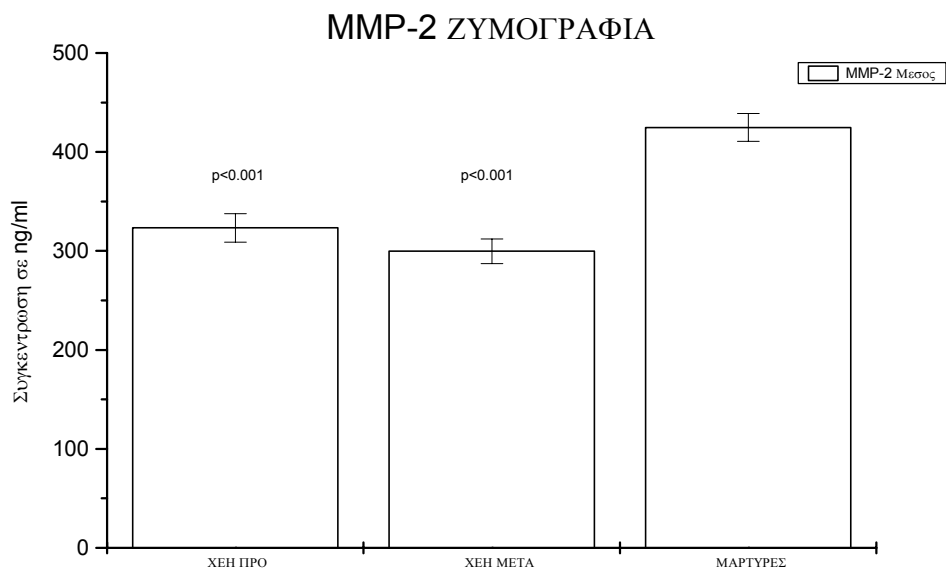
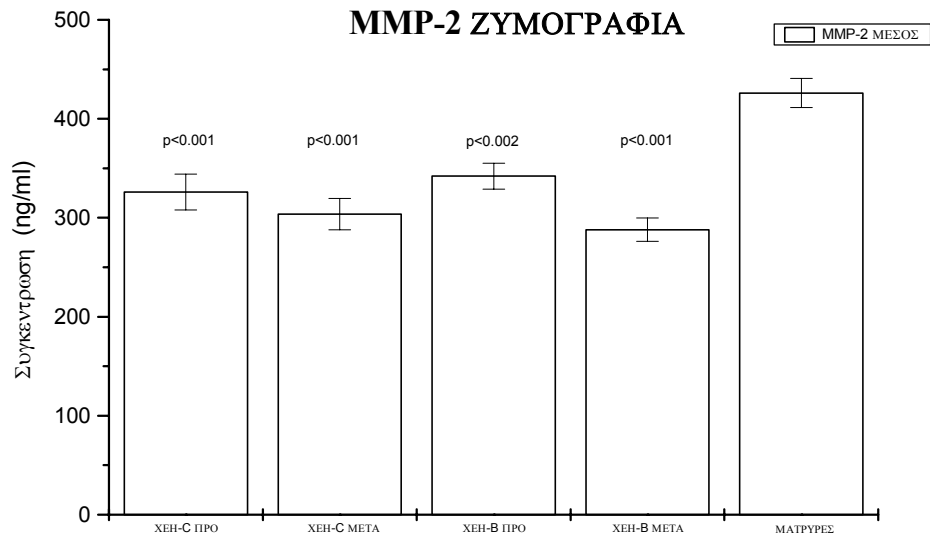
ΕΙΚΟΝΑ 6

