ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΤΟ
ΟΜΩΝΥΜΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΤΟΥ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Δ/ντής: Καθηγητής Γ. Ν. Νταλέκος

ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ ΡΕΤΙΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΗΣ
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ
ΗΠΑΤΟΣ

Αντίγονος Γιαγκούδης
Ιατρός Παθολόγος

Διδακτορική Διατριβή που υποβλήθηκε στο Ιατρικό Τμήμα
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λάρισα 2013

© 2013 Αντίγονος Γιαγκούδης

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Νταλέκος Ν. Γεώργιος

Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας - (Επιβλέπων)

Σταθάκης Νικόλαος

Ομότιμος Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος

Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Νταλέκος Ν. Γεώργιος

Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σταθάκης Νικόλαος

Ομότιμος Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος

Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κουκούλης Γεώργιος

Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Πετεινάκη Ευθυμία

Αν. Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μακαρίτσης Κωνσταντίνος

Επικ. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μουλάς Ανάργυρος

Καθηγητής Τμ. Ζωικής Παραγωγής, ΤΕΙ Λάρισας

Συμμετοχή σε Ανακοινώσεις Συνεδρίων :

Λάρισα, Οκτώβριος 2004, 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Στρες “Μέθοδος προσδιορισμού ισομερών του ρετινοϊκού οξέος και ρετινόλης στον ορό, με HPLC και ηλεκτροχημική ανίχνευση”.

Paris, March 2005, Nutrition oxygen biology and medicine. “Serum retinol and retinoic acid levels in patients with chronic viral hepatitis”.

Alba, Italy. September 2005, Oxidants and Antioxidants in Biology. “Simultaneous determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 3-nitrotyrosine in urine by HPLC”.

Awaji, Japan. November 2005, International Interdisciplinary Conference on Vitamins Coenzymes, and Biofactors. “Serum retinol and retinol binding protein in patients with chronic viral hepatitis”.

Καλαμπάκα Μάρτιος 2012, 15th International Meeting on Fat Soluble Vitamins, FSV 2012, “ The metabolism of retinoids in chronic viral liver disease”.

Καλαμπάκα Μάρτιος 2012, 15th International Meeting on Fat Soluble Vitamins, FSV 2012, “ The metabolism of retinoids in autoimmune liver disease”.

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΡΟΣ Α

ΒΙΤΑΜΙΝΗ Α ΚΑΙ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΗ

1. Χημική δομή – Μεταβολισμός και αποθήκευση ρετινοειδών στον οργανισμό
2. Ρετινοειδή πλάσματος
3. Βιολογική σημασία - δράσεις ρετινοειδών
4. Ρετινοειδή και ανοσία
5. Ρετινοειδή και μεταβολισμός

ΜΕΡΟΣ Β

ΗΠΑΡ ΚΑΙ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΗ

1. Παρεγχυματικά και μη παρεγχυματικά κύτταρα ήπατος
2. Στοιχεία ανοσολογίας ήπατος
3. Ήπαρ και ανοσοανοχή
4. Ανοσορρύθμιση και Αστεροειδή κύτταρα
5. Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killer Cells-NK)
6. Ρετινοειδή και φυσιολογικό ήπαρ

ΜΕΡΟΣ Γ

I. Χρόνιες ηπατικές νόσοι

ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

1α Στοιχεία επιδημιολογίας και παθοφυσιολογίας

1β Ρετινοειδή και αλκοολική νόσος του ήπατος

ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

2α Στοιχεία επιδημιολογίας και παθοφυσιολογίας

2β Ρετινοειδή και Αδιποκίνες-Μεταβολισμός Λιπιδίων

2γ Οξειδωτικό stress, αντίδραση του ανοσιακού και Ρετινοειδή

ΧΡΟΝΙΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΕΣ

3.1 ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β

3.1α Στοιχεία επιδημιολογίας και παθοφυσιολογίας

3.1β Ρετινοειδή και χρόνια HBV λοίμωξη

3.2 ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C

3.2α Στοιχεία επιδημιολογίας και παθοφυσιολογίας

3.2β Ηπατίτιδα C και Ρετινοειδή

3.2γ Ο ρόλος του ATRA στη θεραπεία της Ηπατίτιδας C

ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΕΣ

4.1 ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ

4.1α Στοιχεία επιδημιολογίας και παθοφυσιολογίας

4.1β Ρετινοειδή και αυτοάνοση ηπατίτιδα

4.2 ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ (PRIMARY BILLIARY CIRRHOSIS-PBC)

4.1α Στοιχεία επιδημιολογίας και παθοφυσιολογίας

4.2β Ρετινοειδή και PBC

4.3 ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΤΙΚΗ ΧΟΛΑΓΓΕΙΙΤΙΔΑ (PRIMARY SCLEROSING CHOLANGITIS-PSC)

4.3α Στοιχεία επιδημιολογίας και παθοφυσιολογίας

4.3β Ρετινοειδή και PSC

II. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Α ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΩΝ

A. Ο ρόλος των ρετινοειδών.

B. Ο ειδικός ρόλος των ρετινοειδών στην παθοφυσιολογία της κάθε ηπατοπάθειας.

B.1. ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΝΟΣΟΣ

B.2. ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΣΤΕΑΤΟΗΠΑΤΙΤΙΣ

B.3. ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C

B.4. ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ B

B.5. ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΗΠΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

B.6. ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΚΑΙ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΗ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

II. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A.ΑΣΘΕΝΕΙΣ

B.ΒΙΟΨΙΕΣ ΗΠΑΤΟΣ

Γ.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΩΝ

Γ.1.Χρωματογραφία-Γενικές αρχές

Γ.2.Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance - Liquid Chromatography)

Γ.3.Ειδικά χαρακτηριστικά της μεθόδου

Γ.4.Συλλογή και επεξεργασία του δείγματος

Γ.5.Μέτρηση των ρετινοειδών με HPLC

Δ.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

IV.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

V.ΠΕΔΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

**ΤΑ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΗ ΣΤΗ ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ-ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ RA**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

SUMMARY – CONCLUSIONS

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι χρόνιες ηπατοπάθειες, τόσο οι ιογενείς, (χρόνια ηπατίτιδα Β, χρόνια ηπατίτιδα C) όσο οι αυτοάνοσες (αυτοάνοση ηπατίτιδα, πρωτοπαθής χολική κίρρωση, πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα), αλλά και η αλκοολική νόσος του ήπατος και η μη αλκοολική νόσος του ήπατος αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως. Το ήπαρ παίζει σημαντικό ρόλο στη διαχείριση της βιταμίνης Α (ρετινόλης), ενώ αυτή με τη σειρά της επηρεάζει τη λειτουργία του ανοσοποιητικού. Καθώς η παθοφυσιολογία των χρόνιων ηπατοπαθειών συνδέεται άμεσα με το ανοσοποιητικό, η μελέτη του ρόλου της βιταμίνης Α στα νοσήματα αυτά φαντάζει λογική και επιβεβλημένη.

Στην παρούσα μελέτη μετρήθηκαν τα επίπεδα της ρετινόλης και των μεταβολιτών της (9-cis ρετινοϊκό οξύ και all-trans ρετινοϊκό οξύ) στον ορό ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β, χρόνια ηπατίτιδα C, αυτοάνοση ηπατίτιδα, πρωτοπαθή χολική κίρρωση, πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα αλκοολική νόσο του ήπατος και μη αλκοολική νόσο του ήπατος, αλλά και σε υγιείς εθελοντές. Στη συνέχεια έγιναν συγκρίσεις των τιμών των υγιών με αυτές των ασθενών, αλλά και μεταξύ των πασχόντων από διαφορετικές ασθένειες, ενώ τα ευρήματα συσχετίστηκαν με στοιχεία από το ιστορικό, τις ταυτόχρονα διεξαχθείσες υπόλοιπες εργαστηριακές εξετάσεις αλλά και με χαρακτηριστικά της ιστολογικής εικόνας όταν υπήρχε διαθέσιμη πρόσφατη βιοψία ήπατος.

Για την εκπόνηση της διατριβής και την ολοκλήρωσή της υπήρξε πολύτιμη βοήθεια από πολλούς στους οποίους εκφράζω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη.

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γεώργιο Ν. Νταλέκο και τον Καθηγητή Ανάργυρο Μουλά, διότι μου έδωσαν τις ιδέες, την ευκαιρία αλλά και

τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, παρά το γεγονός ότι οι συνυπάρχουσες συνθήκες φαινόταν αποθαρρυντικές. Ο Καθηγητής κ. Μουλάς έθεσε στη διάθεσή μου το Εργαστήριο Γεωργικής Χημείας του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του ΤΕΙ Λάρισας. Εκεί με την καθοδήγησή του και τη βοήθεια της Διδάκτορος της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Βιοχημικού κ. Ελεάνας Καφέ, πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις των επιπέδων των ρετινοειδών. Ο Καθηγητής κ. Νταλέκος και οι συνεργάτες του, κ. Καλλιόπη Ζάχου, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας και κ. Νικόλαος Γατσέλης, Λέκτορας Παθολογίας, επιμελήθηκαν το κλινικό μέρος της μελέτης και τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Ο κ. Κωνσταντίνος Γαλάνης, Ιατρικός Επισκέπτης Υγείας, ασχολήθηκε με τη συλλογή των δειγμάτων. Τους ευχαριστώ όλους θερμά. Το παρόν σύγγραμμα αφιερώνεται στην Αθηνά Ελευθεριάδου και τα παιδιά μας Θανάση και Γιώργο, αλλά και στους γονείς μου για την αγάπη, τη στήριξη και την κατανόησή τους. Η παρούσα μελέτη έλαβε χρηματοδότηση από το ερευνητικό πρόγραμμα «Αρχιμήδης».

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΡΟΣ Α

ΒΙΤΑΜΙΝΗ Α ΚΑΙ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΗ

1. Χημική δομή – Μεταβολισμός και αποθήκευση ρετινοειδών στον οργανισμό

Η βιταμίνη Α (ρετινόλη) ανήκει στα διτερπένια ($C_{20}H_{30}O$) και συναντάται μόνο στα ζώα. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Karrer το 1931. Η προβιταμίνη της βρίσκεται στα φυτά και ανήκει στην ομάδα των καροτενοειδών που είναι τετρατερπένια (C_{40}) και περιέχουν μεγάλο αριθμό διπλών συζυγικών δεσμών. Τροφές πλούσιες σε βιταμίνη Α και καροτενοειδή, είναι τα γαλακτοκομικά, τα σπλάχνα των ζώων, τα κίτρινα και τα φυλλώδη πράσινα λαχανικά καθώς και τα φρούτα. Τα πιο σημαντικά καροτενοειδή είναι το καροτένιο ($C_{40}H_{56}$) και η λουτεΐνη ($C_{40}H_{56}O_2$). Τρία ισομερή έχουν απομονωθεί από τα καρότα (α, β, και γ καροτένιο). Στα φυσικά καροτένια, η πλειοψηφία των διπλών δεσμών έχει trans στερεομετρία. Το α-καροτένιο είναι το μόνο ισομερές που είναι οπτικά ενεργό ενώ ως προβιταμίνη Α, έχει τη μισή δραστηριότητα του β-καροτένιου, το οποίο είναι συμμετρικό μόριο όσον αφορά τον κεντρικό διπλό δεσμό.

Το προσλαμβανόμενο με τις τροφές β-καροτένιο διαλυτοποιείται σε μικτά μυκήλια με στοιχεία χολής και υδρολύματα διαιτητικών λιπιδίων και απορροφάται από τα κύτταρα του τοιχώματος του δωδεκαδακτύλου και του άνω τμήματος της νήστιδας. Έπειτα, το β-καροτένιο μπορεί να μετατραπεί σε δύο μόρια ρετινάλης με διάσπαση, ειδικά στον κεντρικό διπλό δεσμό, αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο β-καροτένιο-15,15'-διοξυγενάση. Η σχηματισθείσα ρετινάλη, μεταβολίζεται σε ρετινόλη και ρετινοϊκό οξύ (RA) και έπειτα μετατρέπεται σε εστέρες παλμιτικού, στεατικού ή άλλου λιπαρού οξέος μακράς αλυσού. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από την αναγωγή της ρετινάλης και την λεκιθίνη-ρετινόλη-ακυλ-τρανσφεράση (LRAT) με τη βοήθεια της «κυτταρικής πρωτεΐνης δέσμευσης ρετινόλης τύπου II» (CRBP II). Η LRAT καταλύει την εστεροποίηση της ρετινόλης σε αρκετούς ιστούς που τη μεταβολίζουν όπως το λεπτό έντερο, το ήπαρ, ο αμφιβληστροειδής, το δέρμα,

ο όρχις και ο πνεύμονας. Η LRAT βρίσκεται στην κεφαλή του μονοπατιού βιοσύνθεσης του RA. Πέρα από το ρόλο της στη μετατροπή ρετινόλης σε εστέρες για αποθήκευση, πιθανότατα μια άλλη λειτουργία της είναι η απομάκρυνση της ρετινόλης από πηγές οξειδωσης, βοηθώντας στην προς τα κάτω ρύθμιση της βιοσύνθεσης του RA (1),(2). Στη συνέχεια οι εστέρες ενσωματώνονται σε χυλομικρά και απελευθερώνονται στη λεμφική κυκλοφορία. Όταν υπάρχει έλλειψη της CRBP II, η ακυλ-CoA-ρετινάλη-ακυλ-τρανσφεράση (ARAT) μπορεί να εστεροποιήσει τη ρετινόλη, αλλά αυτό είναι ένα μεταβολικό μονοπάτι μικρότερης σημασίας (3),(4).

Εικόνα (1). Δομές των σημαντικότερων ρετινοειδών (5).

Οι εστέρες ρετινόλης μέσω της λέμφου αποθηκεύονται στο ήπαρ, που αποτελεί την κύρια αποθήκη τους στον οργανισμό, ενώ σε μικρότερες ποσότητες αποθηκεύονται στους νεφρούς και τα επινεφρίδια. Τα ρετινοειδή βρίσκονται κυρίως με τη μορφή εστέρων στα μη παρεγχυματικά αστεροειδή κύτταρα (κύτταρα Ito) αλλά και στα ηπατοκύτταρα αποθηκευμένα σε λιποσταγονίδια. Οι εστέρες ρετινόλης μεταβολίζονται σε ρετινόλη από μία εστεράση εξαρτώμενη από χολικά άλατα και έπειτα μεταφέρονται στα αστεροειδή κύτταρα συνδεδεμένα με την «συνδέουσα τη ρετινόλη, πρωτεΐνη ορού» (RBP4). Η RBP4 έχει μοριακό βάρος 21-kd και στον ορό κυκλοφορεί συνδεδεμένη με την τρανσθυρετίνη. Η RBP4 συντίθεται στο ήπαρ και στο λιπώδη ιστό. Η απελευθέρωση της στην κυκλοφορία εξαρτάται από την

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ημερομηνία και τόπος γέννησης : 4 Δεκεμβρίου 1974, Θεσσαλονίκη

Βασικές Σπουδές : Σεπτέμβριος 1993 - Ιούνιος 1999, Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Βαθμός : 6 και 50/69, «Λίαν Καλώς».

Υποχρεωτική υπηρεσία υπαίθρου : Σεπτέμβριος 1999 – Δεκέμβριος 2000, Νοσοκομείο – Κέντρο Υγείας Γουμένισσας (τρίμηνη υποχρεωτική εκπαίδευση), Περιφερειακό Ιατρείο Αξιούπολης.

Στρατιωτική θητεία : ΚΕΥΓ Άρτας, 190 Α/Κ ΜΒΠ ΠΕΠ - Θεσσαλονίκη, 3/4 ΤΕΦ – Μ Δέρειο Έβρος.

Λήψη Ιατρικής Ειδικότητας : Αύγουστος 2002- Μάιος 2007 Παθολογική Κλινική_Α΄ Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης «Ο Άγιος Παύλος»

Μετέπειτα επαγγελματική εμπειρία :

Σεπτέμβριος 2007 - σήμερα, Ιδιωτικό Ιατρείο στην Επανομή Θεσσαλονίκης
Δεκέμβριος 2011 – σήμερα, συνεργάτης στο Ιατρικό τμήμα της Express Service

Νοέμβριος 2007 – Νοέμβριος 2010, Ιατρός του ΚΑΠΗ Επανομής

Οκτώβριος 2007 – Απρίλιος 2012, σύμβουλος Παθολόγος, Ιατρός στη Μονάδα Αιμοκάθαρσης της Βιοκλινικής Θεσσαλονίκης

επαρκή παροχή ρετινόλης. Σε περιπτώσεις έλλειψης ρετινόλης, η RBP4 συσσωρεύεται στο ήπαρ χωρίς αλλαγή στα επίπεδα mRNA σταθερής κατάστασης, γεγονός που δείχνει ότι μετα-μεταγραφική ρύθμιση ευθύνεται για τα επίπεδα του ορού. Οι εστέρες ρετινόλης επανασχηματίζονται με τη δράση της ηπατικής LRA, μέσω της οποίας συνδέεται η ρετινόλη με τη CRBP I, μία πρωτεΐνη που συντίθεται από τα ηπατοκύτταρα. Σε αρουραίους που αδυνατούν να συνθέσουν CRBP I, παρατηρείται μειωμένη ικανότητα αποθήκευσης των ρετινοειδών, ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής τους μειώνεται σημαντικά, γεγονός που καταδεικνύει τη σημασία της CRBP I στο μεταβολισμό των ρετινοειδών. Η σχέση αποθήκευσης της ρετινόλης ανάμεσα στα ηπατοκύτταρα και τα αστεροειδή κύτταρα εξαρτάται από τη συνολική επάρκεια ρετινόλης στον οργανισμό. Σε καταστάσεις ένδειας ρετινόλης, αυτή αποθηκεύεται στα ηπατοκύτταρα, ενώ όταν υπάρχει επάρκεια η μεγαλύτερη ποσότητα κατευθύνεται στα λιποσταγονίδια των αστεροειδών κύτταρων όπου βρίσκεται το 60-90% σε φυσιολογικές συνθήκες. Η σύνδεση με τη CRBP I θεωρείται ότι προστατεύει το ευάλωτο μόριο της από μη ειδικά ένζυμα, αλλά και το ηπατοκύτταρο αφού η ρετινόλη θεωρείται δυνητικά τοξική για τις κυτταρικές μεμβράνες (4),(6).

Υπάρχουν δύο χαρακτηριστικοί τύποι λιποσταγονιδίων. Στον πρώτο, τα λιποσταγονίδια είναι μικρά (2μm), αφοριζόμενα από μεμβράνη, ενώ στον δεύτερο μεγάλα (8μm), χωρίς μεμβράνη. Περιέχουν εστέρες ρετινόλης και τριγλυκερίδια σε ίση αναλογία, που ισοδυναμεί με τα 3/4 του όγκου τους, καθώς και ελεύθερα λιπαρά οξέα και εστέρες χοληστερόλης. Στην επιφάνειά τους παρατηρούνται μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών PAT (Περίλιπίνη, Αδιποφιλίνη, TIP47), καθώς και η σχετιζόμενη με τη διαφοροποίηση του λιποκυττάρου πρωτεΐνη -adipose differentiation-related protein (ADRP). Η περίλιπίνη δεν απαντάται στην επιφάνεια λιποσταγονιδίων που ανήκουν σε ηπατοκύτταρα ατόμων με απόλυτα φυσιολογικό ήπαρ. Το μέγεθος και ο αριθμός των λιποσταγονιδίων επηρεάζονται από τα προσλαμβανόμενα ρετινοειδή και όχι από τα τριγλυκερίδια. Αξίζει να σημειωθεί ότι αρουραίοι που παρουσιάζουν ανεπάρκεια της LRA δεν έχουν λιποσταγονίδια (7),(8).

Εικόνα (2). Λιποσταγονίδια αστεροειδών ηπατικών κυττάρων από ανθρώπινο ήπαρ. Η εικόνα δείχνει τα χαρακτηριστικά λιποσταγονίδια (LD) που βρίσκονται στα αστεροειδή κύτταρα (SC). Ο πυρήνας (N) συμπιέζεται από τα λιποσταγονίδια, και ελάχιστο κυτταρόπλασμα είναι ορατό. Επίσης, είναι ορατά και δύο γειτονικά ηπατοκύτταρα (H) (5).

Το RA, είναι ο βιολογικά ενεργός μεταβολίτης της ρετινόλης. Φυσικά ή συνθετικά μόρια με δομή παρόμοια με τη ρετινόλη αναφέρονται ως ρετινοειδή. Στα ισομερή του RA περιλαμβάνονται τα : all-trans RA (at-RA), 9-cis-RA, 11-cis-RA, 13-cis-RA, και 9,13-dicis-RA.

Η ρετινόλη, ως πρόδρομη μορφή των βιολογικά δραστικών οξέων, αποτελεί το κύριο ρετινοειδές που κυκλοφορεί στον ορό, με συγκεντρώσεις αναφοράς 1–3 μM (9,10), ενώ σε παλαιότερες μελέτες, οι συγκεντρώσεις των at-RA και 13-cis-RA σε υγιείς εθελοντές κυμαίνονταν μεταξύ 3–13 nM (11,12). Σε αρουραίους, οι συγκεντρώσεις των at-RA και 13-cis-RA στον ορό, κυμαίνονταν στα 1–3 nM, ενώ οι ιστικές συγκεντρώσεις ήταν μεγαλύτερες, δηλαδή 7–40 nM για το at-RA και 1–6 nM για το 13-cis-RA. Οι ιστικές

συγκεντρώσεις του 9,13-dicis-RA ήταν 3–23 nM, ενώ 9-cis-RA δεν βρέθηκε ούτε στον ορό, ούτε στους ιστούς (13).

Το RA παράγεται από τη ρετινόλη σε δύο βήματα, από τα οποία το πρώτο, η μετατροπή της ρετινόλης σε ρετινάλη, καθορίζει το ρυθμό παραγωγής (14). Η ρετινόλη οξειδώνεται ενδοκυττάρια από τις αφυδρογονάσες (ADH ή RDH) σε ρετινάλη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε RA από NAD/NADP εξαρτώμενες αφυδρογονάσες (RALDH 1,2,3,4) (15). Ένζυμα του κυτοχρώματος P450 όπως τα CYP26, CYP3A, και CYP2C, φαίνεται να παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στον καταβολισμό του RA.

Με βάση τις σοβαρές συνέπειες της υπερέκθεσης και της υποέκθεσης σε RA προκύπτει μια σαφής ανάγκη ελέγχου τόσο των κυτταρικών, όσο και των ολικών επιπέδων του, που δεν είναι επακριβώς γνωστό πώς επιτυγχάνεται. Γενικά, πιστεύεται ότι η ρετινόλη που κυκλοφορεί στο πλάσμα, προσλαμβάνεται από τα κύτταρα και οξειδώνεται σε RA. Δύο μοντέλα μεταβολισμού του RA έχουν προταθεί, το παρακρινές και το αυτοκρινές. Στο πρώτο, το RA παράγεται σε ένα κύτταρο και στη συνέχεια προσλαμβάνεται είτε από έναν ιστό στόχο όπου συνδέεται με τον ομόλογο υποδοχέα, είτε από ιστό μη στόχο όπου μεταβολίζεται (16). Στο αυτοκρινές μοντέλο, το RA συντίθεται, συνδέεται με τον υποδοχέα και μεταβολίζεται στο ίδιο κύτταρο (17). Σύμφωνα με τα υπάρχοντα στοιχεία, φαίνεται ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, και οι δύο μορφές μεταβολισμού παρατηρούνται, τόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, όσο και στον ενήλικα, ενώ σημαντικό ρόλο για την παραπέρα αύξηση των γνώσεων μας αναμένεται να παίξει η μελέτη των ενζυμικών συστημάτων CYP26.