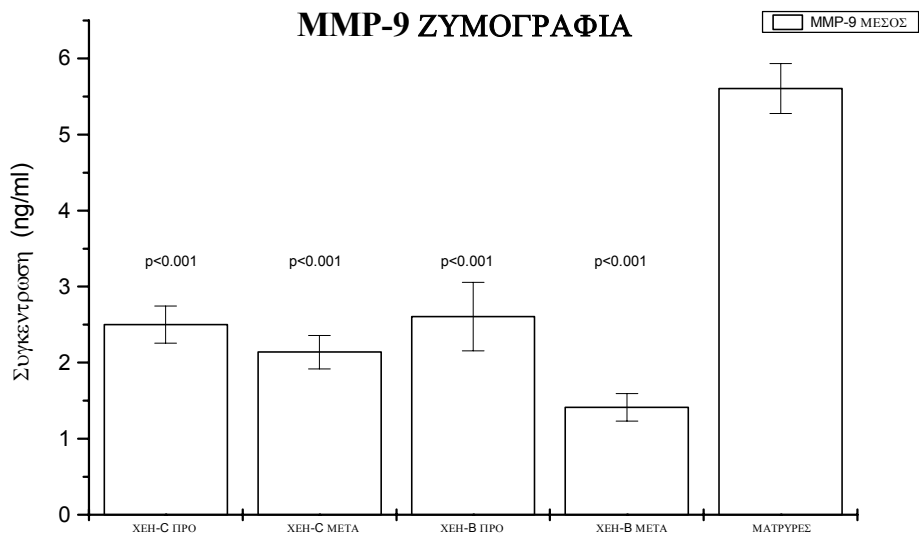


ΕΙΚΟΝΑ 7

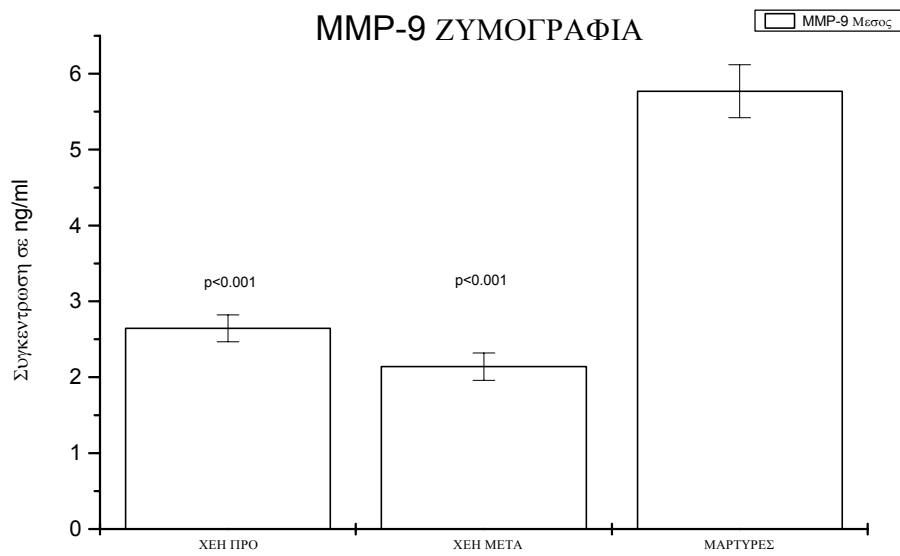


ΕΙΚΟΝΑ 8

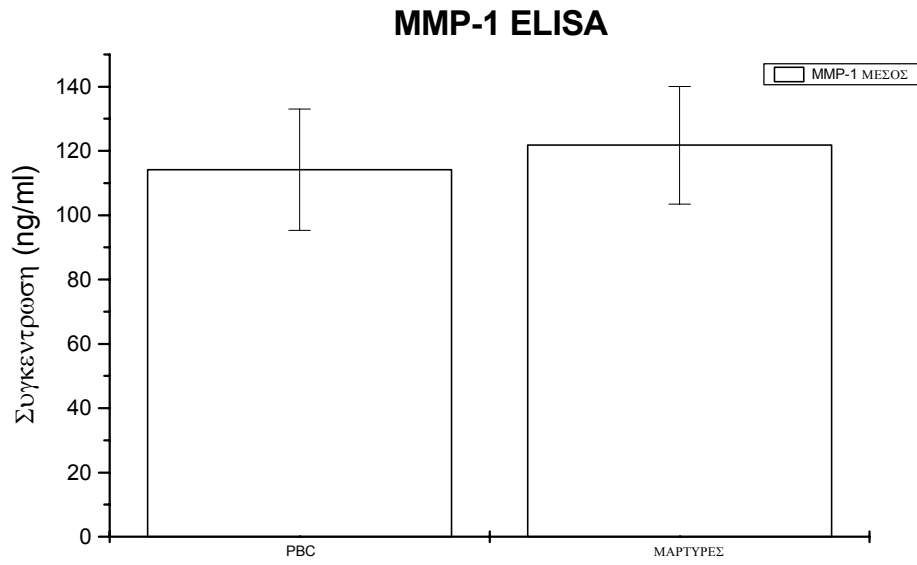




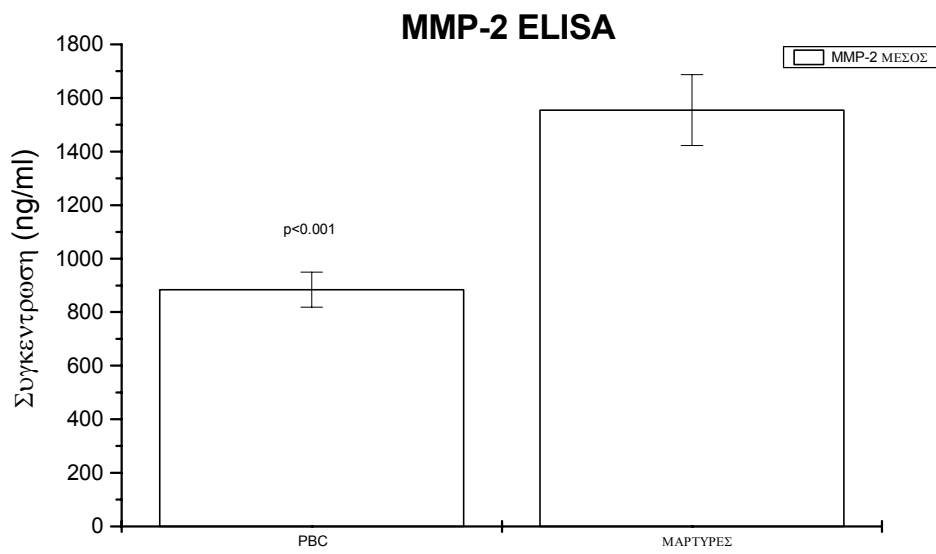
ΕΙΚΟΝΑ 11



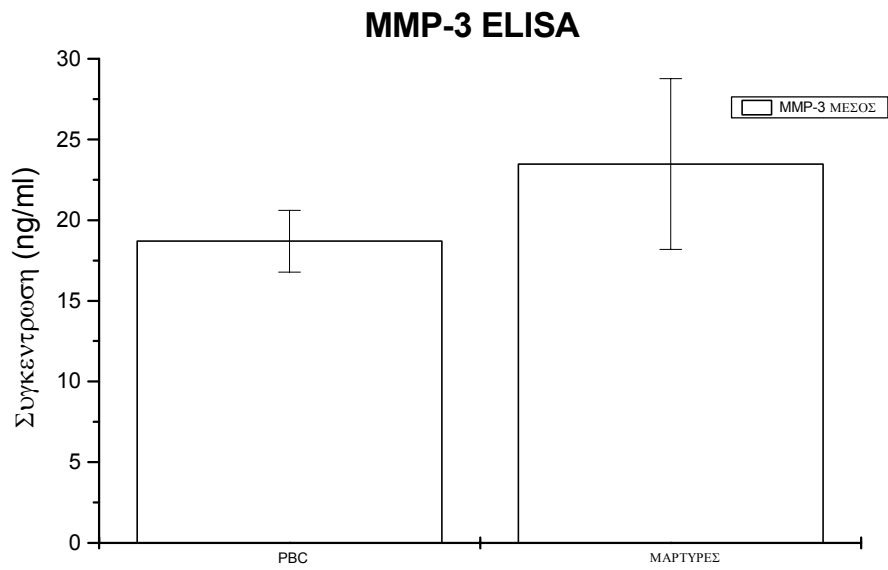
ΕΙΚΟΝΑ 12



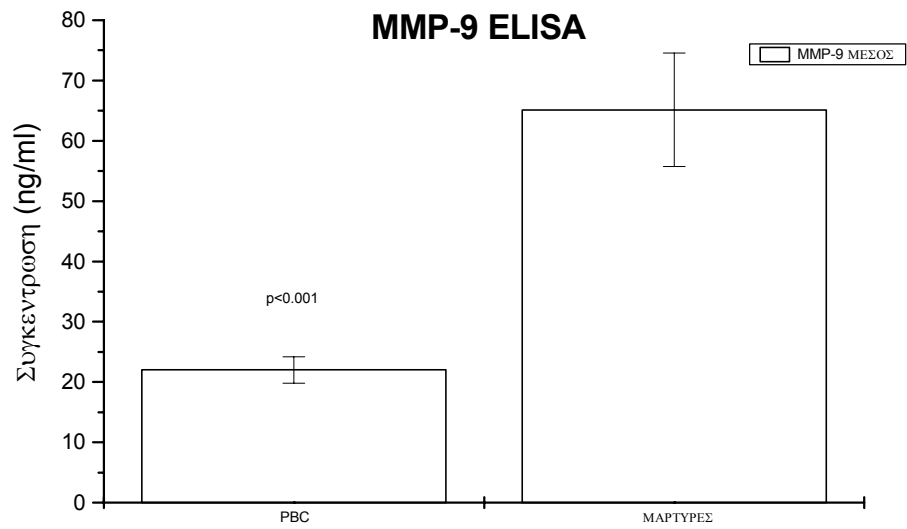
ΕΙΚΟΝΑ 13



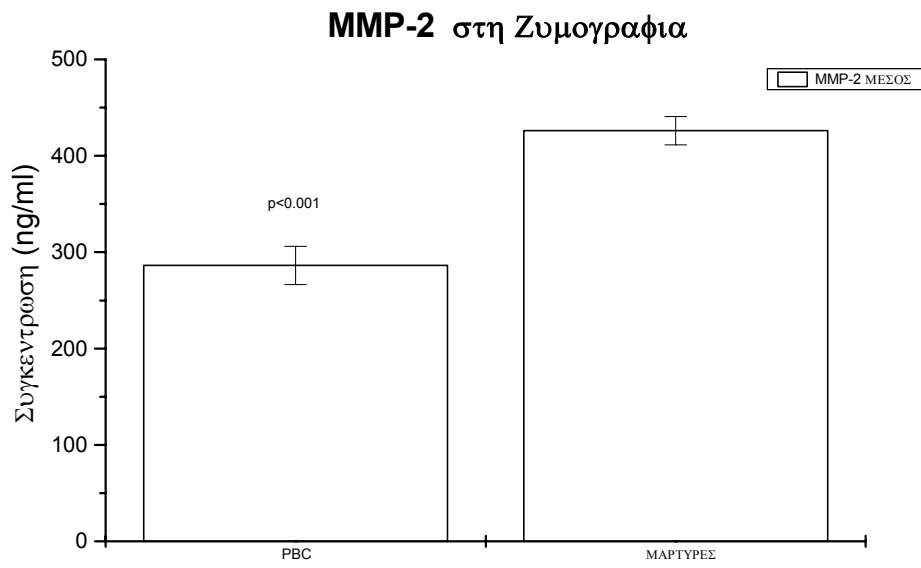
ΕΙΚΟΝΑ 14



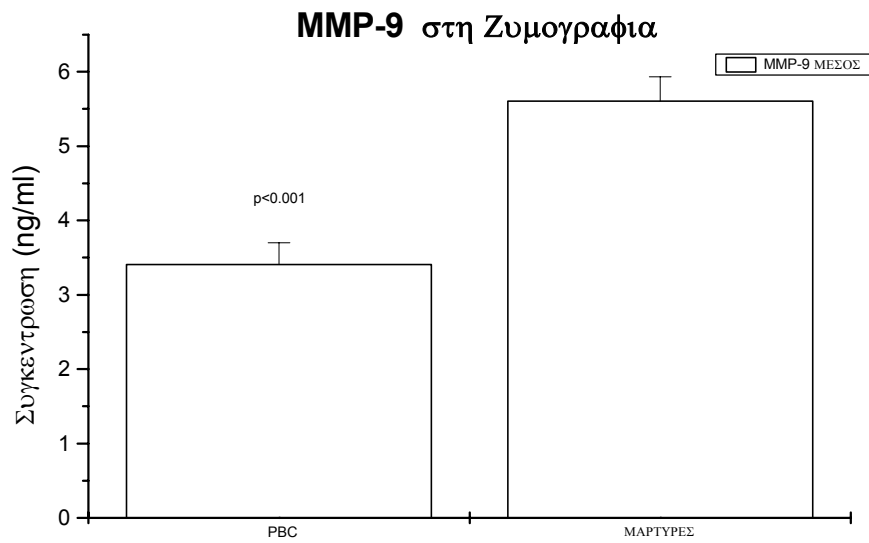
ΕΙΚΟΝΑ 15



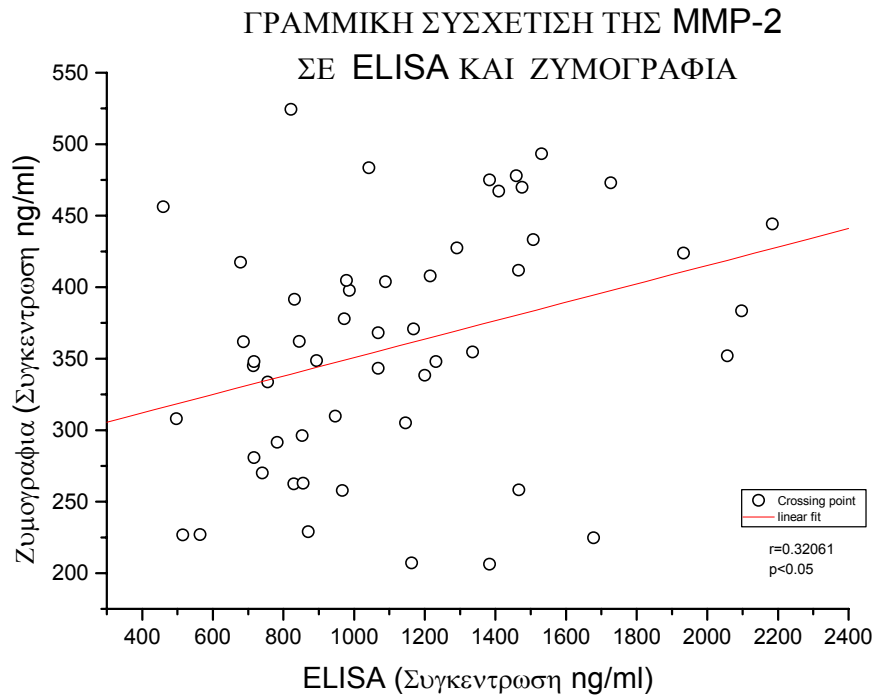
ΕΙΚΟΝΑ 16



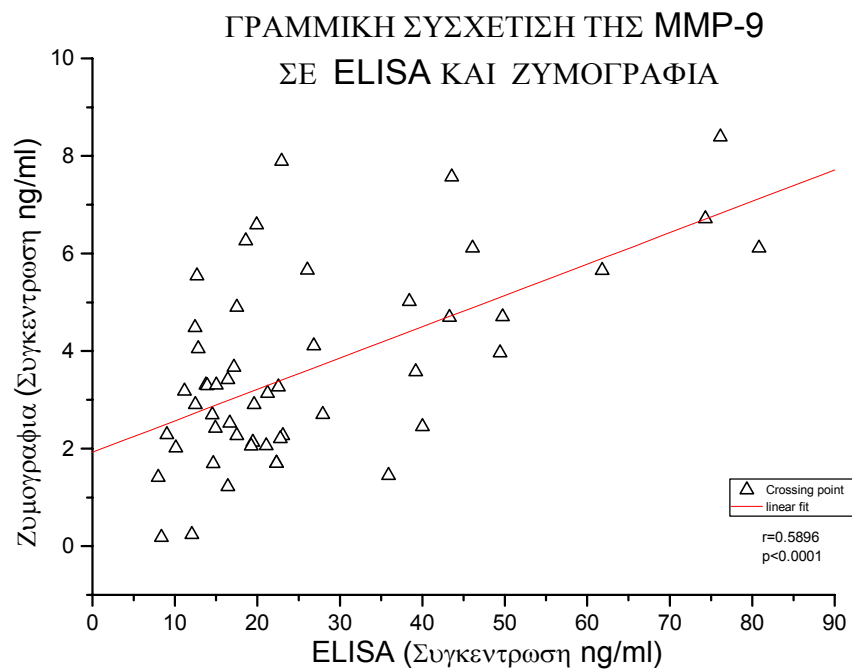
ΕΙΚΟΝΑ 17



ΕΙΚΟΝΑ 18



ΕΙΚΟΝΑ 19



ΕΙΚΟΝΑ 20

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Scheuer PJ. Primary biliary cirrhosis. *Proc Roy Soc Med* 1967;60:1257-1260.
2. Van Noorden S. Tissue preparation and immunostaining techniques for light microscopy. In: Polak JM, Van Noorden S eds. *Immunohistochemistry. Modern Methods and Applications*. 2nd edn. Bristol:Wright,1986;45-48.