Στο κυτταρικό περιβάλλον το RA συνδέεται στις κυτταρικές πρωτεΐνες δέσμευσής του (cellular retinoic acid binding proteins CRABPs). Αν και όχι πλήρως διευκρινισμένος, ο ρόλος της CRABP II φαίνεται να είναι η μεταφορά του RA από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και της CRABP I ο μεταβολισμός του (18). Το CYP26A1, το οποίο καταλύει την οξείδωση του all-trans RA επάγεται από το RA σε αρκετούς ιστούς, αλλά κυρίως στο ήπαρ, και η δραστηριότητα του εξαρτάται άμεσα από τις ηπατικές εφεδρείες σε ρετινόλη, όπως φάνηκε σε κυτταρικές σειρές HepG2 αλλά και σε μελέτες ήπατος αρουραίων με επάρκεια ή έλλειψη βιταμίνης A, ενώ η δράση του εξαρτάται και από τους πυρηνικούς υποδοχείς (19). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι

το RA είναι και ο κύριος επαγωγέας του γονιδίου του CYP26, αλλά και το κύριο υπόστρωμα της πρωτεΐνης CYP26. Στο προωθητικό τμήμα του γονιδίου του CYP26 υπάρχει ένα σημείο πρόσδεσης-απάντησης στο RA (retinoic acid response element-RARE) μέσω του οποίου το RA ευνοεί την παραγωγή του ενζύμου που θα συμβάλλει στην οξειδωσή του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολικών υδρόξυ- ή κέτο- μεταβολιτών που είναι γενικά λιγότερο βιοδραστικοί από το RA (1). Φάρμακα που μεταβολίζονται στα προαναφερθέντα ενζυμικά συστήματα, όχι μόνο μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα των ρετινοειδών, αλλά ενδέχεται να προκαλέσουν παρόμοια κλινική εικόνα με την έλλειψη βιταμίνης Α. Τα επίπεδα του at-RA και του 13-cisRA βρέθηκαν χαμηλά, σε ασθενείς υπό αντιεπιληπτική αγωγή (φαινυτοΐνη, καρβαμαζεπίνη και βαλπροϊκό οξύ) και αυτή ίσως είναι μία εξήγηση για το μηχανισμό με τον οποίο προκαλούν τερατογένεση (20). Αν και το 9-cis-RA είναι δυνατόν να μεταβολισθεί από τα συστήματα CYP26A1 και B1, όπως το atRA, στην πράξη αυτό γίνεται σε μικρό βαθμό. Φαίνεται ότι υπάρχει ξεχωριστό ένζυμο, το CYP26C1 που παρουσιάζει ομοιότητες αλλά και διαφορές με τα άλλα δύο, μεταβολίζει κυρίως το 9-cis-RA, και είναι λιγότερο ευαίσθητο από τα άλλα μέλη της οικογένειας CYP26 στην ανασταλτική επίδραση της κετοκοναζόλης (21).

Όπως προαναφέρθηκε, τα αστεροειδή κύτταρα και τα ηπατοκύτταρα περιέχουν CRBP I καθώς και κυτταρικές πρωτεΐνες δέσμησης ρετινοϊκών οξέων (CRABP-I,II). Τα ρετινοϊκά οξέα συνδέονται σε συγκεκριμένους πυρηνικούς υποδοχείς (nuclear receptors) των ηπατοκυττάρων. Αυτοί χωρίζονται σε δύο οικογένειες: α) οι υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος (RAR) α, -β και -γ που θεωρούνται ομόλογοι με την υπεροικογένεια των υποδοχέων των στεροειδικών και θυροειδικών ορμονών και δείχνουν υψηλή συγγένεια με το ρετινοϊκό οξύ, κυρίως στην all-trans μορφή και β) οι Retinoid-X-receptors(RXR) α, -β και -γ ,απαντούν σε υψηλές συγκεντρώσεις all-trans ρετινοϊκού οξέος αλλά δείχνουν 40 φορές μεγαλύτερη συνάφεια στο 9-cis ρετινοϊκό οξύ. Οι RXR σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς τάξης II. Αυτοί είναι οι CAR (constitutive androstenedione receptor), FXR (farnesoid X receptor), LXR (liver X receptor), PPAR (peroxisomal proliferator receptor), PXR/SXR (pregnane X receptor/steroid and xenobiotic receptor), RAR, TR (thyroid hormone

receptor), VDR (vitamin D receptor), hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4α). Σημειώνεται ότι όλοι οι άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς τάξης II, αν δεν σχηματίσουν ετεροδιμερή με τον RXR δεν μπορούν να δράσουν. Αυτά τα ετεροδιμερή συνδέονται σε συγκεκριμένες περιοχές γονιδίων στόχων και ελέγχουν την έκφρασή τους. Οι περιοχές σύνδεσης (retinoic acid response element -RARE) ή (RX response elements-RXRE) βρίσκονται στο προωθητικό τμήμα του γονιδίου και λειτουργούν ως επαυξηντές ή καταστολείς (22,23). Οι φυσιολογικές διαδικασίες που ελέγχονται από τους υποδοχείς τάξης II είναι πολλές και διαφορετικές. Ο LXRα ενεργοποιείται από την οξυχοληστερόλη και προάγει το μεταβολισμό της χοληστερόλης. Ο FXR ενεργοποιείται από χολικά οξέα, που αναστέλλουν τον καταβολισμό της χοληστερόλης. Ο CARβ εμπλέκεται στην επαγωγή από την φαινοβαρβιτάλη του γονιδίου του κυτοχρώματος P450 2B10 (Cyp2B10), που κωδικοποιεί ένζυμο μεταβολισμού φαρμάκων και ξενοβιοτικών. Ο PXR ενεργοποιείται από ένα ευρύ φάσμα στεροειδών και επάγει το γονίδιο Cyp3A το οποίο κωδικοποιεί μία ευρέως φάσματος οξειδάση, που ευθύνεται για τον καταβολισμό στεροειδών και φαρμάκων. Ο PPARα ενεργοποιείται από το λευκοτριένιο B4 και από τις φιμπράτες και ελέγχει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των λιπιδίων. Το RA ελέγχει επίσης την ομαλή μιτοχονδριακή λειτουργία των ηπατοκυττάρων (24-27).

Η θέση στην οποία βρίσκονται τα αποθέματα της βιταμίνης A έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς το ήπαρ αποτελεί το όργανο μέσω του οποίου ουσίες προερχόμενες από την τροφή περνούν μέσω της πυλαίας στη συστηματική κυκλοφορία. Το μόριο της ρετινόλης είναι πλούσιο σε ομοιοπολικούς διπλούς δεσμούς, γεγονός που το καθιστά ικανό να εξουδετερώσει ελεύθερες ρίζες τοξικές για τα κύτταρα.

2. Ρετινοειδή πλάσματος

Στο πλάσμα η ρετινόλη κυκλοφορεί ελεύθερη ή συνδεδεμένη με την RBP4 και την τρανσθυρετίνη σε αναλογία 1:1:1 (Όλο-RBP), γεγονός που αυξάνει το μοριακό της βάρος και αποτρέπει την αποβολή της στα ούρα. Μετά την απόδοση της ρετινόλης στα κύτταρα στόχους, η απο-RBP διηθείται από τα νεφρικά σπειράματα και στη συνέχεια επαναρροφάται στα εγγύς σωληναριακά κύτταρα και καταβολίζεται. Τα επίπεδα της RBP4 αυξάνονται σε ασθενείς με παχυσαρκία και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, ενώ κάθε ηπατική ή νεφρική δυσλειτουργία επηρεάζει τα επίπεδά της, καθώς επιδρά στη σύνθεση και τον καταβολισμό της. Η RBP είναι αντίστροφη πρωτεΐνη οξείας φάσης και τα επίπεδα της μειώνονται σε οξείες καταστάσεις (28). Η ρετινόλη του πλάσματος κυκλοφορεί μεταξύ ήπατος και ιστών αρκετές φορές πριν υποστεί μη αναστρέψιμη αποδόμηση. Είναι πιθανό ότι τα προσλαμβανόμενα από το ήπαρ μόρια ρετινόλης είτε προέρχονται από εντερική απορρόφηση είτε από την προαναφερθείσα ανακύκλωση, εισέρχονται σε μια «δεξαμενή ελεύθερης ρετινόλης» που πιθανότατα σχετίζεται με τη CRBP, αλλά χρησιμοποιείται και ως δεξαμενή υποστρώματος για τη LRAT. Σε καταστάσεις, όπως η υποβιταμίνωση Α, όπου η διαθεσιμότητα του RA είναι χαμηλή και η LRAT υπολειτουργεί, όση ρετινόλη είναι διαθέσιμη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άλλες διαδικασίες όπως η οξειδωση και η έκκριση. Αντίστροφα, όταν η δραστηριότητα της LRAT αυξάνεται (όπως έχει παρατηρηθεί στη χορήγηση της βιταμίνης ως συμπληρώματος διατροφής και στη θεραπεία με RA), η εστεροποίηση της ρετινόλης που προκαλείται μπορεί να μειώσει τη διαθεσιμότητα της στο πλάσμα ως όλο-RBP. Έχει παρατηρηθεί ότι μετά τη χορήγηση RA σε επαρκείς σε βιταμίνη Α αρουραίους προκαλείται ταυτόχρονα αύξηση της έκφρασης της LRAT σε ήπαρ και πνεύμονες αλλά και μείωση της ρετινόλης ορού. Πιθανότατα, το RA αποτελεί σημάδι επάρκειας του οργανισμού σε βιταμίνη Α. Ως ισχυρή ορμόνη είναι ικανό να τροποποιεί την έκφραση γονιδίων που επηρεάζουν το μεταβολισμό και τις λειτουργίες του και μάλλον, εκτός από τη ρύθμιση της LRAT και του CYP26, η αυτορύθμιση της ομοιόστασης των ρετινοειδών από το RA περιλαμβάνει και άλλα βήματα

όπως ο έλεγχος της έκφρασης των υποδοχέων ρετινοειδών και των πρωτεϊνών σύνδεσης (1).

3. Βιολογική σημασία - δράσεις ρετινοειδών

Οι επιδράσεις των ρετινοειδών στον οργανισμό διαιρούνται σε άμεσες και έμμεσες, μέσω των πυρηνικών υποδοχέων. Οι εξωηπατικές βιολογικές δράσεις της βιταμίνης Α περιλαμβάνουν τη διατήρηση της όρασης, μέσω της μετατροπής της ρετινάλης σε ροδοψίνη που ενισχύει το δυναμικό της μεμβράνης των ραβδίων, μεταφέροντας σήματα φωτός στο οπτικό νεύρο. Είναι επίσης σημαντική στη γονιδιακή έκφραση και την κυτταρική διαφοροποίηση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου, στην κυτταρική ανοσία και στη σπερματογένεση, όπως και σε όλους τους ιστούς των οποίων τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται γρήγορα και ανανεώνονται συχνά. Η μειωμένη ηπατική σύνθεση RBP αποτελεί χαρακτηριστικό του υποσιτισμού και κύρια αιτία υποβιταμίνωσης Α στα παιδιά του αναπτυσσόμενου κόσμου. Η ανεπάρκεια βιταμίνης Α χαρακτηρίζεται από ξηροφθαλμία, δυσκολία προσαρμογής στο σκότος και νυκτερινή τύφλωση, παρατηρείται φυμαλιδώδες υπερκερατωτικό εξάνθημα των άκρων, κερατινοποίηση του αναπνευστικού και του ουρογεννητικού επιθηλίου και μειωμένη αντίσταση στις λοιμώξεις.

Από την άλλη πλευρά η κλινική εικόνα της υπερβιταμίνωσης Α, που είναι συνήθως ιατρογενής, περιλαμβάνει κεφαλαλγία, ευερεθιστότητα και εμέτους που οφείλονται σε ενδοκράνια υπέρταση, αποφολιδωτικό εξάνθημα και ξηρότητα δέρματος, κνησμό, αλωπεκία, στοματικές εξελκώσεις, κόπωση, ενώ σε βαριές περιπτώσεις παρατηρούνται σημεία ηπατικής ανεπάρκειας, όπως ηπατομεγαλία, παλαμιαίο ερύθημα, ασκίτης, αραχνοειδή αιμαγγειώματα, σπληνομεγαλία και πυλαία υπέρταση. Η ιστολογική εικόνα σε αυτές τις καταστάσεις περιλαμβάνει συνάθροιση περικολποειδικών λιποκυττάρων, ίνωση και συσσώρευση κολλαγόνου, απόφραξη των κολποειδών και των τελικών φλεβιδίων, σκλήρυνση των κεντρικών φλεβών, και ατροφία των παρακείμενων ηπατοκυττάρων, ενώ τα κύτταρα Ito είναι γεμάτα από λίπος (2),(29).

Σημαντικός για την παθοφυσιολογία των χρόνιων ηπατοπαθειών είναι ο ρόλος των ρετινοειδών στην ανοσορρύθμιση και το μεταβολισμό.

4. Ρετινοειδή και ανοσία

Το RA έχει μελετηθεί όσον αφορά τις δράσεις του στην ενεργοποίηση και τη λειτουργία των μονοπύρηνων/μακροφάγων και την ικανότητα τους να ξεκινούν ανοσιακές απαντήσεις ενάντια σε παθογόνα. Σε μελέτες κυτταρικών σειρών παρατηρήθηκε ότι το RA, με αδιευκρίνιστο μηχανισμό, εμποδίζει την παραγωγή κυτταροκινών όπως ο παράγων νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor -TNF), το οξείδιο του αζώτου, και η ιντερλευκίνη-12 (IL-12), που ευοδώνουν τη δημιουργία Τ-βοηθητικών κυττάρων τύπου 1 (Th1), ενώ αυξάνει την παραγωγή κυτταροκινών που ευνοούν τη γένεση Th2 κυττάρων επάγοντας έτσι την παραγωγή IL-10 και IL-4 (30-35).

Όσον αφορά τα Β κύτταρα, μελέτες σε ποντίκια με υποβιταμίνωση Α έδειξαν ότι, ενώ η παραγωγή της IgM μένει ανεπηρέαστη, η σύνθεση της IgG1 μειώνεται δραστικά, γεγονός που οφείλεται σε δυσλειτουργία των CD4+ Τ βοηθητικών κυττάρων, ενώ τα Β κύτταρα και τα μακροφάγα λειτουργούσαν φυσιολογικά (36). Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και μελέτες σε μονοπύρηννα από αίμα ομφάλιου λώρου καθώς και σε μονοπύρηννα περιφερικού αίματος ενηλίκων. Η προσθήκη RA προκάλεσε αύξηση της παραγωγής IgM και βοήθησε τη λειτουργία των Τ κυττάρων, αλλά και τα Β κύτταρα ώστε να παράγουν αντισώματα και IL-6 (37).

Πέρα από την προαναφερθείσα δράση της στα CD4+ Τ κύτταρα, η βιταμίνη Α επιδρά στην οντογένεση, τη λειτουργία και τη διαφοροποίηση των ώριμων Τ κυττάρων, καθώς φαίνεται πως μπορεί να συντεθεί ενδογενώς στο θύμο αδένα και να αποτρέψει την αρνητική επιλογή, ενώ υπάρχουν ενδείξεις πως στη διαδικασία συμμετέχουν και οι RAR/RXR πυρηνικοί υποδοχείς (38,39). Πέρα από την επίδραση του στην ισορροπία Th1/Th2, το RA έχει δείχθει ότι εμποδίζει την Th-17 Τ-διαφοροποίηση. Αυτή λαμβάνει χώρα με την παρουσία του TGF-β και προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-6, IL-1 και TNFα. Σημαντικό ρόλο παίζουν και οι πυρηνικοί υποδοχείς RORα και RORγt (orphan nuclear receptor). Το RA μειώνει την έκφρασή τους, καταστέλλοντας έτσι την Th-17 απόκριση (40,41).

Το RA ελέγχει τον αποικισμό και τη διαφοροποίηση των Τ- ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs), επάγοντας την έκφραση των κατάλληλων μορίων

προσκόλλησης, γεγονός που εξηγεί την δυσπραγία του ανοσοποιητικού σε καταστάσεις υποβιταμίνωσης, η οποία είναι γνωστή εδώ και δεκαετίες (42,43). Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι το RA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των λειτουργιών των αντιγονοπαρουσιαστικών δενδριτικών κυττάρων στο ανοσοποιητικό σύστημα του γαστρεντερικού, καθώς παράγεται από υποκατηγορίες τους και διευκολύνει την ενεργοποίηση των T- ρυθμιστικών κυττάρων από αυτά με αποτέλεσμα απόκριση τύπου Th1, Th2 ή Th17. Αυτά τα υποείδη των δενδριτικών κυττάρων εντοπίζονται κυρίως σε 3 σημεία: στο χόριο (lamina propria – LP), στις πλάκες του Peyer (Peyer's patches - PP) και στους μεσεντέριους λεμφαδένες (mesenteric lymph nodes - MLN). Ο αρχικός διαχωρισμός ήταν σε MLN και PP δενδριτικά κύτταρα τα οποία εξέφραζαν αφυδρογονάσες της ρετινάλης και παρήγαγαν RA. Οι λειτουργικές ικανότητες των υποκατηγοριών των LP δενδριτικών κυττάρων ερευνώνται. Η μετατροπή των T- κυττάρων σε ρυθμιστικά χρειάζεται το RA, καθώς εμποδίζεται από αναστολείς της αφυδρογονάσης της ρετινάλης και από αναστολέα του RAR, είναι όμως αναγκαία και η παρουσία του αυξητικού παράγοντα μετατροπής-β (Transforming Growth Factor-β TGF-β). Όμως φαίνεται ότι μετά από επίδραση του RA τα LP δενδριτικά κύτταρα μπορεί έχουν σαν αποτέλεσμα Th17 απόκριση. Τελικά, ποια απάντηση θα κατασταλεί και ποια θα ευοδωθεί μάλλον καθορίζεται από τη δόση του χορηγούμενου RA (44,45). Ωστόσο, τα δενδριτικά κύτταρα περιφερικών οργάνων όπως το ήπαρ ή ο πνεύμονας, δεν μειώνονται σε καταστάσεις υποβιταμίνωσης Α όπως συμβαίνει με αυτά του εντέρου, καθώς πιθανότατα δεν είναι ικανά να μετατρέψουν τη ρετινόλη σε RA (45). Εκτός από την ενεργοποίηση T- λεμφοκυττάρων, τα MLN και PP δενδριτικά κύτταρα προκαλούν παραγωγή αντισωμάτων IgA τάξης από B κύτταρα με μηχανισμούς εξαρτώμενους από το RA, ως απάντηση σε βακτηριακά πολυσακχαριδικά αντιγόνα, χωρίς τη βοήθεια T- κυττάρων (43). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα συνδυασμού άμεσης με έμμεση δράση των ρετινοειδών στο ανοσοποιητικό είναι οι PPARγ υποδοχείς. Πρόκειται για μεταγραφικούς παράγοντες που, όπως προαναφέρθηκε, ενεργοποιούνται από το RA και χαρακτηρίζονται από το ρόλο τους στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης (26). Η παρατήρηση ότι οι PPAR-γ αγωνιστές είναι ικανοί να επιδράσουν στο ανοσοποιητικό κυρίως κατασταλτικά οδήγησε στη χρήση τους σε πειραματικά μοντέλα αντιμετώπισης αυτοανόσων

παθήσεων (46-50). Έτσι φάνηκε ότι οι PPAR-γ υποδοχείς εμπλέκονται στην ανοσορρύθμιση και στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (Dendritic Cells-DC) την οποία φαίνεται πως εμποδίζουν. Ωστόσο ο PPARγ είναι σημαντικός παράγοντας διέγερσης των DC, ώστε αυτά να παράγουν RA και με το μηχανισμό που αναφέρθηκε παραπάνω, επηρεάζοντας τη συγκέντρωση του RA, μπορεί να τροποποιηθεί η ανοσιακή απάντηση (51,52).

Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killer T cells-NKT) αποτελούν διακριτή υποκατηγορία των T κυττάρων. Το RA, in vitro, επάγει τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίησή τους (53-55).

Είναι πλέον αποδεκτό πως η ισορροπία μεταξύ Th-17 και Tregs (ρυθμιστικών) κυττάρων είναι αναγκαία για την ομοιόσταση του ανοσοποιητικού. Τα Treg εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και διατηρούν την ανοσολογική ανοχή εκκρίνοντας IL-10 και TGF-β και η δράση τους θεωρείται αντιρροπιστική προς την Th-17 κατεύθυνση. Εφόσον το RA μειώνει την έκφραση των ROR (orphan nuclear receptor), καταστέλλοντας τη δημιουργία Th-17 κυττάρων, ευοδώνει τη δημιουργία των Tregs, αν και δεν είναι ο αποκλειστικός υπεύθυνος για την προαναφερθείσα ισορροπία (40,41,56).

5. Ρετινοειδή και μεταβολισμός

Οι πυρηνικοί υποδοχείς RXR παίζουν σημαντικούς ρόλους σε διάφορους ιστούς, καθώς σχηματίζουν ετεροδιμερή με άλλους υποδοχείς. Επιτρεπτικά (permissive) ονομάζονται τα ετεροδιμερή που ενεργοποιούνται αδιάκριτα από το μόριο πρόσδεσης (ligand), τόσο του RXR, όσο και του άλλου πυρηνικού υποδοχέα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι PPARs και οι LXRs που ενεργοποιούνται συνεργικά κατά την παρουσία και των δύο μορίων πρόσδεσης (57). Στα μη επιτρεπτικά ετεροδιμερή (TR, VDR) οι μεταγραφικές δραστηριότητες που επάγονται από το μόριο πρόσδεσης του RXR καταστέλλονται, καθιστώντας τον υποδοχέα έναν σιωπηλό εταίρο. Στα επιτρεπτικά ετεροδιμερή οι RXR αγωνιστές μπορούν να επιδείξουν τις φαρμακολογικές δραστηριότητες που αντικατοπτρίζουν την ενεργοποίησή τους (58).

Ο PPAR-α παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σχετιζόμενες με την κυτταρική πρόσληψη και β-οξειδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων αλλά και τη διακίνηση χοληστερόλης (59). Παράλληλα, έχει αντιφλεγμονώδη δράση (60,61). Ο PPAR-β/δ και αργότερα ο PPAR-γ παίζουν σημαντικό ρόλο στις εργασίες κυτταρικής διαφοροποίησης, συμβάλλοντας στην οργανογένεση που ρυθμίζεται από το RA, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και τους μεταβολίτες τους. Όχι μόνο ελέγχουν την ανάπτυξη των γονιμοποιημένων εμβρυονικών κυττάρων και την τροφοβλαστική διείσδυση, αλλά επηρεάζουν τα αρχικά στάδια πολυδύναμης διαφοροποίησης των αρχέγονων κυττάρων (stem cells) σε προδρομικά κύτταρα (π.χ. προαδικοκύτταρα) στον ώριμο οργανισμό (62,63). Ο PPAR-γ παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα μειώνοντας την έκφραση του TNF-α, ενώ αυξάνει την ευαισθησία των περιφερικών ιστών στην ινσουλίνη, βελτιώνοντας το μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθράκων (59,64-66).

Όσον αφορά την ευαισθησία/αντίσταση στην ινσουλίνη, ένα από τα συμπεράσματα της μελέτης DGAP (Diabetes Genome Anatomy Project), ήταν πως το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο που προκαλεί τον κορεσμό της ρετινόλης (Retinol Saturase-Retsat) εμπλέκεται ευρέως στους μηχανισμούς της ινσουλινοαντίστασης (67). Η Retsat, οξειδοαναγωγή που καταλύει την αντίδραση μετατροπής της ρετινόλης σε 13,14,διυδρορετινόλη, επάγεται κατά τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων (68) και ελέγχεται από ένα σημείο απάντησης στον PPAR-γ, (PPARγ response element -PPRE) στα λιποκύτταρα. Η καταστολή του εμποδίζει τη λιπογένεση, ενώ η έκτοπη έκφρασή του την αυξάνει (69). Η υποβιταμίνωση Α θεωρείται πως ευνοεί την εναπόθεση λίπους. Υπάρχουν επίσης μελέτες που δείχνουν πως οι RAR και RXR συμμετέχουν στη λιπογένεση, οι οποίες αν και δεν καταλήγουν σε σαφές συμπέρασμα για ευοδωτική ή κατασταλτική δράση, καταδεικνύουν πως υπάρχει συμβολή (70,71).

Η ρετινάλη (ρετιναλδεύδη), είχε αρχικά θεωρηθεί απλά ένα μεταβατικό μόριο κατά τη μη αναστρέψιμη οξείδωση από την αφυδρογονάση της ρετινάλης προς RA. Ωστόσο πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως είναι παρούσα στο λιπώδη ιστό και μπορεί να έχει δράσεις, ανεξάρτητα από τη μετατροπή της σε RA (72,73). Τα επίπεδα της σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με την

παχυσαρκία σε ποντίκια, ενώ αντίρροπη είναι και η αναλογία αφυδρογονάσης της ρετινάλης και αλκοολικής αφυδρογονάσης. Μελέτες σε ποντίκια με ανεπάρκεια της αφυδρογονάσης της ρετινάλης δείχνουν πως αυτά προστατεύονται από την παχυσαρκία και το διαβήτη, ενώ το εν λόγω ένζυμο φαίνεται πως εμποδίζει την ενεργοποίηση του RXR/PPAR-γ (74). Επίσης, το RA επάγει την έκφραση των RAR και PPAR-β/δ βοηθώντας τη λιπόλυση και μειώνοντας τις λιπαποθήκες (75,76).

Ο λευκός λιπώδης ιστός, αποτελεί σημαντικό εξωηπατικό αποθηκευτικό χώρο για τα ρετινοειδή, καθώς περιέχει το 15% των ιστικών ρετινοειδών στον ενήλικα αρουραίό (77). Τα λιποκύτταρα και το στρωματικό-αγγειακό κλάσμα του λίπους φαίνεται πως εκφράζουν κομβικούς μεσολαβητές του μεταβολισμού των ρετινοειδών, καταδεικνύοντας τη σημασία τους στη φυσιολογία του λιπώδους ιστού (78). Η RBP εκφράζεται κυρίως στα λιποκύτταρα και ασθενώς στα στρωματικά κύτταρα. Το αντίστροφο συμβαίνει με την CRBPI, αν και *in vitro* πειράματα δείχνουν πως το RA μπορεί να αυξήσει την έκφραση της στα λιποκύτταρα (77,79). Η έκφραση της CRBPIII μάλλον περιορίζεται στα στρωματικά κύτταρα (80). Η RBP, πέρα από την κινητοποίηση των ηπατικών ρετινοειδών και τη μεταφορά της ρετινόλης στην κυκλοφορία, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο και στο μεταβολικό σύνδρομο, καθώς τα επίπεδά της στον ορό είναι ανάλογα με την ευαισθησία στην ινσουλίνη (81-83) αλλά όχι σε όλες τις μελέτες (84-86). Επίσης, δεν είναι ξεκάθαρο αν σε αυτή τη δράση της RBP μεσολαβούν τα ρετινοειδή ή κάποιος άλλος μηχανισμός (87).

ΜΕΡΟΣ Β

ΗΠΑΡ ΚΑΙ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΗ

1. Παρεγχυματικά και μη παρεγχυματικά κύτταρα ήπατος

Τα κύτταρα του ήπατος χωρίζονται σε παρεγχυματικά και μη παρεγχυματικά. Στον ενήλικα, οι βασικές ανατομικές λειτουργικές ηπατικές μονάδες που ονομάζονται ηπατικά λόβια καταλαμβάνουν περίπου το 80% του ολικού όγκου του οργάνου. Αποτελούνται κυρίως από δοκίδες πάχους ενός κυττάρου, φτιαγμένες από πολυεδρικά ηπατοκύτταρα. Τα παρακείμενα κολποειδή επενδύονται από ενδοθηλιακά κύτταρα και καθλωμένα μακροφάγα τα οποία ονομάζονται κύτταρα Kupffer. Ο χώρος μεταξύ των ηπατοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων καλείται περικολποειδικός ή διάμεσος χώρος του Disse και περιέχει (ελάχιστες σε φυσιολογικές συνθήκες) ίνες κολλαγόνου και τα αστεροειδή κύτταρα (Hepatic stellate cells, HSCs) ή κύτταρα Ito.

Τα HSC έχουν διάμετρο 2-10μm και περιέχουν μικρό αστεροειδή πυρήνα, χωρίς πυρηνίσκο. Το κυτταρόπλασμα περιέχει λιποσταγονίδια με μεγάλη περιεκτικότητα σε εστέρες ρετινόλης (Βιταμίνης Α), αποτελώντας τον κύριο χώρο αποθήκευσής της στον ανθρώπινο οργανισμό. Ένα HSC συνήθως έρχεται σε επαφή με περισσότερα από δύο κολποειδή. Μετά από ηπατική προσβολή οποιασδήποτε αιτιολογίας (αιθανόλη, ιός, φλεγμονή) τα κύτταρα αυτά ενεργοποιούνται μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες, παράγοντας μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών εξωκυττάριας ουσίας, ξεκινώντας με αυτό τον τρόπο τη διαδικασία της κίρρωσης. Μικροσκοπικά παρατηρείται απώλεια της βιταμίνης Α και των λιποσταγονιδίων, μεγέθυνση του ενδοπλασματικού δικτύου και της συσκευής Golgi, φαινόμενα που υποδηλώνουν πρωτεϊνοσύνθεση (2),(4).

Η ενεργοποίηση των HSCs χωρίζεται σε τρεις φάσεις, τη μύηση, την προώθηση και τη λύση. Στην πρώτη παρατηρούνται πρώιμες αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και στο φαινότυπό τους που τα καθιστούν ικανά να απαντούν σε κυτταροκίνες και ερεθίσματα. Οφείλεται σε παρακρινική διέγερση

από μεταβολές στην περιβάλλουσα εξωκυττάρια ουσία, αλλά και στην έκθεση σε υπεροξειδία λιπιδίων και προϊόντα των τραυματισμένων ηπατοκυττάρων. Η προώθηση επέρχεται από τα αποτελέσματα αυτών των ερεθισμάτων, δηλαδή τη διατήρηση του ενεργοποιημένου φαινότυπου και τη δημιουργία της ίνωσης και συμπεριλαμβάνει παρακρινείς και αυτοκρινείς μηχανισμούς. Αποτελείται από διακριτές αποκρίσεις όπως η συσταλτικότητα, η ινωδογένεση, η απώλεια των ρετινοειδών και η διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων. Με τον όρο λύση της ίνωσης αναφερόμαστε στους μηχανισμούς που είτε οδηγούν τα HSCs σε απόπτωση είτε τα οδηγούν σε φαινότυπο ηρεμίας (88).

Αρχικά θεωρήθηκε πως η απώλεια της βιταμίνης κατά την ενεργοποίηση των HSCs συνοδεύεται από μείωση της έκφρασης των RAR. Αν και όντως παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων των mRNA, ανακαλύφθηκε πως υπάρχει μετα-μεταγραφική ρύθμιση προς τα άνω της έκφρασης του γονιδίου του RAR-α. Προτείνεται λοιπόν πως η έκφραση των RAR-α αποτελεί ένα δείκτη ενεργοποίησης των HSCs (89,90). Από τους RXR υποδοχείς, *in vivo* εκφράζονται ο -α, ο -β αλλά όχι ο -γ. Η δράση τους όσον αφορά την ίνωση δεν είναι σαφής (91).

Αντίθετα, περισσότερο ξεκάθαρες είναι οι έρευνες αναφορικά με τους PPAR υποδοχείς. Ο PPAR-γ, ο οποίος εκφράζεται στο λιπώδη ιστό όπου ρυθμίζει το μεταβολισμό των λιπιδίων και τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, εκφράζεται επίσης στα HSCs και η δραστηριότητα του μειώνεται κατά την ενεργοποίησή τους, γεγονός που φαίνεται πως αυξάνει τον πολλαπλασιασμό τους, με μηχανισμό στον οποίο συμμετέχουν και οι προσταγλανδίνες που τα HSCs εκκρίνουν. Αντίστοιχα, αγωνιστές των PPAR-γ υποδοχέων μειώνουν την ενεργοποίηση και των πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων HSCs, κάτι που τους καθιστά μόρια με πιθανές αντι-ινωτικές ιδιότητες (92-94). Το ίδιο φαίνεται πως ισχύει για τους αγωνιστές του PXR (Pregnane-X-receptor) (95,96). Επίσης, τα HSCs εκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων-β (estrogen receptor-β ER-β), και οι αγωνιστές τους 17β οιστραδιόλη θεωρούνται αντι-ινωτικά μόρια (97,98). Ο FXR αποτελεί μείζονα ρυθμιστή της ροής της χολής, καθώς διεγείρει την έκφραση αρκετών γονιδίων που αφορούν την παραγωγή της. Ωστόσο, εκφράζεται και στα HSCs όπου έχει αντι-ινωτικές ιδιότητες λόγω της υπερ-ρύθμισης του μορίου-στόχου του, SHP (99-101). Αντίθετα, ο PPAR-β διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των HSCs (102). Μιτογόνο για τα

ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα είναι και η 1,25 διυδροξύ-D3, καθώς αυτά εκφράζουν τον VDR (vitamin D receptor) (103,104).

2. Στοιχεία ανοσολογίας ήπατος

Το σύστημα φυσικής ανοσίας είναι υπεύθυνο για τη γρήγορη αρχική αντίδραση του οργανισμού σε δυνητικά επικίνδυνες καταστάσεις, όπως η ιστική βλάβη, τα παθογόνα και η κακοήθεια. Η αντίδραση αυτή είναι μη ειδική, χωρίς αναγνώριση ξένων αντιγόνων. Περιλαμβάνει τον φραγμό δέρματος – βλεννογόνων, χημικούς φραγμούς όπως η έκκριση οξέων και ενζύμων, χυμικούς παράγοντες, όπως το συμπλήρωμα και οι ιντερφερόνες, τα φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα, μακροφάγα) και τα λεμφοκύτταρα (φυσικοί φονείς -NK, T-NK). Τα κύτταρα του συστήματος φυσικής ανοσίας φέρουν υποδοχείς που αναγνωρίζουν τα παθογόνα βάσει συγκεκριμένων αντιγονικών προτύπων (pattern recognition receptors). Στους υποδοχείς αυτούς περιλαμβάνονται οι πεντραξίνες, οι πρωτεΐνες αναγνώρισης πεπτιδογλυκανών, οι τρανσφεράσες λιπιδίων, οι toll-like receptors (TLRs), οι NOD-like receptors (NLRs), οι RIG-like helicases κλπ. Στη συνέχεια ενεργοποιούνται οι υπόλοιποι μηχανισμοί της φυσικής, αλλά και της προσαρμοστικής ανοσίας. Το ήπαρ ευθύνεται για τη βιοσύνθεση του 80–90% των πρωτεϊνών που αφορούν στη φυσική ανοσιακή απάντηση, όπως το συμπλήρωμα, οι εκκρινόμενοι υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών μορφών, και οι πρωτεΐνες οξείας φάσης. Επίσης, περιέχει μεγάλο αριθμό κολποειδών, ενδοθηλιακών κυττάρων και κυττάρων Kupffer, υπεύθυνων για την κάθαρση διαλυτών μακρομορίων αλλά και αδιάλυτων τοξινών του οργανισμού. Τα κύτταρα Kupffer αποτελούν το 80–90% του ολικού πληθυσμού των καθηλωμένων μακροφάγων, ενώ μεγάλο ποσοστό των ηπατικών λεμφοκυττάρων είναι NK και NKT. Τα ηπατοκύτταρα εκφράζουν αρκετούς υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών μορφών στους οποίους περιλαμβάνονται οι TLRs. Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι η ηπατική φυσική ανοσία παίζει σημαντικό ρόλο, όχι μόνο στην άμυνα έναντι παθογόνων και μεταλλαγμένων κυττάρων, αλλά και στη διαχείριση του ηπατικού τραυματισμού, της επανόρθωσης και της ίνωσης (105). Επιγραμματικά, από τους χυμικούς παράγοντες, το C5 προάγει την ίνωση, ενώ τα C3, C4 και οι ιντερφερόνες

IFN- α/β και η IFN- γ την αναστέλλουν. Τα κύτταρα Kupffer συμβάλλουν στην ίνωση, καθώς ενεργοποιούνται και απελευθερώνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και ελεύθερες ρίζες (106). Οι TLRs επίσης εμπλέκονται στην παθογένεση της ίνωσης. Αποτελούν υποδοχείς που αναγνωρίζουν μοριακά πρότυπα που συσχετίζονται με παθογόνα (pathogen-associated molecular patterns -PAMPs) και ενεργοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες nuclear factor (NF)- κ B, activator protein 1 (AP-1), και interferon regulatory factors (IRFs), οδηγώντας στην έναρξη της φυσικής ανοσίας. Αν και τα κύτταρα Kupffer θεωρούνται τα κύρια μη παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος τα οποία απαντούν στα PAMPs υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι και τα ηπατοκύτταρα, που δεν ανήκουν στο ανοσοποιητικό, συμμετέχουν στην όλη διαδικασία (107).

Τα σήματα των TLR υποδοχέων προκαλούν την έκλυση προφλεγμονωδών και συνδιεγερτικών κυτταροκινών. Έτσι ενεργοποιούνται τμήματα του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, όπως ο σπλήνας και οι λεμφαδένες. Σημαντική σε αυτή την πρώιμη φάση είναι η απόκριση της (T helper -Th) απάντησης προς την κατεύθυνση Th1 ή Th2. Ενώ τα Th1 κύτταρα παράγουν IL-2 και IFN- γ ενεργοποιώντας μακροφάγα και κυτταροτοξικά CD8+ T κύτταρα, τα Th2 κύτταρα παράγουν IL-4, IL-5, IL-10 και IL-13, η έκκριση των οποίων οδηγεί στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των B κυττάρων σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Εκτός των άλλων, το είδος της ανοσολογικής απάντησης εξαρτάται και από τον ιστό όπου λαμβάνει χώρα η βλάβη ή η φλεγμονή, καθώς σε διαφορετικούς ιστούς έχουμε διαφορετικές απαντήσεις στο ίδιο ερέθισμα. Αυτό οφείλεται τόσο στην κατανομή των δένδριτικών κυττάρων, όσο και στα επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα στο χώρο της φλεγμονής που δημιουργούν σήματα σχετιζόμενα με τους TLR που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των T κυττάρων. Όμως η ανοσολογική απάντηση επηρεάζεται και από ιδιότητες του προσβάλλοντος οργανισμού όπως ομοιότητα με προηγούμενα απαντηθέντες λοιμώδεις παράγοντες, την οδό της λοίμωξης και τη συγκέντρωση και τη διάρκεια παρουσίας του (108). Τα τελευταία χρόνια αναθεωρήθηκε η πεποίθηση της Th1/Th2 κατεύθυνσης της ανοσολογικής απάντησης και συμπεριλήφθηκε μία τρίτη κατηγορία, η Th17. Με την επαγωγή χημειοκινών και τη βοήθεια πληθυσμών εκτελεστικών T-κυττάρων, η Th17 απόκριση

προωθείται ως απάντηση σε μία σειρά από συγκεκριμένα παθογόνα, που ενδεχομένως δεν μπορούν να χειριστούν οι Th1 και Th2 τύποι ανοσίας. Όμως, λόγω του προφίλ κυτταροκινών που χρησιμοποιείται και της συμμετοχής άλλων κυττάρων, τα Th17 κύτταρα είναι ισχυρά προφλεγμονώδη και μπορεί να προκαλέσουν αυτοανοσία. Αν και ο TGF- β και η IL-6 αποτελούν κρίσιμους παράγοντες για τη διαφοροποίηση (πρώτο βήμα) και η IL-23 είναι αναγκαία για τη διατήρηση των Th17 κυττάρων (δεύτερο βήμα), φαίνεται πως η IL-21, παίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της απάντησης και σταθεροποιεί τον φαινότυπο τους (τρίτο βήμα). Απώλεια οποιουδήποτε μέλους του μονοπατιού (IL-6, IL-21 ή IL-23) περιορίζει σημαντικά την Th17 απάντηση (109). Η ανοσοανοχή του ήπατος αποδίδεται στα χαρακτηριστικά των δενδριτικών κυττάρων που βρίσκονται εκεί (108). Ο ρόλος των T-ρυθμιστικών κυττάρων (CD4+CD25+ regulatory T cells -Tregs) στις ανοσολογικές απαντήσεις έχει ερευνηθεί εντατικά και τουλάχιστον δύο υποτύποι έχουν περιγραφεί: τα προερχόμενα από τον θύμο αδένες φυσικά (thymically derived natural Tregs -nTregs) και τα επαγόμενα (inducible Tregs -iTregs) T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα, που δημιουργούνται περιφερικά από εκτελεστικά κύτταρα (CD4+CD25- T effector cells -Teff). Τα Tregs έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αυτοανοσίας και στην ανοσολογική απόκριση (110).

3. Ήπαρ και ανοσολογική ανοχή

Το ήπαρ μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας εκτίθεται διαρκώς σε πληθώρα αντιγόνων, ενώ ως σημαντικό μεταβολικό όργανο, παράγει πολλά νέο-αντιγόνα. Έτσι το ενδεχόμενο ανοσοδιέγερσης, θεωρητικά, είναι συνέχεια αυξημένο. Στην πράξη όμως αυτό δεν συμβαίνει καθώς υπάρχουν μηχανισμοί ανοσολογικής ανοχής που συμβάλλουν στην αποφυγή της συνεχούς ενεργοποίησης του ανοσολογικού συστήματος. Το γεγονός αυτό έχει και αρνητικές προεκτάσεις, καθώς το ήπαρ αποτελεί συχνό σημείο μετάστασης όγκων, ενώ σε χρόνιες λοιμώξεις, όπως η σχιστοσωμίαση και οι ηπατίτιδες B και C, ο εισβολέας εκμεταλλεύεται την ανοσολογική ανοχή. Η τελευταία οφείλεται σε έκφραση αντιφλεγμονωδών διαβιβαστών και ανασταλτικών για την ενεργοποίηση των T κυττάρων μορίων επιφανείας. Μη παρεγχυματικά

κύτταρα που ευθύνονται για την ανοσολογική ανοχή, είναι τα μυελοειδή και πλασματοκυτταροειδή δένδριτικά κύτταρα, τα ηπατικά ενδοθηλιακά κολποειδικά κύτταρα, τα κύτταρα Kupffer και τα HSCs. Η παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-10 και ο TGF- β και η έκφραση του ανασταλτικού μορίου για την ενεργοποίηση των T κυττάρων PD-L1 (programmed cell death ligand-1) συμβάλλουν προς αυτή την κατεύθυνση, αν και η απάλειψη τους από διαγονιδιακά ποντίκια δεν προκαλεί πάντα ηπατική βλάβη (111). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα λόγω της θέσης τους και του μεγάλου τους αριθμού, θεωρούνται τα πιο αποτελεσματικά στην αντιγονοπαρουσίαση προς τα CD8 T-κύτταρα. Φυσιολογικά, ακόμη και σε συνθήκες φλεγμονής επάγουν την ανοχή. Φαίνεται, όμως πως σε ιογενείς λοιμώξεις προωθούν τη διαφοροποίηση των T-κυττάρων σε κυτταροτοξικά (112).

Η ισορροπία μεταξύ Tregs και Th-17 απόκρισης είναι ιδιαίτερα κρίσιμη για την ανοσολογική ανοχή, καθώς ρήξη της μπορεί να οδηγήσει σε φαινόμενα χρόνιας φλεγμονής και αυτοανοσίας. Όπως προαναφέρθηκε, σημαντικό ρόλο στην διέγερση της Th-17 απόκρισης παίζουν οι ROR α και ROR γ t (orphan nuclear receptor). Αυτοί καταστέλλονται από την προσθήκη RA, ενώ επάγονται από τη συνεργασία IL-6 και TGF- β . Την Th-17 απόκριση ευνοεί και η IL-21 με τη βοήθεια του TGF- β , ωστόσο ο τελευταίος με την παρουσία της IL-2 εκτρέπουν την ισορροπία προς την Treg κατεύθυνση, κάτι που μπορούν να κάνουν παράγοντες όπως η ερυθροποιητίνη και η ραπαμυκίνη (40,41,56).

4. Ανοσορρύθμιση και Αστεροειδή κύτταρα (HSCs)

Τα HSCs έχουν ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες που παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Προσελκύοντας πολυμορφοπύρρηνα και μονοπύρρηνα, ενισχύουν τη φλεγμονώδη αντίδραση. Τα ενεργοποιημένα HSCs παράγουν χημειοκίνες, και C4, ενώ η ικανότητα τους να εκφράζουν TLRs δείχνει πως αλληλεπιδρούν με βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες (88). Επίσης μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, οδηγώντας λεμφοκύτταρα σε πολλαπλασιασμό ή απόπτωση (113). Ωστόσο, επηρεάζονται και τα ίδια από ειδικούς λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς, όπως τα CD8 κύτταρα που αυξάνουν την ινοποιητική δραστηριότητα των HSC, σε αντίθεση με τα CD4. Αυτός ίσως να είναι και ένας λόγος που η ίνωση στους ασθενείς με

συλλοίμωξη HIV/HCV είναι αυξημένη σε σχέση με όσους έχουν μόνο λοίμωξη από HCV, καθώς στους πρώτους η αναλογία CD4/CD8 είναι μειωμένη (114). Άλλη μία ένδειξη του ρόλου των HSCs στην ανοσορρύθμιση είναι ότι εκφράζουν το συνδιεγερτικό μόριο B7-H1 (PDL-1 programmed death ligand-1) μόνο όταν είναι ενεργοποιημένα. Αυτό αφορά τα CD4 κύτταρα και σε χαμηλά επίπεδα αναστέλλει την ενεργοποίησή τους, ενώ μπορεί να προκαλέσει και απόπτωση (115). Τέλος, υπάρχουν μελέτες που προτείνουν πως τα HSCs βοηθούν στην ανοσολογική ανοχή και στην αποφυγή της απόρριψης σε πειραματικές μεταμοσχεύσεις (116,117).

5. Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (natural killer cells-NK)

Καθώς η προσοχή όλων είναι στραμμένη στη θεραπεία της ίνωσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο τρόπος λύσης της ενεργοποίησης των HSCs, ο οποίος, τουλάχιστον θεωρητικά, επιτυγχάνεται είτε μέσω απόπτωσης, είτε με αναστροφή τους σε ηρεμούντα φαινότυπο. Η αναστροφή, προς το παρόν, δεν έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει *in vivo*. Αντίθετα, οι περισσότεροι υποστηρίζουν πως η απόπτωση των ενεργοποιημένων HSCs είναι ένας τρόπος για να υποχωρήσει η ίνωση. Σύμφωνα με *in vitro* μελέτες, ικανά να τα εξωθήσουν σε απόπτωση είναι τα ηπατοκύτταρα, μέσω του NGF (Nerve Growth Factor) (118), και τα κύτταρα Kupfer μέσω των κασπασών (119), όμως πιο ενδιαφέρον φαίνεται ο ρόλος των NK κυττάρων, καθώς αρουραίοι με γενετικά επιβεβλημένη έλλειψη NK κυττάρων παρουσιάζουν εντονότερη ίνωση (120). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως τα NK κύτταρα παράγουν IFN- γ η οποία όχι μόνο επάγει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου των HSCs και την απευθείας απόπτωσή τους, αλλά διεγείρει την κυτταροτοξικότητα των NK εναντίον τους αυξάνοντας τον αριθμό των NK. Ένας άλλος τρόπος δράσης της στα NK, είναι η αύξηση της παραγωγής από αυτά του προαποπτωτικού για τα HSCs παράγοντα (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand -TRAIL). Οι μεταβολίτες της ρετινόλης παίζουν σημαντικό ρόλο στην ευαισθητοποίηση των NK ώστε να φονεύσουν τα ενεργοποιημένα HSCs, καθώς αυξάνουν την έκφραση του γονιδίου (retinoic acid-induced early gene

1 -RAE1) που αφενός καθιστά τα αστεροειδή κύτταρα ευάλωτα, αφετέρου διεγείρει τα NK (106,120,121).

6. Ρετινοειδή και φυσιολογικό ήπαρ

Στο ήπαρ συντελείται η πρόσληψη των ρετινοειδών από τις τροφές, η αποθήκευσή του, ενώ με βάση τις ανάγκες των υπόλοιπων ιστών, από αυτό αποδίδεται η απαραίτητη ρετινόλη μέσω της κυκλοφορίας στα όργανα στόχους. Τόσο τα παρεγχυματικά ηπατοκύτταρα, όσο και τα HSCs εμπλέκονται στο μεταβολισμό των ρετινοειδών. Τα πρώτα συνθέτουν την RBP και προσλαμβάνουν και επεξεργάζονται τα ρετινοειδή, τα δεύτερα αποτελούν το χώρο αποθήκευσης του 50-60% των ολικών ρετινοειδών. Τα RA συντίθενται στο ήπαρ και αλληλεπιδρούν με τους πυρηνικούς υποδοχείς που ελέγχουν την έκφραση πολλών γονιδίων που σχετίζονται με τις ηπατικές λειτουργίες. Επίσης, με τη δράση τους στα κύτταρα που βρίσκονται στο ήπαρ και ανήκουν στο ανοσολογικό σύστημα, συμβάλλουν στην εύρυθμη λειτουργία του και στη διατήρηση της ανοσολογικής ισορροπίας και ανοχής (56,122).

ΜΕΡΟΣ Γ

I. Χρόνιες ηπατικές νόσοι

Τα ρετινοειδή, αφού προσληφθούν και απομονωθούν από τις τροφές, αποθηκεύονται κυρίως στα ηπατοκύτταρα και τα HSCs με τη μορφή εστέρων ρετινόλης. Καθώς είναι ιδιαίτερα οξειδωτικά μόρια, η εστεροποίησή τους διατηρεί τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες του ήπατος στα επιθυμητά όρια, κρατά τη δομή τους σταθερή, και τα ρετινοειδή διαθέσιμα. Έτσι μπορούν να επιτελέσουν σημαντικές, άμεσες και έμμεσες με τη δράση τους στους πυρηνικούς υποδοχείς, λειτουργίες που αφορούν το μεταβολισμό και το ανοσολογικό σύστημα. Όμως, όταν το ήπαρ προσβληθεί από ιό, τοξικό παράγοντα (αιθανόλη, λίπος) ή όταν επέλθει ρήξη της ανοσολογικής ανοχής, προκαλείται ενεργοποίηση των HSCs και μετάβαση τους από τον ηρεμούντα στον ενεργοποιημένο φαινότυπο. Πλέον χαρακτηρίζονται από συσταλτικότητα, ινωδογένεση, απώλεια των ρετινοειδών και παραγωγή μορίων που προκαλούν διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων (88).

Επιβάλλεται εξ αρχής να τονιστεί πως δεν είναι κατανοητό ακόμη, αν η απώλεια των ρετινοειδών αποτελεί αιτία ή αποτέλεσμα των παθοφυσιολογικών διαδικασιών που οδηγούν στην κίρρωση. Υπάρχει η άποψη που υποστηρίζει πως το ήπαρ καθίσταται περισσότερο ευάλωτο στην ίνωση, αν τα αποθηκευμένα ρετινοειδή μειωθούν, καθώς αυτά παίζουν προστατευτικό ρόλο. Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν πως η ηπατική βλάβη προκαλεί δυσλειτουργία στο μεταβολισμό των ρετινοειδών, η οποία επιφέρει 'τοξική έκρηξη' μεταγραφικά ενεργών ρετινοειδών που συμβάλλουν στην αλλοιωμένη έκφραση γονιδίων (87,122).

Εικόνα (3). Αλληλεπίδραση αστεροειδών κυττάρων-ανοσοποιητικού-ρετινοειδών σε στάδιο πρώιμης ίνωσης (early fibrotic liver) και προχωρημένης ίνωσης (advanced fibrotic liver) (121).

Όσον αφορά τη δυσεξήγητη, και πολλές φορές διφορούμενη, αλληλεπίδραση αστεροειδών κυττάρων-ανοσοποιητικού-ρετινοειδών στις διαδικασίες που αφορούν την ίνωση, ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα απεικονίζεται στην εικόνα (3). Το RA επηρεάζει τις διαδικασίες με δύο τρόπους: (α) Επάγοντας την έκφραση του RAE1 από τα HSCs, που ενεργοποιεί τα NK μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα τους NKG2D. Τα ενεργοποιημένα NK, είτε φονεύουν απευθείας τα πρώιμα ενεργοποιημένα (early activated) HSCs, μέσω του TRAIL, είτε εκλύοντας INF-γ, αναστέλλουν των κυτταρικό κύκλο τους και τα εξωθούν σε απόπτωση μέσω του STAT1 (signal transducers and activators of transcription 1). (β) Τα ρετινοειδή μπορούν όμως και να εμποδίσουν την εξαρτώμενη από την IFN-γ ενεργοποίηση του STAT1, μέσω της επαγωγής του SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) ή να ενεργοποιήσουν τον TGF-β που εμποδίζει τη δραστηριότητα των NK, όταν τα HSCs ενεργοποιηθούν σε ενδιάμεσο χρόνο (intermediately activated). Επομένως, ο μεταβολισμός των ρετινοειδών κατά την ενεργοποίηση των HSCs μπορεί είτε να προωθήσει τη δράση των NK μέσω της επαγωγής του RAE1, είτε να την καταστείλει μέσω του TGF-β, της IFN-γ και του SOCS1 (121).

1 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

1α. Στοιχεία επιδημιολογίας και παθοφυσιολογίας

Η κατανάλωση μικρών ποσοτήτων οινοπνεύματος συσχετίζεται με μειωμένη πιθανότητα εμφράγματος του μυοκαρδίου. Ως ποσότητα που μπορεί να καταναλωθεί με ασφάλεια θεωρούνται τα 10gr (ένα ποτό) για τις γυναίκες, και 20 gr (δύο ποτά) για τους άνδρες (123). Ωστόσο η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων και για μεγάλο χρονικό διάστημα επιφέρει αλκοολική ηπατίτιδα στο 35% και κίρρωση στο 20% των ατόμων. Είναι επίσης σαφές ότι το ήπαρ των γυναικών είναι περισσότερο ευαίσθητο στην τοξική δράση του οινοπνεύματος. Η κατανάλωση από μία γυναίκα 20 gr οινοπνεύματος τη μέρα, ή 40gr από έναν άνδρα, για δέκα χρόνια αυξάνει σημαντικά τις πιθανότητες αλκοολικής ηπατοπάθειας. Η αναλογία ανδρών/γυναικών όσον αφορά τον αλκοολισμό, είναι 10/1, ενώ η αναλογία ασθενών με αλκοολική ηπατοπάθεια είναι 3/1. Στους άνδρες, η νόσος εμφανίζεται συνήθως στα 40-55 έτη, ενώ στις γυναίκες μία δεκαετία νωρίτερα (124).

Η ηπατική βλάβη που προκαλείται από χρόνια κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων οινοπνεύματος μπορεί να παρουσιαστεί σε 3 μορφές: (i) Λιπώδες Ήπαρ, (ii) Αλκοολική Ηπατίτιδα, (iii) Κίρρωση. Το Λιπώδες Ήπαρ είναι η αρχική και συχνότερη ιστολογική απάντηση στην κατάχρηση αλκοόλ. Αυτό αποδίδεται στο αποτέλεσμα των αυξημένων επιπέδων κυτταροπλασματικού και μιτοχονδριακού NADH, που εμποδίζουν την οξείδωση λιπαρών οξέων και διεγείρουν τη σύνθεσή τους που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή τριγλυκεριδίων και την προσπάθεια αποβολής τους από το ήπαρ με τη μορφή χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών. Η αδυναμία όμως της αποβολής όλων των συντιθέμενων τριγλυκεριδίων έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση του λίπους πρώτα στα περικεντρικά ηπατοκύτταρα και στη συνέχεια την εξάπλωση στο υπόλοιπο λόβιο. Αυτό συμβαίνει επειδή η, λόγω διαφορετικής αιμάτωσης, σχετική υποξία των περικεντρικών ηπατοκυττάρων επιδεινώνεται από τη χρόνια κατανάλωση οινοπνεύματος και έτσι η επίδραση στην οξειδοαναγωγική τους κατάσταση και στη συσσώρευση λίπους είναι μεγαλύτερη (125). Η αλκοολική ηπατίτιδα ιστοπαθολογικά χαρακτηρίζεται από

εξοίδηση των ηπατοκυττάρων, σπικτική νέκρωση, πολυμορφοπυρηνική διήθηση και ίνωση στον περικεντρικό χώρο και στον περικολποειδικό χώρο του Disse. Τα σωμάτια Mallory παρατηρούνται συχνά αλλά δεν είναι ειδικά ούτε παθογνωμονικά. Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά όπως γιγάντια μιτοχόνδρια, περιφλεβική ίνωση και κύστες λίπους μπορεί να συσχετιστούν με προχωρημένη ηπατική νόσο. Τα ιστολογικά ευρήματα που χαρακτηρίζουν την κίρρωση είναι (α) η ίνωση, (β) η ηπατοκυτταρική νέκρωση, (γ) η διαταραχή της αρχιτεκτονικής υφής που προκαλείται από την ανάπτυξη αναγεννητικών όζων. Παρά το γεγονός ότι τα αίτια της κίρρωσης είναι πολλά και ποικιλόμορφα, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην ιστολογική εικόνα. Η αλκοολική ηπατίτις είναι αναστρέψιμη, όπως και το λιπώδες ήπαρ, αν σταματήσει η χρήση οινοπνεύματος. Αν όμως αυτό δεν συμβεί, αποτελεί πρόδρομο στάδιο της κίρρωσης (4).

1β. Ρετινοειδή και αλκοολική νόσος του ήπατος

Σε καταστάσεις υποβιταμίνωσης Α, οι αποθηκευμένοι στα HSCs εστέρες ρετινόλης, υδρολύονται και η τελευταία μεταφέρεται στα ηπατοκύτταρα, συνδέεται με την RBP και αποδίδεται στην κυκλοφορία. Η υδρόλυση των ρετινυλικών εστέρων καταλύεται από την αντίστοιχη υδρολάση, (retinyl ester hydrolase -REH). Μελέτες σε αρουραίους δείχνουν πως η χρόνια χρήση αιθανόλης μειώνει τη δραστηριότητα της REH (126), γεγονός που δείχνει πως η υδρόλυση των εστέρων δεν οφείλεται σε απευθείας δράση της αιθανόλης στη REH. Επίσης, δεν υπάρχει καμία επίδραση στην LRAT (lecithin:retinol acyltransferase), άρα και στη σύνθεση των εστέρων (127). Επομένως η απώλεια των ρετινοειδών από τα HSCs μάλλον είναι αποτέλεσμα δράσης της αιθανόλης σε άλλο σημείο του μεταβολισμού τους (128).

Το RA συντίθεται από τη ρετινόλη σε δύο βήματα. Αρχικά οξειδώνεται σε ρετινάλη, αντίδραση που καταλύεται από τις αλκοολικές αφυδρογονάσες (ADH1-ADH4) και, σε συνθήκες υπερεπάρκειας ρετινόλης, από τις αφυδρογονάσες της ρετινόλης (RDH1 και RDH10). Στη συνέχεια, η ρετινάλη οξειδώνεται σε RA, αντίδραση που καταλύεται από τις αφυδρογονάσες της ρετινάλης (RALDH1- RALDH3), η δραστηριότητα των οποίων φαίνεται πως αυξάνεται από την αιθανόλη, σε μελέτες αρουραίων, γεγονός που μπορεί να

εξηγήσει τα χαμηλά επίπεδα ηπατικού RA που παρατηρήθηκαν στα ζώα αυτά (129). Ωστόσο, η εξήγηση αυτή δεν είναι επαρκής από μόνη της, καθώς τα επίπεδα του RA εξαρτώνται κυρίως από τον καταβολισμό του, μέσω των προαναφερθέντων κυτοχρωμάτων P450 και από την επάρκεια του υποστρώματος (130).

Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο καταβολισμός του RA καταλύεται από τα CYP2A1, 2B1 και 2C1. Σε χρόνια κατανάλωση αλκοόλ, τα μειωμένα επίπεδα RA στο ήπαρ έχουν συσχετισθεί με απορρύθμιση του καταβολισμού του. Υπάρχουν τρία στοιχεία που συνηγορούν γι' αυτό: (α) Τα μειωμένα επίπεδα ηπατικού RA σε τρωκτικά που τους χορηγούσαν αιθανόλη (129). (β) Άμεσες ενδείξεις υπερκαταβολισμού του RA (127,131). (γ) Αυξημένα επίπεδα πολικών μεταβολιτών του RA στο ήπαρ τρωκτικών που ελάμβαναν αιθανόλη (127,131,132). Επίσης υποστηρίζεται πως στο ήπαρ των αλκοολικών αρουραίων ενεργοποιείται ένα άλλο ενζυμικό σύστημα για τον καταβολισμό του RA, το CYP2E1, όπως προκύπτει από μελέτες με τον αναστολέα του, τη χλωρμεθειαζόλη. Η χρήση της φέρεται να ομαλοποιεί τόσο τα επίπεδα των ηπατικών RA, αλλά και της ρετινόλης και των εστέρων (127,131,132).

Εικόνα (4). Επίπεδα της ρετινόλης στην αλκοολική νόσο του ήπατος (133).

Στην εικόνα (4), απεικονίζεται η πτώση των επιπέδων της ρετινόλης και των εστέρων της σε ασθενείς με εμμένουσα (persistent) ηπατίτιδα, λιπώδες ήπαρ (fatty liver), αλκοολική ηπατίτιδα (alcoholic hepatitis) και (cirrhosis), σε σύγκριση με φυσιολογικούς ασθενείς (normal). Οι μετρήσεις έγιναν σε δείγματα αυτοψιών και βιοψιών, έχοντας αποκλειστεί διαιτητικοί παράγοντες (133).

Αξιόλογες μεταβολές συμβαίνουν και στα HSCs. Στην επιφάνεια των λιποσταγονιδίων στα οποία βρίσκεται αποθηκευμένη η βιταμίνη Α, εμφανίζεται η πρωτεΐνη περιλιπίνη και μάλιστα σε διάφορες μορφές εξαρτώμενες από τη βαρύτητα προσβολής (8). Ο μέσος αριθμός λιποσταγονιδίων ποικίλει ανάλογα με την φάση της αλκοολικής νόσου. Αρχικά υπάρχει μεγάλη άθροιση και μικρότερη στη συνέχεια, ενώ συνολικά τα ηπατικά ρετινοειδή μειώνονται όσο προχωράει η νόσος, σε άμεση συσχέτιση με τη μείωση στα HSCs (134) .

Κατά τη διάρκεια ηπατικής βλάβης τα HSCs ενεργοποιούνται και γίνονται ευάλωτα σε προσβολή από τα NK κύτταρα. Αυτό συμβαίνει, χάρη στην αυξημένη έκφραση του γονιδίου RAE-1 (retinoic acid early inducible gene 1). Η υπέρμετρη έκφραση ενεργοποιεί τα κύτταρα NK που φονεύουν τα HSCs. Η κατάσταση αυτή έχει μελετηθεί σε καλλιέργειες HSCs αρουραίου, όπου σε κατάσταση ηρεμίας το RAE-1 εκφραζόταν σε χαμηλά επίπεδα, η έκφραση αυξανόταν την 4^η και 7^η ημέρα (μερική ενεργοποίηση), ενώ την 21^η ημέρα (πλήρης ενεργοποίηση) το RAE-1 σταματούσε να εκφράζεται. Ανάλογο με την ένταση της έκφρασης ήταν και το ενδεχόμενο προσβολής από NK κύτταρα το οποίο εκμηδενιζόταν μετά από επώαση με αντίσωμα που εξουδετερώνει το RAE-1. Επίσης, παρόμοια πορεία ακολουθούσαν και τα επίπεδα του RA αλλά και του ενζύμου αφυδρογονάση της ρετινάλης (Raldh) τα οποία αυξήθηκαν στην πρώιμη ενεργοποίηση σε σχέση με τις τιμές ηρεμίας και τις τιμές πλήρους ενεργοποίησης. Η αναστολή της σύνθεσης RA με αναστολέα της Raldh ή παρεμπόδιση της δράσης του ως σήματος με χρήση ανταγωνιστή RAR σταμάτησε την αύξηση έκφρασης του RAE-1 ενώ η επώαση με RA την προκάλεσε. Επομένως, κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης τα HSCs χάνουν τη ρετινόλη η οποία είτε εκκρίνεται είτε αρχικά μετατρέπεται σε ρετινάλη με τη βοήθεια των ενζύμων αλκοολική αφυδρογονάση 1 και 3 (ADH) και στη συνέχεια οξειδώνεται σε RA με τη βοήθεια των ενζύμων Raldh 1 και 2. Αυτό επάγει την έκφραση του RAE-1 και καθιστά δυνατή την εξόντωση των μερικά ενεργοποιημένων HSCs από τα NK κύτταρα. Όταν όμως η ενεργοποίηση γίνει πλήρης, η έκφραση της RAE-1 σταματά, τα HSCs δεν μπορούν να φονευθούν από τα NK κύτταρα και επέρχεται η ίνωση (135). Επίσης, στο φυσιολογικό ήπαρ, τα βρισκόμενα σε ηρεμία HSCs εκφράζουν τη CRBP-1, ενώ οι πυλαίοι ινοβλάστες, όχι. Στο κίρρωτικό ήπαρ, τα ενεργοποιημένα HSCs εκφράζουν και την CRBP-1 αλλά και την α -SMA (smooth muscle actin), ενώ παρόμοια ανοσοϊστοχημική εικόνα παρουσιάζουν οι πυλαίοι και οι διαφραγματικοί ινοβλάστες. Το γεγονός αυτό καθιστά την CRBP-1 δείκτη ενεργοποίησης, καθώς η έκφραση της αυξάνεται ανάλογα με τη βαρύτητα της κίρρωσης. Τα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων πόρων εκφράζουν την CRBP-1 και στο υγιές ήπαρ, και στο κίρρωτικό, ενώ τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα Kupffer ποτέ (136). Οι κυτταροκίνες που παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στην ενεργοποίηση και τον

πολλαπλασιασμό των HSCs είναι ο TGF- β (transforming growth factor- β) και ο PDGF (platelet-derived growth factor). Πιστεύεται ότι ο TGF- β συμβάλλει στην μετατροπή των ήρεμων HSCs σε ινωδοποιούς μυοϊνοβλάστες, διεγείροντας τη σύνθεση πρωτεϊνών εξωκυττάριας ουσίας και εμποδίζοντας την αποδόμησή τους. Ο PDGF προωθεί τον πολλαπλασιασμό των HSCs και ενεργοποιεί πλήθος μορίων-σημάτων (phosphatidylinositol 3 (PI3) κινάση, Ras/Raf κινάση, MAP κινάση). Αντίθετα, οι ιντερφερόνες α -και γ - είναι σημαντικοί καταστολείς της ίνωσης διότι ενεργοποιούν τον μεταγωγέα σήματος STAT1, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα εναντίον ιών και νεοπλασμάτων αλλά και στην ηπατική φλεγμονή και αναγέννηση. Ο STAT1 εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των HSCs, καταστέλλει την έκφραση του PDGF και του TGF και διεγείρει την επίθεση των NK κυττάρων προς τα ενεργοποιημένα HSCs (137). Επίσης, η χρόνια κατανάλωση οινοπνεύματος έχει βρεθεί πως καταστέλλει τον άξονα NK/IFN- γ /STAT1 που προστατεύει από την εμφάνιση της κίρρωσης (138).

Αν δεν διακοπεί η κατανάλωση οινοπνεύματος, επέρχεται ηπατοκυτταρική βλάβη, όταν από το διαρκές οξειδωτικό stress εξαντληθούν όλα τα αντιοξειδωτικά αλλά και τα ενεργειακά αποθέματα των ηπατοκυττάρων (139). Αξίζει να σημειωθεί πως το οξειδωτικό stress και η ηπατική στεάτωση έχει δείχθει πως μειώνουν τον πληθυσμό των Tregs στο ήπαρ. Αντίστροφα, τα επίπεδα της IL-17 έχουν βρεθεί αυξημένα στον ορό αλκοολικών ασθενών, ενώ όσο αυξανόταν η ίνωση και η ηπατοκυτταρική βλάβη, τόσο μεγαλύτερη ήταν η συσσώρευση των Th-17 κυττάρων στο ήπαρ. Ωστόσο οι ερευνητές δεν ξεκαθαρίζουν αν η παρατηρηθείσα ρήξη στην ισορροπία Treg/Th17 συσχετίζεται με τα ρετινοειδή (140-142).

2. ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

2α. Στοιχεία επιδημιολογίας και παθοφυσιολογίας

Ο όρος μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) αναφέρεται σε ένα ευρύ φάσμα ηπατικής βλάβης που ξεκινά από την απλή στεάτωση και καταλήγει στη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), την προχωρημένη ίνωση και την κίρρωση. Η NAFLD παρουσιάζει ισχυρή συσχέτιση με την αντίσταση στην ινσουλίνη και ορίζεται από τη συσσώρευση στο ήπαρ του ασθενούς λίπους σε ποσοστό άνω του 5% του βάρους του οργάνου, με τον όρο ότι ο εξεταζόμενος καταναλώνει λιγότερα από 10 γραμμάρια αιθανόλης καθημερινά και έχει αρνητικούς δείκτες για ιογενείς ηπατίτιδες. Τα αίτια της NASH είναι η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπερτριγλυκεριδαιμία, φάρμακα, το σύνδρομο Cushing, η υποβηταλιποπρωτεϊναιμία, η ολική παρεντερική διατροφή και η νησιδοειδική παράκαμψη. Η ηπατική στεάτωση παρατηρείται σχεδόν σε όλους τους διαβητικούς και αποτελεί χαρακτηριστικό του μεταβολικού συνδρόμου που περιλαμβάνει παχυσαρκία, αντίσταση στην ινσουλίνη, υπερτριγλυκεριδαιμία και υπέρταση (143).