3. Bruner JM, Connelly JH, Saya H. p53 protein immunostaining in routinely processed paraffin-embedded sections. *Modern Pathology* 1993;6:189-194.
4. Norton AJ. Microwave oven heating for antigen unmasking in routinely processed tissue sections. *J Pathol* 1993;171:79-80.
5. Gavrielli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA, (1992). Identification of programmed cell death via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* ; 119: 493-501.
6. Kleiner D, Stetler-Stevenson W. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994;218:325-29.
7. Rice JA, (1988). *Mathematical Statistics and Data Analysis*. Wadsworth and Brooks/Cole California; Chapter 12 (12.2.3):p406.
8. Agresti A, (1996). *An introduction to categorical Data Analysis*. Wiley, New York;Chapter 2:p45.
9. Feldman G, (1997). Liver apoptosis. *Journal of Hepatology* ;26 (Suppl.2):1-11.
10. Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama M, Mochizuki K, Kawanishi Y, Kasahara A, et al, (1994). Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* ; 19(6):1354-9.
11. Mita E, Hayashi N, Lio S, Takehara T, Hijioka T, Kasahara A, et al, (1994). Role of Fas ligand in apoptosis induced by hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* ;204(2):468-74.
12. Mochizuki K, Hayashi N, Hiramatsu N, Katayama K, Kawanishi Y, Kasahara A, et al, (1996). Fas antigene expression in liver tissues of patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol*;24:1,1-7.

13. Hayashi N, Mita E, (1997). Fas system and apoptosis in viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* ;12:9-10, S223-6.
14. Luo K, He H, Zhu Y, (1996). Fas expression and DNA impairment of hepatocyte in chronic hepatitis B. *Chung Hua Nei Ko Cih* ; 35(11):750-2.
15. Sekine K, Nishimaki T, Suzuki T, Kasukawa R, (1997). Expression of Fas antigene on hepatocytes in viral hepatitis patients. *Fukushima J Med Sci* ;43(1)51-9.
16. Feldman G, Lamboley C, Moreau A, Bringuier A, (1998). Fas-mediated apoptosis of hepatic cells. *Biomed Pharmacother* ; 52(9):378-85.
17. Lacronique V, Mignon A, Fabre M, Viollet B, Rouquet N, Molina T, et al, (1996). Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced an anti-Fas antibody in mice. *Nat Med* ;2(1):80-6.
18. Saile B, Knittel T, Matthes N, Schott P, Ramadori G, (1997). CD95/CD95L-mediated apoptosis of hepatic stellate cell. *American J Of Pathol*;151:5,1265-1272
19. Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, et al,(1998). Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* ;72(5):3691-7.
20. Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R, (1998). Hepatitis C virus core protein represses p21/WAF1/Cip1/Sid1 promoter activity. *Gene*;208(2):331-6.
21. Fujita T, Ishido S, Muramatsu S, Itoh M, Hotta H, (1996). Suppression of actinomycin D-induced apoptosis by the NS3 protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* ;229(3):825-31.
22. Luo KX, Zhu YF, Zhang LX, He HT, Wang XS, Zhang L, (1997). In situ investigation of Fas/FasL expression in chronic hepatitis B infection and related liver disease. *J Viral Hepat* ;4(5):303-7.
23. Farinati F, Cardin R, Errico AD, Grigioni W, Fiorentino M, Naccarato R, (1998). Apoptosis and cytoproliferation in HCV-related liver damage. *Gastroenterology* ;114:4,G2439.