Αναφορικά με την παθοφυσιολογία της νόσου, στη βιβλιογραφία κυριαρχεί η θεωρία των «2 χτυπημάτων», σύμφωνα με την οποία αρχικά παρατηρείται παθολογική συσσώρευση λίπους στο ήπαρ και στη συνέχεια έχουμε τη μετάπτωση σε κατάσταση στεατοηπατίτιδας και ίνωσης, οφειλόμενη ενδεχομένως σε οξείδωση λιπιδίων και οξειδωτικό stress (144).

Η έκθεση του ήπατος σε ενδοτοξίνη μπορεί να εμπλέκεται στη διαδικασία. Συνήθως παρατηρείται σε περιπτώσεις υπερανάπτυξης βακτηριδίων στο λεπτό έντερο (ολική παρεντερική διατροφή και νησιδοειδική παράκαμψη), όπου ποσότητα της παραγόμενης από τα gram(-) βακτήρια ενδοτοξίνης διέρχεται στην πυλαία κυκλοφορία. Η ενδοτοξίνη ενδέχεται να διεγείρει τα κύτταρα Kupffer, ξεκινώντας έτσι τη διαδικασία της φλεγμονής. Προφανώς όμως αυτή δεν είναι η μοναδική αιτία καθώς τα επίπεδα ενδοτοξίνης των ασθενών με NAFLD, δεν είναι αυξημένα σε σχέση με τους υγιείς (145). Μία άλλη παράμετρος που θα εξηγούσε τη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ είναι η

απελευθέρωση μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων από το σπλαχνικό λίπος στην πυλαία φλέβα. Το σπλαχνικό λίπος επιδεικνύει υψηλό βαθμό λιπόλυσης, σε σύγκριση με το υποδόριο. Ωστόσο, η λιπόλυση αυτή δεν μπορεί να είναι συνεχής, διότι αν δεν αναπληρωνόταν το σπλαχνικό λίπος κάποια στιγμή θα εξαφανιζόταν, και αυτό δεν συμβαίνει. Ενδεχομένως το υποδόριο κοιλιακό λίπος παίζει κάποιο ρόλο (146). Είναι όμως γεγονός ότι από το σπλαχνικό λίπος εκκρίνονται αδιποκίνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου. Στις αδιποκίνες περιλαμβάνονται η λεπτίνη, η ρεσιστίνη, η ιντερλευκίνη 6, ο TNFα, η RBP4 και η αδιπονεκτίνη. Πρόκειται για πολυπεπίδια, από τα οποία ορισμένα εκφράζονται μόνο από λιποκύτταρα, ενώ στην έκφραση άλλων παίζουν ρόλο διηθητικά ή ιστικά μακροφάγα όπως τα κύτταρα Kupffer. Η μειωμένη απάντηση των λιποκυττάρων στην ινσουλίνη επιφέρει: (α) Αυξημένη κινητοποίηση λιπαρών οξέων από τον λιπώδη ιστό. (β) Μειωμένη χρήση ή οξειδωση τους από τα ηπατοκύτταρα αλλά και αύξηση της σύνθεσης τους. (γ) Εστεροποίηση τους σε τριγλυκερίδια και μείωση της αποβολής τους. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν, ελέγχοντας την όλη διαδικασία, οι πυρηνικοί υποδοχείς PPAR-γ, CAR, LXR και SHP, καθώς ποντίκια τα οποία «γεννήθηκαν» με ανεπάρκεια των υποδοχέων αυτών (knockout) παρουσίαζαν διάφορες μορφές ηπατικής στεάτωσης (26,147,148).

2.β. Ρετινοειδή και Αδιποκίνες-Μεταβολισμός Λιπιδίων.

Τα χαμηλά επίπεδα λεπτίνης στον ορό υπέρβαρων ασθενών μπορεί να συμβάλλουν στην ηπατική στεάτωση προωθώντας την αντίσταση στην ινσουλίνη. Ποντίκια με γενετική ανεπάρκεια λεπτίνης (ob/ob) παρουσιάζουν αντίσταση στην ινσουλίνη, υπερλιπιδαιμία και λιπώδες ήπαρ. Ο έλεγχος της λιπογένεσης πραγματοποιείται από τον μεταγραφικό παράγοντα SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c) και το 9-cis RA με δράση στα γονίδια FAS (Fatty Acid Synthase) και ACC (Acetyl CoA Carboxylate). Η γλυκόλυση και η λιπογένεση ελέγχονται από την ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Protein), σε βαθμό που η ηπατική στεάτωση και η ινσουλινοαντίσταση των ποντικών ob/ob βελτιώνεται με την αναστολή της ChREBP. Αντίθετα, το RA διεγείρει την παραγωγή της ChREBP. Και οι δύο παραπάνω παράγοντες ελέγχονται από τον LXR (149-151).

Υπάρχει συσχέτιση και μεταξύ των επιπέδων των λιπιδίων του πλάσματος και της ρετινόλης (152). Η βιταμίνη Α, στα ηπατοκύτταρα αρουραίου και ενδεχομένως στα ανθρώπινα, ρυθμίζει την παραγωγή mRNA του γονιδίου της Δ5desaturase. Το ένζυμο αυτό, καταλύει τον Δ5,6 αποκορεσμό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με μακρές αλυσούς που στη συνέχεια μετατρέπονται σε αραχιδονικό οξύ, και άλλα φωσφολιπίδια, γλυκερίδια και εστέρες χοληστερόλης, τα οποία εκκρίνονται από το ήπαρ και αποτελούν το κλάσμα VLDL των λιποπρωτεϊνών του ορού (153).

Η αδιπνεκτίνη έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες στο ήπαρ και χαμηλά επίπεδα αυτής μπορεί να αυξήσουν την ηπατοκυτταρική νέκρωση και την πρόοδο της νόσου. Στη NAFLD χαμηλά επίπεδα συνυπάρχουν με αυξημένη συσσώρευση λίπους και πιο έντονη νεκροφλεγμονώδη αντίδραση (154). Ένα τμήμα αυτής της δράσης αποδίδεται στην καταστολή της έκφρασης του SREBP-1c από αυτήν (155). Άλλες δράσεις που αποδίδονται στην αδιπνεκτίνη είναι η καταστολή της σύνθεσης και απελευθέρωσης του TNFα και η αύξηση της δράσης του PPAR-α και της καταλάσης που εμποδίζει τη συνάθροιση ελευθέρων ριζών που προκαλείται από το σήμα του TGF-β (156,157). Σημαντικοί για τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και το μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθράκων είναι και οι PPAR-β/δ αλλά και ο PPAR-γ ο οποίος μειώνει την έκφραση του TNF-α και αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη (62-66). Η οξείδωση της ρετινόλης που σχετίζεται με τον PPAR-γ, αλλά και της Ρετινάλης φαίνεται πως ευνοούν τη λιπογένεση, ενώ το RA προάγει τη λιπόλυση επάγοντας την έκφραση των PPAR-β/δ και RAR (69,72-75).

Άλλη μία σημαντική αδιποκίνη είναι η RBP4. Αυτή εκκρίνεται κυρίως από το ήπαρ και το σπλαχνικό λίπος, αυξάνεται σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης και στη φλεγμονώδη αντίδραση που χαρακτηρίζει την παχυσαρκία αλλά και σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό των παραπάνω καταστάσεων και συσχετίζεται με τους παράγοντες κινδύνου που συνοδεύουν το μεταβολικό σύνδρομο (158). Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι τα επίπεδα της RBP σε παιδιατρικούς ασθενείς με NASH μειώνονται αντιστρόφως ανάλογα με τη βαρύτητα της νόσου. Αντίθετα, η ιστολογική βαρύτητα της νόσου δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα στον ορό της μαλον-διαλδεϋδης, της α -τοκοφερόλης και της ίδιας της ρετινόλης (159).

2γ. Οξειδωτικό stress, ανοσολογική απάντηση και ρετινοειδή.

Η όλη διαδικασία συσσώρευσης λίπους φαίνεται να αφορά τους υποδοχείς TLR4 (Toll-like receptors) των κυττάρων Kupffer, η διέγερση των οποίων παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των παθοφυσιολογικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στη NAFLD. Πειράματα με αρουραίους που παρουσιάζουν ανεπάρκεια των TLR4 δείχνουν ότι αυτοί δεν ανέπτυξαν NAFLD, παρά το γεγονός ότι η δίαιτα που τους χορηγούσαν προκαλούσε τη νόσο, ενώ στη συγκεκριμένη μελέτη, η καταστροφή των κυττάρων Kupffer με λιποσωμάτια κλονδρονάτης, βελτίωσε την ιστολογική εικόνα, καταδεικνύοντας τον ρόλο τους στην παθοφυσιολογία της νόσου (160). Στα κύτταρα Kupffer έχει παρατηρηθεί έκφραση των υποδοχέων RAR σε επίπεδα παρόμοια με αυτά των HSCs, ενώ τα επίπεδα mRNA των RXR-α και -β είναι σχεδόν δεκαπλάσια (162). Η στεάτωση και η διαταραγμένη ομοιόσταση των λιπιδίων μπορεί να εμποδίζει την κολποειδική μικροκυκλοφορία και την κάθαρση του ηπατοκυττάρου από σήματα κινδύνου αυξάνοντας την απαντητικότητα των κυττάρων Kupffer, επηρεάζοντας δυσμενώς τον υποδοχέα TLR4, κάτι που μπορεί να συμβεί και με την παραγωγή ελευθέρων ριζών και αδιποκινών (162). Τα ηπατικά κύτταρα NK τροποποιούν την ηπατική βλάβη εξισορροπώντας την τοπική παραγωγή προφλεγμονωδών (Th-1) και αντιφλεγμονωδών (Th-2) κυτταροκινών. Η έλλειψή τους οδηγεί την παραγωγή προς την Th-1 απόκριση αυξάνοντας τον TNF που ενισχύει την ηπατοτοξικότητα που προκαλείται από τους λιποπολυσακχαρίτες. Τα ηπατικά NK κύτταρα ελέγχονται από κυτταροκίνες που παράγονται από τα κύτταρα Kupffer, από διαιτητικούς παράγοντες και από νευροδιαβιβαστές όπως η επινεφρίνη. Σε αρουραίους ob/ob, ανεπαρκής νορεπινεφρίνη αυξάνει την απόπτωση των NKT, γεγονός που οδηγεί σε παραγωγή προφλεγμονωδών (Th1) κυτταροκινών, χρόνια φλεγμονή, αυξημένη ηπατοτοξικότητα από λιποπολυσακχαρίτες και ισουλινιοαντίσταση (162).

Η απελευθέρωση ελευθέρων ριζών με την αύξηση του οξειδωτικού stress και η ενεργοποίηση προφλεγμονωδών κυτταροκινών προκαλούν ηπατοκυτταρική βλάβη, ενεργοποιούν τα HSCs τα οποία μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες και ξεκινά η ίνωση και σε βαρύτερες καταστάσεις η κίρρωση.

Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά της NASH είναι παρόμοια με αυτά της αλκοολικής. Για την ιστολογική διαβάθμιση της νόσου αξιολογείται η νεκροφλεγμονώδης ενεργότητα η οποία μπορεί να είναι ήπια, μέτρια ή σοβαρή. Σημαντικό ρόλο παίζει η παρουσία μακροαγγειακής στεάτωσης και σε ποιο ποσοστό (Πρώτου βαθμού: έως 33%, Δεύτερου βαθμού: μεταξύ 33% και 66% ενώ σοβαρότερες περιπτώσεις κατατάσσονται στον Τρίτο βαθμό). Η ιστολογική σταδιοποίηση γίνεται ανάλογα με το βαθμό ίνωσης (Στάδιο 1: περικολποειδική–περικυτταρική ίνωση της ζώνης 3, εστιακή ή διάχυτη. Στάδιο 2: εστιακή ή διάχυτη περιπυλαία ίνωση, μαζί με τα προηγούμενα ευρήματα. Στάδιο 3: εστιακή ή διάχυτη γεφυροποιός νέκρωση, μαζί με τα προηγούμενα, Στάδιο 4: Κίρρωση) (163).

3. ΧΡΟΝΙΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΕΣ

3.1. ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β

3.1α Στοιχεία επιδημιολογίας και παθοφυσιολογίας

Ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV) μπορεί να προκαλέσει οξεία ή χρόνια λοίμωξη. Η χρόνια λοίμωξη συσχετίζεται στενά με την κίρρωση και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Περισσότερα από 2 δισεκατομμύρια άνθρωποι υπολογίζεται πως έχουν έρθει σε επαφή με τον ιό, ενώ σε 350 εκατομμύρια ανέρχονται όσοι έχουν χρόνια λοίμωξη ή φορεία. Μεταδίδεται περιγεννητικά, μετά από επαφή με το αίμα μολυσμένου ατόμου και με τη σεξουαλική επαφή. Είναι μέλος της οικογένειας *Hepadnaviridae* με χαρακτηριστικά, παρόμοια με αυτά των ρετροϊών. Αποτελείται από εξωτερικό περίβλημα με 2 κάψες και ινώδες υλικό επικάλυψης το οποίο φέρει το επιφανειακό αντιγόνο του ιού (HBsAg), και από πυρηνοκαψίδιο που περιέχει τα αντιγόνα HBcAg και HBeAg. Το γονιδίωμα του ιού (HBV DNA) είναι κυκλικό, μερικώς μονήρους έλικας μεγέθους 3, 2 kb, αντιγράφεται σε RNA ενδιάμεσο και ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή. Στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κύκλου αντιγραφής του HBV αποδίδεται η ικανότητα του να παραμένει στα μολυσμένα κύτταρα (164,165). Η έκβαση της λοίμωξης εξαρτάται άμεσα από την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή, καθώς η κατάλληλη ανοσολογική απάντηση μπορεί να οδηγήσει σε κάθαρση του ιού, υπερβολική αντίδραση είναι δυνατό να προκαλέσει ηπατική ανεπάρκεια, ενώ μειωμένη απάντηση του ανοσοποιητικού οδηγεί σε χρόνια λοίμωξη.

Η χρόνια HBV λοίμωξη αποτελεί δυναμική διαδικασία με φάσεις υψηλής, χαμηλής ή ανύπαρκτης μεταγραφικής δραστηριότητας που καθορίζεται από την αλληλεπίδραση ιού-ξενιστή. Χαρακτηρίζεται από διάχυτη φλεγμονώδη αντίδραση και χαρακτηρίζεται από κυτταρική βλάβη και κυτταρικό θάνατο ο οποίος συσχετίζεται και με αυξημένη αντιγραφική δραστηριότητα του ιού. Η κυτταρική βλάβη θεωρείται αποτέλεσμα της ανοσολογικής απάντησης των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων στην εισβολή του ιού, ο οποίος δεν θεωρείται κυτταροτοξικός, ενώ κυτταρικός θάνατος μπορεί να προκαλείται και από προαποπτωτικές πρωτεΐνες του ιού όπως οι HBx και HBsP (166,167).

Παλαιότερα, υπήρχε η πεποίθηση ότι ο ιός καθαιρόταν πλήρως σε όσους ανένηπταν από οξεία λοίμωξη. Ωστόσο, με νέες, περισσότερο ευαίσθητες τεχνικές ανίχνευσης HBV DNA, ίχνη του ιού βρέθηκαν στο ήπαρ ή στον ορό ασθενών ακόμη και 10 χρόνια μετά την κλινική αποδρομή της λοίμωξης, παρά την εξαφάνιση των ιικών αντιγόνων και την παρουσία αντισωμάτων και ειδικών κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων. Η κατάσταση αυτή ορίζεται ως λανθάνουσα λοίμωξη (occult infection). Αυτές οι παρατηρήσεις εξηγούν και το φαινόμενο της αναζωπύρωσης μετά από ανοσοκαταστολή – χημειοθεραπεία ακόμη και σε άτομα με ορολογικούς δείκτες αποδρομής (168-170).

ΦΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ HBV ΛΟΙΜΩΞΗΣ

Ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη, μπορεί να παρουσιάσουν: σε κατάσταση ανοσολογικής ανοχής, ως χρόνια λοίμωξη με HBeAg-θετικό ή αρνητικό, ως ανενεργοί HBsAg φορείς.

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΟΧΗΣ

Η μετάπτωση της HBV λοίμωξης σε χρονιότητα παρουσιάζει μία αρχική φάση ανοσολογικής ανοχής που χαρακτηρίζεται από την παρουσία HBeAg, υψηλά επίπεδα HBV DNA που οφείλονται σε υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού του ιού, αλλά φυσιολογικές τρανσαμινάσες και σχεδόν φυσιολογική εικόνα βιοψίας λόγω της απουσίας ανοσολογικής απόκρισης από τον ξενιστή. Συνήθως πρόκειται για άτομα που μολύνθηκαν περιγεννητικά ή σε νεαρή ηλικία αλλά παρατηρείται για μικρό χρονικό διάστημα και σε αυτούς που αργότερα θα αναπτύξουν χρόνια λοίμωξη (171).

HBeAg ΘΕΤΙΚΗ ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΣ Β

Όσο το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή ωριμάζει και αρχίζει να αναγνωρίζει επιτόπους σχετιζόμενους με τον HBV στα ηπατοκύτταρα, ξεκινά η ηπατική βλάβη που οφείλεται στην ανοσολογική απάντηση. Αν και ο ιικός πολλαπλασιασμός συνεχίζεται στο ήπαρ και η ιαιμία είναι συνεχής, τα επίπεδα του HBV DNA είναι χαμηλότερα από τη φάση ανοσολογικής ανοχής, επειδή η αναπαραγωγή του ιού δεν είναι πλέον ανεμπόδιστη. Οι περισσότεροι

ασθενείς με HBeAg θετική χρόνια ηπατίτιδα Β παραμένουν ασυμπτωματικοί, καθιστώντας δύσκολη τη βασισμένη σε κλινικά κριτήρια διάγνωση της εισόδου στη φάση αυτή. Ωστόσο, κάποιοι εκδηλώνουν συμπτωματική αναζωπύρωση που υποδύεται οξεία ηπατίτιδα ή κεραυνοβόλο ηπατική ανεπάρκεια. Μία τέτοια αναζωπύρωση μπορεί να προαναγγέλλει την εξαφάνιση του HBeAg και την ανάπτυξη αντισωμάτων εναντίον του. Άλλες φορές όμως, το αποτέλεσμα μπορεί να είναι μόνο παροδική μείωση των επιπέδων του HBV DNA στον ορό, χωρίς την κάθαρση HBeAg, ενώ περιστασιακά μπορεί να συμβεί ηπατική ρήξη της αντιρρόπησης. Η αυτόματη ορομετατροπή του HBeAg συμβαίνει στο 10% -20% των ασθενών κατ' έτος και αποτελεί σημαντικό σημείο στη φυσική ιστορία της νόσου. Παράγοντες που προδικάζουν αυξημένη πιθανότητα ορομετατροπής είναι η μεγαλύτερη ηλικία, ο γονότυπος του ιού και τα αυξημένα επίπεδα τρανσαμινασών τα οποία υποδηλώνουν ισχυρή ανοσολογική αντίδραση που επιφέρει ευκολότερα την ορομετατροπή με ή χωρίς θεραπεία. Αντίθετα, αυτόματη κάθαρση του HBeAg ή ορομετατροπή επέρχεται μόνο στο 5% των ασθενών με ελάχιστη αυξημένη ή φυσιολογική ALT. Ο γονότυπος Β σε σχέση με τον C θεωρείται ευκολότερος στην αντιμετώπιση από το ανοσολογικό σύστημα (172). Πολλοί ασθενείς υφίστανται ορομετατροπή με την πάροδο του χρόνου. Όσοι παραμένουν HBeAg θετικοί όμως, συνεχίζουν να αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου για κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και το 12%- 20% αυτών θα αναπτύξουν σοβαρή ηπατική βλάβη που θα οδηγήσει σε κίρρωση και επιπλοκές την επόμενη πενταετία, γεγονός που εξαρτάται από τη διάρκεια της χρόνιας ηπατίτιδας και τη συχνότητα και τη σοβαρότητα των αναζωπυρώσεων (173).

ΑΝΕΝΕΡΓΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β

Μετά την ορομετατροπή οι περισσότεροι ασθενείς παραμένουν αρνητικοί στο HBeAg και θετικοί στο anti-HBe. Κλινικά, παρατηρείται σταθεροποίηση στην ηπατίτιδα με ομαλοποίηση των επιπέδων της ALT και μείωση του HBV DNA σε επίπεδα χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο, κατάσταση που περιγράφεται ως ανενεργός φορέας. Ιστολογικά μπορεί να παρατηρηθεί ελάχιστη ή ήπια ενεργότητα, αλλά το επίπεδο ίνωσης

μπορεί να διαφέρει, ανάλογα με τη σοβαρότητα της βλάβης πριν την ορομετατροπή (174). Συνήθως αυτή η κατάσταση παραμένει για χρόνια ή επ' αόριστο. Η πρόγνωση είναι καλή αν ο ασθενής εισέλθει στη φάση αυτή νωρίς κατά την πορεία της νόσου. Υπάρχουν και ασθενείς στους οποίους παρατηρείται αναστροφή της ορομετατροπής. Σε μία μελέτη, ατόμων που υπέστησαν ορομετατροπή το 80% παρέμειναν HBeAg αρνητικοί και anti-HBe θετικοί ενώ στους υπόλοιπους (20%) συνέβη αναστροφή και επανεμφάνιση του HBeAg. Οι τελευταίοι μετέπιπταν μεταξύ των δύο καταστάσεων έχοντας 2-3 αναστροφές στα 7 έτη της μελέτης, επεισόδια που συχνά συνοδεύονται από αναζωπύρωση της ηπατίτιδας. Αυτοί οι ασθενείς μπορεί να αναπτύξουν κίρρωση. Αναστροφή μπορεί να προκληθεί σε ανενεργούς φορείς και ως αποτέλεσμα ανοσοκαταστολής ή χημειοθεραπείας (175,176).

HBeAg-ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β

Η χρόνια ηπατίτιδα Β μπορεί να υποτροπιάσει στο 1/3 των ανενεργών φορέων χωρίς αναστροφή του HBeAg στον ορό (177). Ορισμένοι από αυτούς πιθανότατα έχουν μολυνθεί με μία από τις παραλλαγές του ιού που λόγω μεταλλάξεων σε πυρηνικές ή προπυρηνικές περιοχές του γονιδιώματος αδυνατούν να εκφράσουν το HBeAg. Οι περισσότεροι ασθενείς εισέρχονται σε αυτή τη φάση από την κατάσταση ανενεργού φορέα, ενώ άλλοι απευθείας από την HBeAg-θετική χρόνια ηπατίτιδα (175). Χαρακτηρίζονται από την απουσία του HBeAg, την παρουσία του anti-HBe, ανιχνεύσιμα επίπεδα HBV DNA, αυξημένη ALT, και ευρήματα συνεχιζόμενης φλεγμονής στο ήπαρ από τη βιοψία. Συγκρινόμενοι με όσους πάσχουν από χρόνια HBeAg-θετική ηπατίτιδα, είναι μεγαλύτεροι, έχουν, ιστολογικά, πιο προχωρημένη νόσο και χαμηλότερα επίπεδα HBV DNA. Σε κάποιους η νόσος μπορεί να προχωρά αθόρυβα για χρόνια, διανύουν περιόδους ύφεσης και έξαρσης της νόσου, όσον αφορά τα επίπεδα της ALT και του HBVDNA, αλλά και κλινικά, καθώς μπορεί να παρατηρηθεί αναζωπύρωση (174).

ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ HBV ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ

ΧΡΟΝΙΑ HBV ΛΟΙΜΩΞΗ ΚΑΙ ΚΙΡΡΩΣΗ

Οι επιπτώσεις της χρόνιας λοίμωξης από τον HBV περιλαμβάνουν την ήπια προς μέτρια ίνωση, την αντιρροπούμενη κίρρωση, τη ρήξη της αντιρρόπησης και την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Η ετήσια επίπτωση της κίρρωσης σε ασθενείς με HBeAg-αρνητική χρόνια ηπατίτιδα Β είναι 8-10%, ενώ 2-5% των ασθενών με HBeAg-θετική χρόνια ηπατίτιδα Β αναπτύσσουν κίρρωση κάθε έτος. Αυτή η διαφορά δεν εκπλήσσει, καθώς στην πρώτη ομάδα οι ασθενείς είναι πιο ηλικιωμένοι και με πιο προχωρημένη ηπατική νόσο, ενώ στους δεύτερους η νόσος μπορεί να σταματήσει ή και να βελτιωθεί, αν συμβεί και διατηρηθεί η ορομετατροπή. Σε περίπτωση όμως που το HBeAg επανεμφανισθεί, ο κίνδυνος είναι μεγάλος. Την πορεία της νόσου καθορίζουν επίσης, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού, όπως εκτιμάται από τα επίπεδα του HBV DNA και ο γονότυπος του ιού. Με τον γονότυπο Β είναι πιθανότερο να συμβεί αυτόματη ορομετατροπή και να διατηρηθεί. Επίσης οι ασθενείς αυτοί φαίνεται να έχουν λιγότερες αναζωπυρώσεις και βραδύτερη εξέλιξη προς κίρρωση (172). Οι άνδρες και οι μεγαλύτεροι σε ηλικία ασθενείς είναι πιθανότερο να αναπτύξουν κίρρωση, καθώς και όσοι καταναλώνουν σημαντικές ποσότητες αλκοόλ ή παρουσιάζουν λοίμωξη και από άλλον ιό (HCV, HDV, HIV) (171,173).

ΡΗΞΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΡΡΟΠΗΣΗΣ

Εφόσον η κίρρωση εδραιωθεί, η επίπτωση της ρήξης της αντιρρόπησης είναι περίπου 3% κατ'έτος. Ο κίνδυνος όμως, είναι μεγαλύτερος σε ασθενείς με ενεργό πολλαπλασιασμό και επίμονα υψηλά επίπεδα HBV DNA σε σύγκριση με τους ανενεργούς φορείς (173).

ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Αν και η χρόνια HBV λοίμωξη έχει συνδεθεί επιδημιολογικά με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος οι μηχανισμοί παραμένουν αδιευκρίνιστοι.

Υπάρχουν όμως σοβαρές υπόνοιες ότι ο ίδιος ο ιός έχει άμεση καρκινογόνο δράση, γεγονός που υποδεικνύει δύο σημαντικά σημεία πρόληψης. Αφενός ο εμβολιασμός που αποτρέπει την προσβολή από τον ιό και αφετέρου η θεραπεία που ενδέχεται να μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, μειώνοντας τα επίπεδα HBV DNA (178). Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι τα υψηλά επίπεδα HBV DNA αποτελούν ξεχωριστό προγνωστικό παράγοντα και για την εξέλιξη της νόσου προς κίρρωση και για την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και η πτώση τους συμβαδίζει με ιστολογική και ορολογική βελτίωση (171,179).

ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Προς το παρόν, δύο ανοσοτροποποιητικοί παράγοντες (συμβατική ιντερφερόνη-α και πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη α2α) και 5 νουκλεοσ(τ)ιδικά ανάλογα που χορηγούνται από το στόμα (λαμιβουδίνη, αδεφοβίρη, εντεκαβίρη, τελβιβουδίνη και τενοφοβίρη) χρησιμοποιούνται στις ΗΠΑ και την Ευρώπη. Αξιολογούνται επίσης, η θυμοσίνη α-Ι (ανοσοτροποποιητικός παράγοντας) (180) και η νιταζοξανίδη (αντιπαρασιτικό που δρα όμως ανοσοενισχυτικός παράγοντας στο ηπατοκύτταρο), ενώ σε παρόμοια κατεύθυνση γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης των θειαζολιδών δεύτερης γενιάς (181). Με τα υπάρχοντα δεδομένα, χορήγηση θεραπείας σίγουρα ενδείκνυται: Σε ασθενείς που έχουν οξεία ηπατική ανεπάρκεια, κίρρωση με κλινικές επιπλοκές, κίρρωση και παρουσία HBV DNA στον ορό, επανενεργοποίηση χρόνιας λοίμωξης μετά από χημειοθεραπεία ή ανοσοκαταστολή. Νεογνά μητέρων που είναι HBsAg-θετικές (ανοσοσφαιρίνη και εμβολιασμός). Επίσης, ενδείκνυται θεραπεία σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα που δεν έχουν προχωρημένη ίνωση ή κίρρωση αλλά βρίσκονται στην ανοσοενεργή φάση.

Η χορήγηση θεραπείας στους παρακάτω ασθενείς δεν αποτελεί πράξη ρουτίνας: Ασθενείς στη φάση ανοσοανοχής (υψηλά επίπεδα HBV DNA αλλά φυσιολογική ALT ή μικρή ενεργότητα στη βιοψία). Ανενεργοί φορείς ή ασθενείς σε φάση χαμηλής μεταγραφικής δραστηριότητας (με HBV DNA σε χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα και φυσιολογική ALT). Ασθενείς με λανθάνουσα (occult) λοίμωξη (HBV DNA χωρίς HBsAg) (182).

3.1β. Ρετινοειδή και χρόνια HBV λοίμωξη

Οι δράσεις των ρετινοειδών στη χρόνια Ηπατίτιδα Β χωρίζονται σε δύο άξονες: (α) Στην επίδραση των πυρηνικών υποδοχέων και των αγωνιστών τους, δηλαδή των ρετινοϊκών οξέων, στις μεταγραφικές διαδικασίες του ιού. (β) Στο ρόλο των ρετινοειδών στην ανοσολογική απάντηση και στην κάθαρση του ιού ή την εξέλιξη της λοίμωξης σε χρόνια.

(α) Στο ένα από τα δύο τμήματα του επαυξηνητή του ιού που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση, υπάρχει περιοχή στην οποία συνδέεται ο RXR-α. Η πρόκληση μετάλλαξης σε μία μόνο βάση της περιοχής αυτής επιφέρει όχι μόνο μείωση στην ικανότητα σύνδεσης του RXR-α, αλλά και της δραστηριότητας του επαυξηνητή. Το γεγονός αυτό εξηγεί τον ηπατοτροπισμό του ιού, καθώς η έκφραση των RXR γίνεται κυρίως στα κύτταρα του ήπατος όπου υπάρχει περίσσεια ρετινοειδών, και αποδεικνύει με ποιόν τρόπο ο HBV χρησιμοποιώντας στοιχεία του ξενιστή κατορθώνει να πολλαπλασιάζεται (24). Ιστορικά, αυτή είναι η πρώτη βιβλιογραφική συσχέτιση πυρηνικών υποδοχέων- ρετινοειδών και ηπατοτρόπων ιών. Από τότε, έρευνες έδειξαν ότι και οι υποδοχείς PPARα, FXRα, και HNF4α εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής του ιού (147,183).

Η ανακάλυψη της σημασίας του RXRα στην μεταγραφή του DNA του HBV (24) αποτέλεσε το ερέθισμα για τη διεξαγωγή μελετών σχετικά με την ενδεχόμενη συμμετοχή και άλλων υποδοχέων. Εξετάστηκε σε κυτταροκαλλιέργειες ο ρόλος του PPARα στην τροποποίηση της μεταγραφής του προωθητή του νουκλεοκαψιδίου του HBV. Παρουσία του 9-cisRA και του κλοφιβρικού οξέος, ενεργοποιητών των RXRα και PPARα, ο ρυθμός μεταγραφής τετραπλασιάστηκε. Η δράση των RXRα και PPARα επιτυγχάνεται μέσω τμημάτων (PPAREs) που βρίσκονται στην περιοχή 1 του επαυξηνητή και στον προωθητή του νουκλεοκαψιδίου (184). Η σύνθεση από το νουκλεοκαψίδιο του προγενομικού μεγέθους 3.5-kb RNA και η ανάστροφη μεταγραφή του αποτελούν σημείο κλειδί στον πολλαπλασιασμό του ιού και φαίνεται πως στις διαδικασίες αυτές χρησιμοποιούνται οι πυρηνικοί υποδοχείς (hepatocyte nuclear factor 4α HNF4α), RXRα και PPARα. Ο HNF4α και ο PPARγ μέσω του συνενεργοποιητή του (coactivator 1 α -PGC1α) κατά τη διάρκεια της νηστείας ενεργοποιούνται και επάγουν τη γλυκονεογένεση. Η

νηστεία ενεργοποιεί επίσης τον PPAR α . Επομένως, δεν είναι παράξενο ότι ευνοείται ο πολλαπλασιασμός του ιού σε νηστικούς αρουραίους με τη βιοσύνθεση να αυξάνεται κατά 40% σε κάθε κύκλο μεταγραφής, κυρίως σε θηλυκά πειραματόζωα. Το γεγονός αυτό, είναι σημαντικό για τη φυσική ιστορία της νόσου, ειδικά σε περιοχές που η λοίμωξη είναι ενδημική και ο υποσιτισμός συχνός. Τα ευρήματα σύνδεσης της μεταβολικής κατάστασης του ηπατοκυττάρου με τα επίπεδα μεταγραφής του ιού οδήγησαν στον χαρακτηρισμό του HBV ως ιού εμπλεκόμενου στο μεταβολισμό (metabovirus) και πρότειναν μεταβολικές παρεμβάσεις που περιορίζουν τη βιοσύνθεση του ως επιπρόσθετα θεραπευτικά μέτρα (185,186).

Τα χολικά οξέα είναι τα μόρια πρόσδεσης του πυρηνικού υποδοχέα FXR που ελέγχει την ενδογενή σύνθεση χολής στο ήπαρ, κυρίως μέσω της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου του SHP (small heterodimer particle) (187-190). Ο FXR ελέγχει απευθείας την έκφραση του γονιδίου αντλίας εξαγωγής χολικών αλάτων (bile salt export pump-BSEP). Το SHP είναι επίσης μέλος της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, δεν προσδένεται σε συγκεκριμένο επίτοπο του DNA, αλλά λειτουργεί ως καταστολέας γονιδιακής έκφρασης σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως σε πυρηνικούς υποδοχείς (191). Αναστέλλοντας τον LXR και τη μεσολαβούμενη από τον πυρηνικό υποδοχέα (liver receptor homolog 1-LRH1) επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου του CYP7A1, ο SHP ελέγχει τη σύνθεση χολικών οξέων, για να διατηρήσει αυτή την ομοιότητα όμως, είναι ικανό να ελέγχει και τη δική του έκφραση (187,188). Ωστόσο, η καταστολή των FXR και SHP σε διαγονιδιακά ποντίκια είχε μόνο μικρή αύξηση στο ρυθμό διπλασιασμού του ιού, και μάλιστα μόνο στα αρσενικά, γεγονός που δείχνει ότι μάλλον ο σημαντικός υποδοχέας για τον αναδιπλασιασμό του ιού *in vivo* είναι ο HNF- α (192).

Εικόνα (5). Στην εικόνα περιγράφονται τα συστατικά του ρυθμιστικού δικτύου για τη σύνθεση χολικών οξέων και η πιθανή δράση τους στη βιοσύνθεση του HBV (193).

Ο RAR-β έχει 4 ισομορφές που παρουσιάζουν διαφορετική συνάφεια με τα ρετινοειδή και διαφορετικές βιολογικές δράσεις. Ειδικά ο RAR-β2 θεωρείται πως έχει αντινεοπλασματικές ιδιότητες, η καταστολή της δράσης του έχει συσχετισθεί με αντίσταση στα ρετινοειδή κατά την ογκογένεση, ενώ η εξωγενής επαγωγή του σε νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές ενίσχυσε την απάντησή τους στην αναστολή της ανάπτυξης και την επαγωγή της απόπτωσης που προκαλείται από τα ρετινοειδή (194-197). Επομένως, η απώλεια της λειτουργίας του θεωρείται κρίσιμη κατά την ογκογένεση. Παθολογική μεθυλίωση του προωθητή του RAR-β2, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της έκφρασης του, απαντάται συχνά σε κακοήθεις όγκους, περιλαμβανόμενου και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (198,199). Στα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα από ασθενείς που έχουν προσβληθεί από τον HBV η επίπτωση της παθολογικής μεθυλίωσης ξεπερνά το 30%, ενώ στους υπόλοιπους είναι λιγότερο από 10% (199). Το HBx, το

κατεξοχήν ογκογόνο προϊόν του HBV, προκαλεί παθολογική μεθυλίωση στο RAR β 2, καταστέλλει την έκφραση του σε κυτταρικές σειρές ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, ενώ τα κύτταρα που εκφράζουν το HBx είναι λιγότερο ευαίσθητα στην επαγόμενη από το RA αναστολή της ανάπτυξής τους, δράση που αποκαθίσταται με τη χρήση αναστολέα της μεθυλίωσης. Καθώς το RAR- β 2 είναι από τους κύριους εκτελεστές των αντι-ογκογόνων ιδιοτήτων του RA, η υπορύθμιση του από τον HBx ενδεχομένως να είναι σημαντικό βήμα κατά τη προκαλούμενη από τον HBV ογκογένεση (200).

(β) Όσον αφορά στην ανοσορρύθμιση, τα ρετινοειδή, παίζουν σημαντικό ρόλο μέσω της καταστολής του ROR γ t στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της Treg και της Th-17κατεύθυνσης(40,41,56). Σε ασθενείς με χρόνια Ηπατίτιδα B, παρατηρήθηκε αύξηση της συχνότητας των Tregs κυττάρων στο περιφερικό αίμα, (τουλάχιστον σε μία μελέτη) (201), αυξημένη παρουσία τους στο ήπαρ και θετική συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας αυτής και του ιικού φορτίου, γεγονός που υπονοεί πως αυτή μπορεί να συνδέεται με τη φτωχή ιική κάθαρση στους εν λόγω ασθενείς. Επίσης συσχετίζονται και με τη σοβαρότητα της φλεγμονής στη βιοψία. Τα Tregs βρέθηκαν ικανά να αναστείλουν ειδικές για τον HBV T- κυτταρικές απαντήσεις στους ασθενείς που είχαν μολυνθεί από τον ιό. Αντίθετα, στην οξεία HBV λοίμωξη, η συχνότητα των κυκλοφορούντων Tregs κυττάρων ήταν αρχικά χαμηλή, αυξήθηκε στη φάση επώασης και επανήλθε στα φυσιολογικά κατά τη λύση της λοίμωξης (202,203).

Επίσης, σε σχέση με υγιείς εθελοντές, και το ποσοστό των Th17 κυττάρων βρέθηκε αυξημένο στο περιφερικό αίμα ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα B, μάλιστα η αύξηση των κυκλοφορούντων κυττάρων συσχετιζόταν θετικά με το ιικό φορτίο πλάσματος, την ALT (αμινοτρανσφεράση της αλανίνης) και το δείκτη ιστολογικής ενεργότητας της νόσου. Τα Th17 κύτταρα βρέθηκαν συσσωρευμένα στο ήπαρ των πασχόντων από χρόνια ηπατίτιδα B, με τη διήθηση αυτή να είναι αυξημένη ανάλογα με την ένταση της φλεγμονής (204-206).

Σε μία άλλη μελέτη, περιφερικά μονοπύρρηνα ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη, διεγέρθηκαν με ανασυνδυασμένη IL10 ή με αντίσωμα έναντι της IL-10 και μετρήθηκε η συχνότητα των (HBcAg)-ειδικών Th17 κυττάρων και οι παραγόμενες κυτταροκίνες. Βρέθηκε χαμηλή συχνότητα για τα Th17 κύτταρα

και αυξημένη για τα Th1, ενώ η διέγερση με HBcAg προκάλεσε την παραγωγή IL-17A, IL-22, IL-23, IL-6, TGF-β και IL-10 από τα μονοπύρρηνα των ασθενών, αλλά όχι των υγιών εθελοντών. Η ενδογενής IL10 εμπόδισε την προκαλούμενη από το HBcAg ενεργοποίηση των Th17 κυττάρων και την παραγωγή IL-17A, IL-22, IL-6 και IL-23, αλλά όχι του TGF-β. Το αντίσωμα έναντι της IL-10 αύξησε τη συχνότητα των Th17 και Th1 κυττάρων, αλλά όχι των CD4(+)CD25(+) T κυττάρων που σχετίζονται με την αύξηση της έκφρασης του RORγ στα CD4(+) T κύτταρα (207).

Τα ευρήματα αυτά υπονοούν πως οι ROR και μέσω αυτών τα ρετινοειδή 'χρησιμοποιούνται' από τον HBV με σκοπό τη διαφυγή από τις ανοσολογικές απαντήσεις που στοχεύουν στους ιούς. Επομένως, η μείωση των ηπατικών ρετινοειδών που παρατηρείται στη χρόνια HBV λοίμωξη, τουλάχιστον συνυπάρχει με δυσπραγία του ανοσολογικού συστήματος που επιφέρει αδυναμία κάθαρσης του ιού και καθιστά τη λοίμωξη χρόνια.

3.2. ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C

3.2α. Στοιχεία επιδημιολογίας και παθοφυσιολογίας

Ο ιός της ηπατίτιδας C (Hepatitis C Virus – HCV) θεωρείται μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας παγκοσμίως, καθώς περίπου 170 εκατομμύρια άτομα είναι μολυσμένα σε όλο τον κόσμο, ενώ θεωρείται η συχνότερη αιτία κίρρωσης στις ΗΠΑ και τη Δυτική Ευρώπη (208). Η πλειοψηφία των ασθενών (50–80%), αναπτύσσει χρόνια λοίμωξη και εφόσον αυτή εγκατασταθεί, δεν υπάρχει αυτόματη κάθαρση. Η μόλυνση γίνεται αιματογενώς. Ο χρόνος επώασης είναι 15-180 ημέρες και η λοίμωξη χαρακτηρίζεται από ευρύ φάσμα εκδηλώσεων (209). Σημαντικές είναι οι εξωηπατικές εκδηλώσεις της HCV λοίμωξης. Η μικτή κρυοσφαιριναιμία και η μεμβρανοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα αποδίδονται σε εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων και είναι οι συχνότερες. Άλλα σύνδρομα είναι η όψιμη δερματική πορφυρία, η λευκοκυτταροκλαστική αγγειίτιδα, το σύνδρομο Sjogren, τα έλκη Mooren στον κερατοειδή, ο ομαλός λειχήνας, αυτοάνοσες θυροειδοπάθειες, σακχαρώδης διαβήτης και το μη Hodgkin Λέμφωμα (210-214). Αν και ο κύριος στόχος του HCV είναι το ηπατοκύτταρο, ο ιός επιδεικνύει και λεμφοτροπισμό καθώς μέρη του γονιδιώματος του έχουν βρεθεί σε κυκλοφορούντα T και B λεμφοκύτταρα, σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα αλλά και σε άλλα όργανα όπως ο εγκέφαλος (215,216), ενώ στην πλειοψηφία των εξωηπατικών εκδηλώσεων εμπλέκεται το ανοσολογικό σύστημα και αυτοάνοσοι μηχανισμοί (214).

Ο HCV ανήκει στο γένος της οικογένειας Flaviviridae. Το γενετικό υλικό του, θετικό μονής έλικας RNA μεγέθους 9600 νουκλεοτιδίων, μεταγράφεται αρχικά ως μία ενιαία πολυπρωτεΐνη που στη συνέχεια διασπάται από πρωτεάσες του ιού και του ξενιστή σε δομικές (core, envelope 1 and 2) και μη δομικές (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B) πρωτεΐνες. Η NS5B κωδικοποιεί την εξαρτώμενη από το ιικό RNA, RNA-πολυμεράση, η οποία δε διαθέτει λειτουργία απόδειξης ανάγνωσης. Έτσι, ο αριθμός των μεταλλάξεων που συμβαίνουν είναι πάρα πολύ υψηλός, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη 6 γονοτύπων με διαφορά 31–33% σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, οι οποίοι διαιρούνται σε πολλούς επιδημιολογικά διακριτούς υπότυπους που

διαφέρουν μεταξύ τους κατά 20–25%. Η κλινική σημασία των παραπάνω είναι τεράστια, καθώς όχι μόνο η απάντηση στην υπάρχουσα θεραπεία (πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη-α και ριμπαβιρίνη), εξαρτάται από τον γονότυπο, αλλά και η ανάπτυξη εμβολίου και νέων φαρμάκων και η ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, προσκρούει στην ικανότητα του ιού να μεταλλάσσεται (108,217).

Στα ηπατικά κολποειδή, τα ηπατοκύτταρα είναι πολωμένα, έχοντας τον βασικοπλάγιο πόλο σε επαφή με το αίμα και τον κορυφαίο πόλο σε επαφή με τη χολή. Η πόλωση αυτή εξασφαλίζεται με σφικτές συνδέσεις (tight junctions). Στο αίμα, ο HCV βρίσκεται σε επαφή με τις λιποπρωτεΐνες και περνά μέσα από το ηπατικό μικροπεριβάλλον στην εξωκυττάρια ουσία που αποτελείται από γλυκοζαμινογλυκάνες και πρωτεΐνες. Στη συνέχεια συναντά τη βασικοπλάγια μεμβράνη του ηπατοκυττάρου όπου αλληλεπιδρά, με άγνωστο τρόπο, με τους παράγοντες εισόδου: τον υποδοχέα λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL receptor), τον CD81 tetraspanin, και τον υποδοχέα λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (high-density lipoprotein scavenger receptor SR-BI). Δύο αναγκαίοι παράγοντες για την είσοδο του HCV στο ηπατοκύτταρο είναι οι πρωτεΐνες σφικτής σύνδεσης claudin-1 και occludin, επομένως η πόλωση των ηπατοκυττάρων παίζει ρόλο στην είσοδο του ιού. Στη συνέχεια πιθανότατα γίνεται ενδοκύττωση εξαρτώμενη από την κλαθρίνη και διάχυση με άγνωστο τρόπο και πιθανή συμμετοχή των λιποπρωτεϊνών (218,219). Η ικανότητα σύνδεσης του HCV με τον CD81 εξηγεί και την ανεύρεση του και σε άλλους ιστούς όπως τον λεμφικό και το ΚΝΣ (220).

Σημαντικό ρόλο στην παραπέρα εξέλιξη της νόσου παίζει η αντίδραση του ξενιστή, η οποία, ενδεχομένως και σε συνάρτηση με τον γονότυπο του ιού, θα καθορίσει αν θα υπάρξει αντιμετώπιση της λοίμωξης ή εξέλιξή της σε χρόνια ηπατίτιδα με αυξημένο κίνδυνο κίρρωσης ή ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Αρχικά τον ξενιστή καλείται να υπερασπιστεί το σύστημα φυσικής ανοσίας με τα φαγοκύτταρα και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που πυροδοτούν τους μη ειδικούς μηχανισμούς φλεγμονής. Ταυτόχρονα μέσω της επαφής των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και των αντιγόνων με τα παρθένα T και B λεμφοκύτταρα και της καθοδήγησης των δενδριτικών κυττάρων στους

λεμφαδένες, ξεκινά η ειδική ανοσολογική απόκριση. Καθοριστικό ρόλο φαίνεται να παίζει η κατεύθυνση που θα πάρει η διαφοροποίηση των Τ-βοηθητικών (Th) λεμφοκυττάρων. Τα Th1 κύτταρα παράγουν IL-2 και IFN- γ , ενεργοποιούν τα μακροφάγα και τα κυτταροτοξικά CD8⁺ Τ κύτταρα. Τα Th2 κύτταρα παράγουν IL-4, IL-5, IL-10 και IL-13, προκαλώντας έτσι την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των Β κυττάρων σε αντιγονοπαρουσιαστικά πλασματοκύτταρα. Η κατεύθυνση της Th παραγωγής εξαρτάται και από το μικροπεριβάλλον που δημιουργείται μεταξύ Τ κυττάρου και δενδριτικού κυττάρου όταν λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή σημάτων αλλά και ο ιστός στον οποίο αυτό συμβαίνει (221,222).