24. Stahelin BJ, Marti U, Solioz M, Zimmermann H, Reichen J, (1998). False positive staining in the TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine caused by endogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate. *Mol Pathol*;51(4):204-8.
25. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993;53:1945-1951.
26. Migheli A, Attanasio A, Schiffer D. Ultrastructural detection of DNA strand breaks in apoptotic neural cells by in situ end-labelling techniques. *J Pathol* 1995;176:27-35.
27. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R, (1995). In situ detection of fragmented DNA (TUNEL) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death:a cautionary note. *Hepatology* ;21(5):1465-8.
28. Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 1993;170:1-8.
29. Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Sturzbecher HW, et al, (1995). Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res*;55(24):6012-6.
30. Elmore LW, Hancock AR, Chang SF, Wang XW, Chang S, Callahan CP, et al, (1997). Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* ;94(26):14707-12.
31. Henkler F, Waseem N, Golding MH, Alison MR, Koshy R, (1995). Mutant p53 but not hepatitis B virus X protein is present in hepatitis B virus-related human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* ;55(24):6084-91.
32. Terradillos O, Pollicino T, Lecoer H, Tripodi M, Gougeon ML, et al, (1998). P53 independent apoptotic effects of the hepatitis B virus HBx protein in vivo and in vitro. *Oncogene*;17(16):2115-23.

33. Livni N, Eid A, Ilan Y, Rivkind A, Rosenmann E, Blendis LM, et al, (1995). p53 expression in patients with cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma. *Cancer*;75(10):2420-6.
34. Koray C, Ilkser A, Nazan B, Ibrahim K, Cemil E, (1996). p53 mutation in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. *A J G*;91:7,1476-77.
35. Cox LS, (1997). Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21. *J Pathol* ;183:134-140.
36. Prives C, Hall P, (1999). The p53 pathway. *J Pathol* 1999;187:112-126.
37. Crary GS, Albrecht JH, (1998). Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human liver. *Hepatology* ;28:3,738-43.
38. Mitry RR, Sarraf CE, Wu CG, Pignatelli M, Habib NA, (1997). Wild-type p53 induced apoptosis in Hep3B through up-regulation of bax expression. *Lab Invest*;77(4):369-78.
39. Qin LF, Ng IO, Fan ST, Ng M, (1998). P21/WAF1, p53 and PCNA expression and mutation status in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*; 79(4):424-8.
40. Capoulade C, Bressac-de Paillerets B, Lefrere I, Ronsin M, Feunteun J, Tursz T , et al ,(1998). Overexpression of mdm-2, due to enhanced translation, results in inactivation of wild-type p53 in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene*;16(12):1603-10.
41. Chen L, Agrawal S, Zhou W, Zhang R, Chen J, (1998). Synergistic activation of p53 by inhibition of mdm-2 expression and DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* ;95(1):195-200.
42. Thomas A, White E, (1998). Suppression of the p300-depender mdm-2 negative-feed back loop induces the p53 apoptotic function. *Genes Dev*;12(13):1975-85.
43. Charlotte F, Lhermini A, Geleyn Y, Martin N, Nollet M, Gaulard P, et al, (1994). Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver. *Am J Pathol* ;144:3,460-5.
44. Skopelitou A, Hadjiyannakis M, Alexopoulou V, Krikoni O, Kamina S, Agnanti N, (1996). Topographical immunohistochemical expression of Bcl-2 protein in human liver lesions. *Anticancer Research*;16:975-978.