Από την άλλη πλευρά, ο ιός έχει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζεται γρήγορα, να μεταλλάσσεται συνέχεια και να αντιδρά στην ανοσολογική απάντηση, έχοντας τροπισμό προς τα Β λεμφοκύτταρα, αλλά και τα κύτταρα NK. Όταν ο ιός αδυνατεί να εξελιχθεί γενετικά σε υποείδος που αποδρά από την ανοσιακή πίεση, τροποποιώντας τις περιοχές στόχους των αντισωμάτων η κατάσταση βαίνει προς όφελος του ξενιστή (223). Η λοίμωξη έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων έναντι του ιού σε διάστημα 50-60 ημερών. Ωστόσο, σε αντίθεση με την HBV λοίμωξη, η παρουσία τους δεν σημαίνει ότι έχει αποκλειστεί το ενδεχόμενο μετάπτωσης της λοίμωξης σε χρόνια. Σημαντικό ρόλο στην έκβαση της λοίμωξης και στην ύπαρξη ηπατικής βλάβης παίζει το μέγεθος και το είδος της αντίδρασης των CD4⁺ και CD8⁺ Τ κυττάρων, μια έντονη Th1 απάντηση φέρνει θετικά αποτελέσματα. Το είδος της ανοσολογικής απάντησης φαίνεται να επηρεάζεται και από το γονότυπο του ιού (224). Θετικοί προγνωστικοί παράγοντες θεωρούνται επίσης το γυναικείο φύλλο και η εισβολή της νόσου με μορφή οξείας ικτερικής ηπατίτιδας. Κατά την οξεία λοίμωξη από τον HCV φαίνεται να υπάρχει ένα κρίσιμο διάστημα 12 εβδομάδων στο οποίο το 20-25% των ασθενών θα αντιμετωπίσει επιτυχώς τη λοίμωξη, ενώ αν συνυπολογιστούν και οι περιπτώσεις με HCV RNA θετικό και αρνητικό την στιγμή της οροαναστροφής, το ποσοστό ίσως και να αγγίζει το 40% (225-227).

3.2β. Ηπατίτιδα C και Ρετινοειδή.

Μετά την είσοδο του στο ηπατοκύτταρο, ο ιός έρχεται σε επαφή με τα λιποσταγονίδια και τα χρησιμοποιεί για τον πολλαπλασιασμό του. Με τη λοίμωξη δημιουργείται στο κυτταρόπλασμα ένα μεμβρανώδες δίκτυο μέσα στο οποίο γίνεται η αναπαραγωγή του RNA και στη συνέχεια στο κυτταρόπλασμα παράγονται οι ιικές πρωτεΐνες και γίνεται η «συναρμολόγηση» του ιού. Τα λιποσταγονίδια υφίστανται μορφολογικές μεταβολές, καθώς μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου εμπλουτισμένες με μη δομικές αλλά χρησιμοποιούμενες για την αναπαραγωγή του ιού πρωτεΐνες, επικάθονται στη μονήρη μεμβράνη τους. Η πυρηνική πρωτεΐνη του ιού εφάπτεται με το τοίχωμα τους και διακοπή της συσχέτισης αυτής οδηγεί στη διακοπή της διαδικασίας αναπαραγωγής του (228,229). Όλες οι παραπάνω διαδικασίες σύνθεσης και ωρίμανσης του ιού εξαρτώνται από τη μικροσωματική πρωτεΐνη μεταφοράς (MTP) και την απολιποπρωτεΐνη Β με τρόπο που μοιάζει με τη διαμόρφωση των very-low-density lipoproteins (VLDL). Στο αίμα προσβεβλημένων ατόμων, ο HCV βρίσκεται σε συσσωματώματα με λιποπρωτεΐνες (LDL) σε χαμηλές ή πολύ χαμηλές πυκνότητες, ανάλογα με το στάδιο της λοίμωξης. Αυτά τα συμπλέγματα περιέχουν τριγλυκερίδια, HCV RNA, πυρηνική πρωτεΐνη και απολιποπρωτεΐνες Β και Ε (apoB και apoE). Η χρόνια λοίμωξη συσχετίζεται με διαταραχές στο μεταβολισμό των λιπιδίων και μείωση των β-λιποπρωτεϊνών στον ορό, με ανώμαλη συσσώρευση αυτών στα ηπατικά παρεγχυματικά κύτταρα (στεάτωση), η οποία ορισμένες φορές συσχετίζεται και με την ένταση αναπαραγωγής του ιού (230).

Έτσι, ο ιός χρησιμοποιώντας βιοχημικούς δρόμους του ηπατοκυττάρου καταφέρνει να επιζεί και να αναπτύσσεται. Η IL-12 παρουσιάζει πολλαπλές βιολογικές δράσεις, μέσω των Τ και των ΝΚ κυττάρων, προάγοντας την παραγωγή IFN-γ, η οποία με τη σειρά της αυξάνει την κυτταροτοξικότητά τους. Η παραγωγή της IL-12 είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη (Th1) ανοσολογικής αντίδρασης. Τα ρετινοειδή αναστέλλουν την παραγωγή της IL-12 από τα μακροφάγα μέσω της συσχέτισης του RXR και του παράγοντα NFκΒ (Nuclear Factor κ Β). Η έκφραση της πυρηνικής πρωτεΐνης του HCV,

ενισχύει τη δράση του NFκB. Η σύνδεση της στο σημείο του DNA που αφορά τον RXR-α αυξάνει την ικανότητα του τελευταίου να προσδίδεται και τη μεταγραφική δραστηριότητα που ελέγχεται, τόσο από το ομοδιμερές RXR-α, όσο και από το ετεροδιμερές PPARα/RXRα. Οι τροποποιήσεις που επέρχονται στην έκφραση των σχετικών γονιδίων, μπορεί να συμβάλλουν στη διαταραχή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του μεταβολισμού των λιπιδίων, οδηγώντας αντίστοιχα σε ογκογένεση και στεάτωση. Τα παραπάνω καταδεικνύουν το πώς επιδρά ο ιός στο ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή και ίσως κατά ένα μέρος να εξηγούν το γιατί σε ορισμένους ασθενείς η λοίμωξη γίνεται χρόνια (231-233).

Φαίνεται πως η πυρηνική πρωτεΐνη του HCV περιέχει και σημεία πρόσδεσης του RNA, ικανά να καταστείλουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του PPAR-α (234). Ένα από τα γονίδια που αφορούν τη διαχείριση των λιπαρών οξέων, επηρεάζονται από τον PPAR-α και η έκφραση του βρέθηκε μειωμένη στο ήπαρ ασθενών με χρόνια HCV, είναι της παλμιτοϋλικής τρανσφεράσης της καρνιτίνης (carnitine palmitoyl transferase 1-CPT-1) (234-236). Αντίστροφα, μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια δείχνουν πως η πυρηνική πρωτεΐνη του HCV ενεργοποιεί τον PPAR-α. Καθώς όμως μέσω αυτού ρυθμίζονται και γονίδια που εμπλέκονται στη δημιουργία οξειδωτικών μορίων, όπως της acyl-CoA οξειδάσης (AOX) και του κυτοχρώματος P450 4A1, προκαλείται βλάβη στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, διαταραχή στη β-οξείδωση και συσσώρευση λίπους στα ηπατοκύτταρα (237,238).

Ο PPAR-γ ελέγχει την ηπατική λιπογένεση και τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, αυξάνοντας την έκφραση γονιδίων όπως η συνθάση λιπαρών οξέων (fatty acid synthase -FAS), η acyl-coA καρβοξυλάση (ACC), και η στεαρύλ-coA αφυδρογονάση-1 (SCD-1). Υπάρχουν μελέτες που συνδέουν την HCV λοίμωξη με αύξηση της δράσης του PPAR-γ, υπονοώντας πως κάτι τέτοιο συμβάλλει στην έλευση της στεάτωσης (239-241). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί και καταστολή της έκφρασης του PPAR-γ από το γονότυπο 3 του ιού που οδηγεί στην επαγωγή του καταστολέα (suppressor of cytokine signaling 7 - SOCS-7) που φυσιολογικά εμποδίζεται από τον PPAR-γ. Με αυτό τον τρόπο ο ιός αναστέλλει την έκκριση κυτοκινών και διαφεύγει από το ανοσολογικό σύστημα. Ο παράγοντας SOCS-7 παίζει ρόλο και στην ανάπτυξη ινσουλinoαντίστασης, ένα γνωστό αποτέλεσμα της χρόνιας HCV

λοίμωξης (242,243). Ο PPAR-γ εκφράζεται στα ήρεμα αστεροειδή κύτταρα αλλά όχι στα ενεργοποιημένα από τον HCV, η επαφή του με αυτά εξασθενεί την ενεργοποίησή τους και τα επαναφέρει στην ηρεμία. Αυτό πιθανώς συμβαίνει με αναστολή του TGFβ από τον PPAR-γ (244-247).

Τα χολικά οξέα παίζουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό του HCV στα ηπατοκύτταρα, μέσω τροποποίησης της σηματοδότησης του FXR. Αυξάνουν τα επίπεδα του HCV RNA σε κυτταρικές σειρές, μειώνουν την αντιική δράση της ιντερφερόνης, ενώ οι ανταγωνιστές του FXR εμποδίζουν την έκφραση του HCV RNA (248-250). Η ενεργοποίηση του FXR έχει και αντιινωτικές ιδιότητες, καθώς καταστέλλει την έκφραση του TGFβ και την παραγωγή χημειοτακτικών κυττοκινών, αλλά και μέσω της επαγωγής του SHP, μειώνει την έκφραση γονιδίων που αφορούν την παραγωγή κολλαγόνου και εξωκυττάριας ουσίας (251-253).

Όσον αφορά τον LXRα, αυτός ρυθμίζει την ομοιόσταση της χοληστερόλης, μεταξύ άλλων και με τον έλεγχο του (steroid regulatory element-binding protein-1c - SREBP-1c) που με τη σειρά του συμβάλλει στον έλεγχο των ACC, FAS, και SCD-1. Ο HCV ενεργοποιώντας τον LXRα/RXRα επάγει την έκφραση του SREBP-1c με τη βοήθεια του παράγοντα (proteasome activator PA28γ/REGγ) του ξενιστή. Αυτός είναι ένας άλλος πιθανός μηχανισμός πρόκλησης στεάτωσης (239,254). Αντίστοιχα με τον FXR, και ο LXR έχει αντιινωτικές ιδιότητες, καθώς εκφράζεται στα HSC και εμπλέκεται στην ενεργοποίησή τους και στην ανοσορύθμιση, καταστέλλοντας την IL-6 και τον TNF-α (239).

Εικόνα (6) Στην εικόνα συνοψίζονται οι δράσεις των πυρηνικών υποδοχέων στο χειρισμό των λιπιδίων και τη στεάτωση (255).

Ορισμένες φορές ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός έλευσης της στεάτωσης μοιάζει με όσα συναντά κανείς στην NAFLD, με την ινσουλινοαντίσταση να παίζει σημαντικό ρόλο. Σε κάποιες περιπτώσεις ο HCV, ιδιαίτερα ο γονότυπος 3, ενδέχεται να συμβάλλει στην δημιουργία της. Έτσι, εισήχθη ο όρος μεταβολική και ιολογική στεάτωση για να περιγράψει τις δύο καταστάσεις. Τα επιχειρήματα υπέρ της ύπαρξης της ιολογικής στεάτωσης είναι τα εξής: i) Η πλειοψηφία των ασθενών με λοίμωξη από τον γονότυπο 3 παρουσιάζουν στεάτωση. ii) Η σοβαρότητά της συσχετίζεται με τα επίπεδα του HCV RNA στον ορό και στο ήπαρ. iii) Η απάντηση στη χορηγούμενη θεραπεία βελτιώνει την ιστολογική εικόνα. iv) Στους ασθενείς που έχουν προσβληθεί από τον γονότυπο 3, τα επίπεδα αδιπνονεκτίνης στον ορό αρχικά είναι χαμηλά, ενώ μετά από επιτυχημένη θεραπεία αυξάνουν. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα χαμηλά επίπεδα αδιπνονεκτίνης είναι ανεξάρτητα από το φύλο, το δείκτη μάζας σώματος και την παρουσία ινσουλινοαντίστασης (256,257). v) Ο ιός μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ μειώνοντας την έκκρισή τους στον ορό, καθώς μπορεί να επηρεάσει τη σύνθεση των

λιποπρωτεϊνών. Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι η πλειοψηφία των ασθενών με HCV λοίμωξη και στεάτωση παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα απολιποπρωτεΐνης – B, κατάσταση που αναστρέφεται με τη θεραπεία. In vitro και σε διαγονιδιακά ποντίκια, η πυρηνική πρωτεΐνη του ιού προκαλεί συσσώρευση τριγλυκεριδίων αναστέλλοντας την MTP, ενώ η δράση της στα μιτοχόνδρια, αλλά και η ίδια συσσώρευση των τριγλυκεριδίων προκαλούν οξειδωτικό stress επιδεινώνοντας τη στεάτωση. vi) Ο ιός αυξάνει τη δράση του SREBP 1c και του RXRa, κάτι που μπορεί να ευνοεί την λιπογένεση. vii) Η μειωμένη έκφραση του PPARα που προκαλείται από τον HCV in vitro μπορεί να μειώνει τον καταβολισμό των λιπιδίων προκαλώντας στεάτωση. viii) Η θετική επίδραση του ιού στην ινσουλινοαντίσταση καθώς αυτός καταστέλλει τους PPARγ υποδοχείς και αποσυνθέτει το υπόστρωμα υποδοχέα ινσουλίνης-1 και 2, αφενός μπορεί να εξηγήσει την αυξημένη επίπτωση του διαβήτη τύπου II στους ασθενείς αυτούς και αφετέρου δείχνει έναν έμμεσο τρόπο «μεταβολικής στεάτωσης». Αρκετά φάρμακα της κατηγορίας των στατινών αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του ιού in vitro. Ωστόσο, δεν έχει βρεθεί ακόμα τμήμα του γονιδιώματος του ιού που να προκαλεί στεάτωση, ενώ αυτή μπορεί να προϋπάρχει της λοίμωξης και να μη βελτιώνεται με τη θεραπεία, αλλά ούτε να επιδεινώνεται με τον πολλαπλασιασμό του ιού (ειδικά σε λοιμώξεις από γονότυπο 1) (258-260). Σε ασθενείς με λοίμωξη από γονότυπο 1 βρέθηκε, ότι η RBP4 στον ορό, ήταν αυξημένη, ανεξάρτητα από την ύπαρξη παχυσαρκίας και ινσουλινοαντίστασης και μάλιστα, τουλάχιστον σε μία μελέτη, τα επίπεδα της ήταν υψηλότερα από αυτά των πασχόντων από NAFLD, στους οποίους επίσης είναι μία από τις αδιποκίνες που αυξάνονται. Ως πιθανή εξήγηση προτείνεται από τους συγγραφείς η επαγωγή της σύνθεσης της από τον ιό μέσω της επίδρασης του στον RXR-α, αν και δεν αποκλείεται να αποτελεί απλά μία αυξημένη απάντηση των αδιποκινών στο ηπατικό stress που προκαλείται από τη λοίμωξη (231,261).

Οι δομικές πρωτεΐνες του ιού από μόνες τους, όπως παρατηρείται σε διαγονιδιακά ποντίκια, προκαλούν οξειδωτικό stress και ενώνονται με τις απολιποπρωτεΐνες A1 και A2 που συμμετέχουν στη συλλογή και συσσώρευση τριγλυκεριδίων στα ηπατοκύτταρα. Η πυρηνική πρωτεΐνη, προκαλεί μιτοχονδριακή βλάβη, που οδηγεί τόσο σε οξειδωτικό stress, όσο και μέσω

αυτού σε τοπική διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων. Επίσης, αντιδρά με το κατασταλτικό στοιχείο έκφρασης του RAR Sp 110b και το 'μετατοπίζει' από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της επαγόμενης από το ATRA μεταγραφικής δραστηριότητας. Σε κυτταρικές σειρές μάλιστα, επέρχεται ευαισθητοποίηση των κυττάρων σε μεσολαβούμενο από το ATRA κυτταρικό θάνατο. Επομένως, πολλές μη ειδικές παθοφυσιολογικές διαδικασίες που παρατηρούνται στην εγκατάσταση της στεάτωσης αποβαίνουν σε όφελος του ιού, αλλά δεν είναι σαφές αν ο ιός τις προκαλεί ή απλά τις εκμεταλλεύεται, καθώς ούτε οι παχύσαρκοι, ούτε οι αλκοολικοί που θα ανέπτυσαν κίρρωση έχουν ανοσία απέναντι στον ιό (262,263).

3.2γ Ο ρόλος του ATRA στη θεραπεία της Ηπατίτιδας C

Η κλασσική πλέον θεραπεία της χρόνιας HCV λοίμωξης είναι ο συνδυασμός πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης με ριμπαβιρίνη (264). Καινούργια φάρμακα έχουν προκύψει από την έρευνα όπως οι αναστολείς πρωτεασών που έχουν ήδη αρχίσει να χρησιμοποιούνται στην καθημερινή πρακτική (265,266). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μία πρόσφατη μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 20 ασθενείς με γονότυπο 1 που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία με ιντερφερόνη ή πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη και ριμπαβιρίνη. Στους 10 χορηγήθηκε all trans ρετινοϊκό οξύ ως μονοθεραπεία για 12 εβδομάδες, και στους υπόλοιπους συνδυασμός του με πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη. Στην πρώτη ομάδα, οι μισοί ασθενείς είχαν πτώση του HCV RNA >1log, ενώ στη δεύτερη, σε 5 ασθενείς η πτώση ήταν >2log και σε 3 το HCV RNA εξαφανίστηκε από τον ορό. Η ιαιμία επανεμφανίστηκε μετά τη διακοπή και οι σημαντικότερες παρενέργειες ήταν κεφαλαλγία, ξηροστομία και ξηρότητα βλεννογόνων. Η μελέτη αυτή, αν και με λίγους ασθενείς δείχνει ότι μετά την κατάλληλη αξιολόγηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον το all trans ρετινοϊκό οξύ στην αντιμετώπιση της χρόνιας ηπατίτιδας C (267).

Η επιλογή του ATRA έγινε με βάση στοιχεία που αφορούσαν το ένζυμο γαστρεντερική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (gastrointestinal glutathione peroxidase - GI-GPx), το οποίο στον άνθρωπο εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα του ήπατος και του στομάχου και θεωρείται ένα από τα κύρια

αντιοξειδωτικά ένζυμα αντιμετώπισης του κυτταρικού οξειδωτικού stress. Η έκφραση του GI-GPx mRNA και η πρωτεΐνη του, σε διάφορες κυτταρικές σειρές παρουσίαζε αντίστροφη συσχέτιση με το κυτταρικό HCV RNA. Επειδή ο προωθητής του γονιδίου περιέχει σημεία απάντησης στο RA, με την προσθήκη του ATRA επετεύχθη υπερέκφραση του GI-GPx που με τη σειρά της προκάλεσε αποτελεσματική καταστολή της έκφρασης του HCV (268,269). Αν και περιορισμένη και παροδική, η δράση του ATRA ως μονοθεραπεία αποδεικνύει την αντιική ικανότητα του *in vivo* (267).

Παράλληλα, σε άλλη μελέτη, η προσθήκη ATRA σε κυτταρικές σειρές ενίσχυσε τη δράση της IFN-α προκαλώντας αύξηση των τύπου I υποδοχέων της (270). Η συνεργική δράση του ATRA με την IFN-α, αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα τους ως συνδυασμός (267). Η χρήση του ATRA στη Δερματολογία έχει συνδεθεί με ηπατοτοξικότητα, η έρευνα κράτησε μόνο 12 εβδομάδες, διάστημα που θεωρήθηκε μικρό για να προκληθούν βλάβες στο ήπαρ (271-274). Παρόμοιες παρενέργειες έχει παρουσιάσει και η ριμπαβιρίνη (275-278) και γι' αυτό οι ερευνητές προτίμησαν αρχικά να μη συνδυάσουν τα δύο φάρμακα. Επομένως, σε ασθενείς που δεν απάντησαν σε προηγούμενες θεραπείες η χορήγηση ATRA μπορεί να συζητηθεί.

4. ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΕΣ

Οι τρεις βασικότερες αυτοάνοσες ηπατοπάθειες είναι η αυτοάνοση ηπατίτιδα (Autoimmune Hepatitis - AIH), η πρωτοπαθής χολική κίρρωση (Primary Billiary Cirrhosis - PBC) και η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (Primary Sclerosing Cholangitis - PSC). Κοινό χαρακτηριστικό των αυτοάνοσων ηπατοπαθειών αποτελεί η παρουσία χαρακτηριστικών αυτοαντισωμάτων στον ορό των ασθενών (279). Οι AIH και PBC αποτελούν τις συχνότερες αυτοάνοσες ηπατοπάθειες με επίπτωση 17/100.000 και 25-40/100.000 αντίστοιχα, ενώ και στις δύο νόσους το γυναικείο φύλο φαίνεται να επικρατεί στην AIH στο 70-80% και στην PBC στο 80-90% των ασθενών (280,281).

4.1. ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ

4.1α. Στοιχεία επιδημιολογίας και παθοφυσιολογίας

Αν και παλαιότερα η ΑΙΗ θεωρούνταν νόσος που προσβάλλει νεαρές γυναίκες, είναι πλέον αποδεκτό ότι πλήττει και τα δύο φύλλα και κάθε ηλικία (282). Η αιφνίδια εισβολή μετά από ιογενή λοίμωξη δεν είναι σπάνια, αλλά συνήθως η νόσος εκδηλώνεται ύπουλα, με μη ειδικά συμπτώματα όπως κόπωση, αρθραλγίες, και αίσθημα βάρους στο δεξί υποχόνδριο, ενώ ήδη η πρώτη κλινική εξέταση μπορεί να αποκαλύψει ηπατοσπληνομεγαλία, αραχνοειδείς ευρυαγγείες και άλλα σημεία ηπατικής ανεπάρκειας. Στις εξωηπατικές εκδηλώσεις περιλαμβάνονται η αρθρίτιδα, η θυροειδίτιδα, η νεφρίτιδα, η ελκώδης κολίτιδα, το σύνδρομο Sjogren και η Coombs θετική αιμολυτική αναιμία (282).