45. Frommel TO, Yong S, Zarling EJ, (1999). Immunohistochemical evaluation of Bcl-2 gene family expression in liver of hepatitis C and cirrhotic patients: a novel mechanism to explain the high incidence of hepatocarcinoma in cirrhotics. *Am J Gastroenterol* ;94(1):178-82.
46. Nakanuma Y, Ohta G, Kono N, Kobayashi K, Kato Y. Electron microscopic observation of destruction of biliary epithelium in primary biliary cirrhosis. *Liver* 1983;3:238-248.
47. Harada K, Ozaki S, Gershwin EM, Nakanuma Y. Enhanced apoptosis relates to bile duct loss in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997;26:6:1399-1405.
48. Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Sata M, Tanikawa K. Nuclear DNA fragmentation and expression of Bcl-2 in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997;25:5: 1077-1084.
49. Ballardini G, Ghetti S, Lavi F, Descorich C, Grassi A, Zanti D, Bianchi F. Apoptosis is not a frequent cholangiocyte pattern of death in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1998;28:pt 2, 626 A.
50. Kuroki T, Seki S, Kawakita N, Nakatani K, Hisa T, Kitada T, Sakaguchi H. Expression of antigens related to apoptosis and proliferation in chronic nonsuppurative destructive cholangitis in primary biliary cirrhosis. *Virchows Arch* 1996;429:2-3,119-29.
51. Shi L, Kraut RP, Aebersold R, Greenberg AH. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J Exp Med* 1992;175:553-566.
52. Patel T, Bronk S, Gores G. Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1994;94:2183-2192.
53. Dahl R, Gumprich E, Deveraux M, Sokol RO. Bile acid induced apoptosis and necrosis: Differential response of cultured and suspended hepatocytes to hydrophobic and hydrophilic bile acids. *Hepatology* 1998;28pt.2,627A.
54. Kurosawa H, Que F, Roberts RL, Fesmier PJ, Gores GJ. Hepatocytes in the bile duct ligated rat express Bcl-2. *Am J Physiol* 1997;35:G1587-1593.

55. Martinou JC, Dubois-Dauohin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P et al. Overexpression of bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 1994;13:1017-1030.
56. Gapany C, Zhao M, Zimmermann A. The apoptosis protector bcl-2 is downregulated in bile duct epithelial cells of human liver allografts. *J Hepatol* 1997;26:535-542.
57. Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K et al. Circulating matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as serum markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Relationship to interferone response. *J Hepatol* 1997;26:3574-83.
58. Ebata M, Fukuda Y, Nakano I et al. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 and of precursor form of matrix metalloproteinase-2 in patients with liver disease. *Liver* 1997;17:293-9.
59. Murawaki Y, Ikuta Y, Idobe Y et al. Serum matrix metalloproteinase-1 in patients with chronic viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:138-45.
60. Arai M, Niioka M, Maruyama K et al. Changes in serum levels of metalloproteinases and their inhibitors by treatment of chronic hepatitis C with interferon. *Dig Dis Sci* 1996;41:995-1000.
61. Walsh KM, Timms P, Campbell S et al. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 as noninvasive markers of liver disease in chronic hepatitis C: comparison using ROC analysis. *Dig Dis Sci* 1999;44:624-30.
62. Marawaki Y, Yamada S, Ikuta Y et al. Clinical usefulness of serum matrix metalloproteinase-2 concentration in patients with chronic viral liver disease. *J Hepatol* 1999;30:1090-8.
63. Hayasaka A, Suzuki N, Fujimoto N et al. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinases-9 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996;24:1058-62.
64. Marawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K et al. Serum matrix metalloproteinase-3 concentration in patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 1999;31:474-81.

65. Fujimoto N, Mouri N, Iwata K et al. A one step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase-2 using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta* 1993; 221:1-2, 91-103.