Η διάγνωση τίθεται με βάση τα περιγραφικά κριτήρια που περιγράφηκαν το 1998 από την Διεθνή Ομάδα Αυτοανόσου Ηπατίτιδας (283), ενώ το βαθμοποιημένο σύστημα που αναπτύχθηκε το 1992 και τροποποιήθηκε το 1998 από τη την ίδια ομάδα, χρησιμοποιείται κυρίως στη διεξαγωγή μελετών (283) (Πίνακες 1,2 και 3). Παρουσιάζει πολύ καλή ειδικότητα στο να αποκλείει την ΑΙΗ σε ασθενείς με χρόνιες ηπατοπάθειες, αλλά η ευαισθησία του σε σύνδρομα επικάλυψης είναι χαμηλή (279). Πιο πρόσφατα δημιουργήθηκε ένα πολύ πιο εύχρηστο απλοποιημένο βαθμοποιημένο σύστημα διάγνωσης το οποίο μπορεί να χρησιμοποιείται στην καθ' ημέρα πράξη (284). (Πίνακας 4) Η αναγκαιότητα έγκαιρης διάγνωσης της ΑΙΗ είναι μεγάλη καθώς πρόκειται για καταστροφικό νόσημα όταν μένει χωρίς θεραπεία.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Αναθεωρημένα περιγραφικά κριτήρια για τη διάγνωση της ΑΙΗ

Χαρακτηριστικό	Βέβαιη	Πιθανή
Ιστολογική εικόνα	Διάμεση ηπατίτιδα με μέτρια ή σοβαρή φλεγμονώδη δραστηριότητα, με ή χωρίς λοβιακή ηπατίτιδα ή κεντρική-πυλαία γεφυροποιό νέκρωση, αλλά χωρίς αλλοιώσεις των χοληφόρων ή καλά προσδιορισμένα κοκκιώματα ή άλλες εμφανείς αλλοιώσεις που υποδηλώνουν διαφορετική αιτιολογία.	Το ίδιο με τη βέβαιη.
Βιοχημικές εξετάσεις ορού	Κάθε παθολογική τιμή στις αμινοτρανσφεράσες ορού, ειδικά (αλλά όχι αποκλειστικά) αν η αλκαλική φωσφατάση ορού δεν είναι αξιοσημείωτα αυξημένη. Φυσιολογικές συγκεντρώσεις ορού για α1-αντιθρυψίνη, χαλκό και σερουλοπλασμίνη.	Το ίδιο με τη βέβαιη, αλλά μπορούν να συμπεριληφθούν ασθενείς με παθολογικές συγκεντρώσεις χαλκού και σερουλοπλασμίνης, με την προϋπόθεση πως έχει αποκλεισθεί η νόσος Wilson.
Ανοσοσφαιρίνες ορού	Συγκέντρωση ολικών σφαιρινών ορού ή γ-σφαιρίνης ή IgG μεγαλύτερη από 1,5 φορές του ανώτερου φυσιολογικού ορίου.	Κάθε συγκέντρωση ολικών σφαιρινών ορού ή γ-σφαιρίνης ή IgG μεγαλύτερη από το ανώτερο φυσιολογικό όριο.
Αυτοαντισώματα ορού	Οροθετικότητα για ANA, SMA ή anti-LKM-1 αντισώματα σε τίτλους μεγαλύτερους του 1:80. Χαμηλότεροι τίτλοι (ειδικά του anti-LKM-1) μπορεί να είναι σημαντικοί σε παιδιά. Οροαρνητικότητα για AMA.	Το ίδιο με τη βέβαιη, αλλά σε τίτλους 1:40 ή μεγαλύτερους. Μπορούν να περιληφθούν ασθενείς οροαρνητικοί για τα προαναφερθέντα αυτοαντισώματα αλλά θετικοί για άλλα (ANCA, anti-LC1, anti-SLA/LP, anti-ASGPR και anti-sulfatide).

Άλλοι αιτιολογικοί παράγοντες	Μέση κατανάλωση αλκοόλ κάτω από 25 g/ημέρα. Αρνητικό ιστορικό για πρόσφατη χρήση γνωστών ηπατοτοξικών φαρμάκων	Μέση κατανάλωση αλκοόλ κάτω από 50 g/ημέρα και αρνητικό ιστορικό για πρόσφατη χρήση γνωστών ηπατοτοξικών φαρμάκων. Μπορούν να περιληφθούν ασθενείς που έχουν καταναλώσει μεγαλύτερες ποσότητες αλκοόλ ή με πρόσφατη χρήση πιθανών ηπατοτοξικών φαρμάκων, αν υπάρχουν αδιάσειστα στοιχεία συνεχιζόμενης ηπατικής βλάβης μετά την αποχή από το αλκοόλ ή την απόσυρση του φαρμάκου.
-------------------------------	--	--

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Σύστημα βαθμολόγησης για τη διάγνωση της ΑΙΗ

Παράμετρος /Χαρακτηριστικά	Βαθμοί
Φύλο (Θήλυ)	+ 2
Λόγος ALP:AST (ή ALT) (επίπεδο αύξησης πάνω από το φυσιολογικό της αλκαλικής φωσφατάσης σε σχέση με τις τρανσαμινάσες).:	
<1.5	+ 2
1.5–3.0	0
> 3.0	-2
Ολικές σφαιρίνες ορού, γ-σφαιρίνες ή IgG πάνω από το φυσιολογικό	
>2.0	+3
1.5–2.0	+2
1.0–1.5	+1
<1.0	0
ANA, SMA ή LKM-1 (τίτλοι με ανοσοφθορισμό σε ιστούς αρουραίου ή κύτταρα HEp2)	
>1:80	+3
1:80	+2
1:40	+1
<1:40	0
AMA θετικά	-4

Δείκτες ιογενούς ηπατίτιδας (IgM anti-HAV, HBsAg, IgM anti-HBc, anti-HCV και HCV-RNA)	
Θετικοί	-3
Αρνητικοί	+3
Ιστορικό πρόσφατης ή συχνής χρήσης γνωστών ή ύποπτων ηπατοτοξικών φαρμάκων	
Θετικό	-4
Αρνητικό	+1
Μέση ημερήσια κατανάλωση οινοπνεύματος	
<25 g	+2
>60 g	-2
Ευρήματα από τη βιοψία	
Περιτυλαία (Interface) ηπατίτιδα	+3
Επικρατούσα λεμφοπλασματοκυτταρική διήθηση	+1
Παρουσία ηπατοκυττάρων σε ροζέτες	+1
Τίποτε από τα παραπάνω	-5
Αλλοιώσεις στα χοληφόρα(τυπικές για PBC,PSC ή Wilson)	-3
Άλλες αλλοιώσεις (χαρακτηριστικές για άλλη νόσο).	-3
Παρουσία άλλου αυτοάνοσου νοσήματος στον ασθενή ή σε συγγενή πρώτου βαθμού	
	+2
Προαιρετικές πρόσθετες παράμετροι(προσμετρώνται μόνο αν τα ANA, SMA ή LKM-1 είναι αρνητικά)	
Οροθετικότητα οποιουδήποτε ANCA, anti-LC1, anti-SLA/LP, anti-ASGPR και anti-sulfatide	+2
HLA DR3, DR4, ή άλλο HLA με γνωστή συσχέτιση με την AIH)	+1
Ανταπόκριση στη θεραπεία (βλέπε πίνακα 3)	
Πλήρης	+2
Υποτροπή	+3
Διάγνωση με βάση τα αθροίσματα :	
Πριν τη θεραπεία:	
Βέβαιη AIH	>15
Πιθανή AIH	10–15
Μετά τη θεραπεία:	
Βέβαιη AIH	>17
Πιθανή AIH	12–17
Συντομογραφίες ALP=alkaline phosphatase. AST=aspartate aminotransferase. ALT=alanine aminotransferase. ANA=antinuclear antibodies. SMA=smooth muscle antibodies. LKM-1=type 1 liver-kidney microsomal antibodies, LC1= antibody to liver cytosol, SLA/LP= anti-soluble liver antigen/liver-pancreas antibodies, ASGPR= autoantibodies to asialoglycoprotein receptor, AIH= autoimmune hepatitis, PBC= primary billiary cirrhosis, PSC=primary sclerosing cholangitis.	

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Ορισμοί ανταπόκρισης στη θεραπεία

ΑΠΑΝΤΗΣΗ	ΟΡΙΣΜΟΣ	
Πλήρης	Ένα ή και τα δύο από τα παρακάτω: αξιοσημείωτη βελτίωση των συμπτωμάτων και επαναφορά των τιμών των AST ή ALT, χολερυθρίνης και ανοσοσφαιρινών στον ορό σε απολύτως φυσιολογικά επίπεδα μέσα σε ένα χρόνο και η παραμονή σε αυτά τουλάχιστον για 6 επιπλέον μήνες ενώ ο ασθενής βρίσκεται σε θεραπεία συντήρησης, ή βιοψία ήπατος που καταδεικνύει ελάχιστη ενεργότητα στα περισσότερα σημεία	ή
		Ένα ή και τα δύο από τα παρακάτω: αξιοσημείωτη βελτίωση των συμπτωμάτων με τουλάχιστον 50% πτώση όλων των τιμών των ηπατικών εργαστηριακών εξετάσεων με τα επίπεδα των AST ή ALT να συνεχίζουν να πέφτουν κάτω από το διπλάσιο του ανώτερου φυσιολογικού ορίου μέσα σε έξι μήνες, και κατά την προσπάθεια οδήγησης της θεραπείας σε δόσεις συντήρησης ή ηπατική βιοψία μέσα σε 1 έτος που καταδεικνύει μόνο ελάχιστη ενεργότητα.
Υποτροπή	Ένα ή και τα δύο από τα παρακάτω: αύξηση της AST ή ALT του ορού σε επίπεδα μεγαλύτερα του διπλάσιου του ανώτερου φυσιολογικού ή ηπατική βιοψία που να καταδεικνύει ενεργή νόσο, με ή χωρίς επανεμφάνιση των συμπτωμάτων, μετά από πλήρη ανταπόκριση όπως ορίστηκε παραπάνω.	ή
		Επανεμφάνιση συμπτωμάτων, μετά από πλήρη ανταπόκριση όπως ορίστηκε παραπάνω, τόσο σοβαρών ώστε να χρειαστεί αύξηση της ήδη χορηγούμενης (ή επαναχορήγησης) ανοσοκαταστολής συνοδευόμενη από οποιαδήποτε αύξηση της AST ή της ALT .

ΠΙΝΑΚΑΣ 4 Απλοποιημένα διαγνωστικά κριτήρια για την AIH

Παράμετρος	Τιμή	Βαθμοί
Τίτλος ANA ή SMA	$\geq 1:40$	1
Τίτλος ANA ή SMA	$\geq 1:80$	2
ή LKM	$\geq 1:40$	2
ή SLA	θετικά	2
IgG	> Ανώτερο φυσιολογικό	1
IgG	>1.10 X ανώτερο φυσιολογικό	2
Ιστολογική εικόνα (η παρουσία ηπατίτιδας είναι αναγκαία)	Συμβατή με AIH	1
	Τυπική AIH	2
Απουσία ιογενούς ηπατίτιδας	Ναι	2
Σύνολο		≥ 6 Πιθανή AIH
		≥ 7 βέβαιη AIH

Ανάλογα με τα αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται η AIH ταξινομείται σε δύο κύριους τύπους: AIH τύπου 1 (AIH-1) και τύπου 2 (AIH-2). Η AIH-1 χαρακτηρίζεται από την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων έναντι λείων μυϊκών ινών (SMA) και/ή αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA). Σε ασθενείς που τα παραπάνω είναι αρνητικά, ο προσδιορισμός αντισωμάτων έναντι κυτταροπλάσματος ουδετερόφιλων (ANCA), αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα ασιαλογλυκοπρωτεΐνης (anti-ASGP-R) και αντισωμάτων έναντι διαλυτών αντιγόνων ήπατος/ήπατος-παγκρέατος (anti-SLA/LP) μπορεί να είναι χρήσιμος. Η AIH-2 χαρακτηρίζεται από την παρουσία ειδικών αυτοαντισωμάτων έναντι ηπατικών και νεφρικών μικροσωμίων (anti-LKM τύπου 1 ή σπανιότερα anti-LKM τύπου 3) ή/και αυτοαντισωμάτων έναντι κυτοσολίων ήπατος 1 (anti-LC1) (285). Τα αυτοαντισώματα anti-LKM-1 και

anti-LKM-3 ανιχνεύονται και σε ορισμένους ασθενείς με χρόνια HCV και HDV λοίμωξη. Το κυττόχρωμα P450 2D6 (CYP2D6) έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί το κύριο αυτοαντιγόνο –στόχο των anti-LKM-1 αυτοαντισωμάτων, στην AIH-2 αλλά και στην HCV λοίμωξη (286,287). Η οικογένεια 1 των UDP-γλυκουρονοσυλτρανφερασών έχει ταυτοποιηθεί ως το αυτοαντιγόνο-στόχος των anti-LKM-3 (288,289). Μία πρωτεΐνη βάρους 50 kDa σχετιζόμενη με κατασταλτικό UGA tRNA βρέθηκε ότι αποτελεί τον στόχο του anti-SLA/LP (290,291), ενώ ένα ειδικό για το ήπαρ ένζυμο, η φορμιννοτρανσφεράση διαμινάση αποτελεί τον στόχο των anti-LC1 (292). Η AIH μπορεί να αποτελεί και μέρος ενός σπάνιου γενετικού συνδρόμου, που ονομάζεται APECED (σύνδρομο αυτοάνοσης πολυενδοκρινοπάθειας-καντιντίας, εκτοδερμικής δυστροφίας). Τα αυτοαντισώματα που παρατηρούνται σε αυτή την περίπτωση στρέφονται εναντίον ηπατικών μικροσωμίων (anti-LM) και ως στόχος θεωρείται το κυττόχρωμα P450 1A2 (293,294). Περίπου το 20% των ασθενών, δεν εμφανίζουν αρχικά καθόλου αυτοαντισώματα, παρά μόνο αυξημένη ανοσοσφαιρίνη (IgG) και αυτά παρουσιάζονται αργότερα (295,296). Η AIH προκαλείται, πιθανώς, από δυσλειτουργία των ανοσορυθμιστικών μηχανισμών και την εμφάνιση αυτοαντιδραστικών Τ λεμφοκυττάρων που προκαλούν καταστροφή των ηπατοκυττάρων, κατάσταση που αν παραμείνει χωρίς θεραπεία, οδηγεί σε ηπατική ανεπάρκεια. Στην ανοσοπαθογένεση εμπλέκονται τα CD4⁺, CD8⁺ Τ κύτταρα αλλά και τα NK , γδ Τ και τα μακροφάγα (297).

Η τυπική ιστολογική εικόνα της AIH περιλαμβάνει πλασματοκυτταρική διήθηση στις πυλαίες και περιπυλαίες περιοχές, αλλά η απουσία της δεν αποκλείει τη νόσο. Άλλο ένα βασικό διαγνωστικό χαρακτηριστικό είναι η περιπυλαία ή διαβρωτική (interface) ηπατίτιδα και ο σχηματισμός ροζετών. Αυτές οι αλλαγές οδηγούν στην ανάπτυξη περιπυλαίας ίνωσης, αρχικά με τη μορφή λεπτών ινών κολλαγόνου που παγιδεύουν ομάδες ηπατοκυττάρων οι οποίες στη συνέχεια σχηματίζουν ευρύτερα ινώδη διαφράγματα, οπότε παρατηρείται γεφυροποίηση και σχηματισμός όζων. Όταν η κίρρωση συμβεί, συχνά η φλεγμονώδης δραστηριότητα μειώνεται και διαφοροδιάγνωση από άλλες νόσους είναι δύσκολη. Νεκροφλεγμονώδης δραστηριότητα παρατηρείται συχνά. Αυτή κυμαίνεται από ήπια σημειακή φλεγμονή με σχηματισμό οξεόφιλων σωματίων ως τη γεφυροποιό νέκρωση. Η ηπατική

βιοψία παίζει σημαντικό ρόλο στην εδραίωση της διάγνωσης, τόσο με την ανεύρεση των τυπικών ιστοπαθολογικών ευρημάτων της νόσου, όσο και με την απουσία ενδείξεων στεάτωσης ή συμμετοχής των χοληφόρων, που υποδεικνύουν μια άλλη διάγνωση (283,284,298). Η ΑΙΗ συνήθως απαντά στην ανοσοκαταστολή και ιστορικά υπήρξε η πρώτη χρόνια ηπατοπάθεια με σημαντική βελτίωση στην επιβίωση των ασθενών μετά τη θεραπεία. Κλασσική θεωρείται η αγωγή με αζαθειοπρίνη και κορτιζόνη, ενώ πρόσφατα έχουν προταθεί και εναλλακτικά σχήματα, όπως η μυκοφαινόλη, με τα οποία φαίνεται να πετυχαίνεται υψηλό ποσοστό ανταπόκρισης με ελαχιστοποίηση των παρενεργειών (299).

4.1β. ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΑΙΗ

Το RA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των λειτουργιών διαφόρων κυττάρων του ανοσοποιητικού. Για παράδειγμα, αποτρέπει τον επαγόμενο από ενεργοποίηση θάνατο των T κυττάρων και εμποδίζει την Th1 απόκριση ενώ ενισχύει την Th2 (300). Σε ζωικά πειραματικά μοντέλα, το RA *in vivo* καταστέλλει φλεγμονώδεις απαντήσεις και ιστική βλάβη, βελτιώνοντας πληθώρα πειραματικών αυτοάνοσων νοσημάτων. Μέχρι πρόσφατα, η ευεργετική δράση του RA στα νοσήματα αυτά, αποδιδόταν στην καταστολή της Th1 απόκρισης. Ωστόσο, η ανακάλυψη ότι το RA που παράγεται από τα DC του λεπτού εντέρου επάγει κατά προτίμηση τα iTreg κύτταρα αλλά καταστέλλει την Th17 διαφοροποίηση ενδεχομένως υποδεικνύει τον τρόπο δράσης του RA ως ανοσοκατασταλτικού *in vivo* (44). Επηρεάζοντας τμήματα των σηματοδοτικών δρόμων TGF- β (ενίσχυση), IL-6/IL-21/ IL-23 (καταστολή), που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των Th17 και Tregs κυττάρων, το RA *in vitro*, ενισχύει την παραγωγή των δεύτερων. *In vivo* όμως, αν και επιβεβαιώθηκε η καταστολή της Th17 αντίδρασης, η συχνότητα των Tregs κυττάρων σε αυτοάνοσα πειραματικά μοντέλα δεν αυξάνεται σημαντικά, πιθανότατα λόγω της συνεχιζόμενης φλεγμονής (301). Όπως προαναφέρθηκε, η καταστολή του ROR- γ από το RA παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην καταστολή της Th17 απόκρισης (40,41).

Στην παθογένεση της ΑΙΗ συμβάλλει και η ισορροπία Tregs/Th17. Τα Tregs έχει βρεθεί πως σε ασθενείς με ΑΙΗ είναι λιγότερα και λειτουργικά

επηρεασμένα, ενώ αυξάνονται κατά την ύφεση της νόσου ή την ανοσοκαταστολή. Επίσης έχει παρατηρηθεί πως υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ Tregs και χαρακτηριστικών της νόσου όπως τα αυτοαντισώματα anti-LKM-1 anti-SLA/LP (302-304). Αντίστοιχα, η συχνότητα των Th17 κυττάρων βρέθηκε αυξημένη στους ασθενείς με AIH (305).

Έχει δειχθεί πως η κατασταλτική δράση των ρετινοειδών στην Th17 διαφοροποίηση εξαρτάται και από τον RAR-α (306,307). Θεωρητικά, ρετινοειδή με υψηλή συνάφεια προς αυτόν, θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ισορροπία Tregs/Th17. Ωστόσο, κατά την εκδήλωση της νόσου, η ενεργοποίηση και η διαφοροποίηση των T κυττάρων έχει ήδη συντελεσθεί, και μάλιστα σε περιβάλλον πλούσιο σε ρετινοειδή. Σε ήδη διαφοροποιημένα Th17 κύτταρα πάντως *in vitro*, η προσθήκη συνθετικού ρετινοειδούς προκάλεσε καταστολή του πολλαπλασιασμού τους (308), κάτι που επετεύχθη και *in vivo* στην πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (301). Όμως τα Tregs δεν φαίνεται να επηρεάζονται, πιθανότατα λόγω της δράσης των υπόλοιπων κυτταροκινών, όπως η IL-1, η IL-6 και ο TNF-α (308).

Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως, *in vitro*, αλλά και *in vivo* σε πειραματικό μοντέλο εγκεφαλομυελίτιδας καταδεικνύεται ο ρόλος του LXR στη ρύθμιση και διαφοροποίηση των T κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, ο επαγόμενος από τον LXR, Srebp-1 αναστέλλει τη μεταγραφή της IL-17, προσδεδεμένος στον προωθητή της, μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα (aryl hydrocarbon receptor - Ahr) που γνωρίζουμε πως ευοδώνει την Th17 απόκριση (309,310). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η πρώτη μελέτη που αφορά αναστολέα των RORα και RORγ υποδοχέα που είχε την κωδική ονομασία SR1001. Η προσθήκη του σε κυτταρικές σειρές και η χορήγηση του σε αρουραίους με πειραματική εγκεφαλομυελίτιδα έδειξε σχετική ύφεση της Th17 αντίδρασης και κλινική βελτίωση αντίστοιχα (311,312).

Ωστόσο, ο SR1001 δεν ήταν τόσο αποτελεσματικός όσο το πρόδρομο μόριο του που είχε την κωδική ονομασία T09 και δεν παρουσίαζε μόνο ανασταλτική δράση στους ROR υποδοχείς, αλλά ήταν και LXR αγωνιστής. Προφανώς, η δράση στον LXR είναι αναγκαία για την επίτευξη του επιθυμητού αποτελέσματος (310,313). Πέρα από την καταστολή της Th17 αντίδρασης, ο T09 αναστέλλει τη λειτουργία και τη διαφοροποίηση όλων των CD4+ κυτταρικών σειρών περιλαμβανόμενων των Th1, Th2, iTreg, μειώνει τον

πολλαπλασιασμό των CD4+ κυττάρων και οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Η παράλληλη προσθήκη ενός LXR ανταγωνιστή προκάλεσε αποφυγή του κυτταρικού θανάτου χωρίς να επηρεάσει την Th17 καταστολή. Το γεγονός πως η μέγιστη καταστολή και η καλύτερη πορεία της πειραματικής νόσου επετεύχθη με τη συνδυασμένη δράση του T09 στους ROR και LXR, η οποία επηρεάζει εκτός από την Th17 και την Th1 απόκριση, μας δείχνει πως και αυτή συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της νόσου, και η καταστολή της υπέρμετρης έκφρασής της είναι επιθυμητή (310,313,314). Όμως, η επαγωγή του LXR επηρεάζει το μεταβολισμό λιπαρών οξέων και υδατανθράκων, προκαλώντας έντονη λιπογένεση και αυξάνει τα τριγλυκερίδια στο ήπαρ και τον ορό, γεγονός που οδηγεί σε λιπώδες ήπαρ (315-317). Οι παραπάνω παρενέργειες, σε συνδυασμό με την υπερβολική ανοσοκαταστολή και το ενδεχόμενο επαγωγής κυτταρικού θανάτου, καθιστούν το μόριο T09 ακατάλληλο για χρήση, δείχνουν όμως πως η διατήρηση καταστολής στους ROR υποδοχείς σε συνδυασμό με μία ήπια LXR διέγερση μπορεί να έχει το προσδοκώμενο αποτέλεσμα, με ελάχιστες παρενέργειες (314).

4.2 ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ (PBC)

4.2α. Στοιχεία επιδημιολογίας και παθοφυσιολογίας

Η PBC είναι μια αυτοάνοση χολοστατική νόσος που προσβάλλει κυρίως μεσήλικες γυναίκες και χαρακτηρίζεται από προοδευτική καταστροφή των μικρών χοληφόρων με πυλαία φλεγμονή και τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη κίρρωσης και ηπατικής ανεπάρκειας (281,318). Τα αντισώματα έναντι μιτοχονδριακών αντιγόνων (AMA) αποτελούν το χαρακτηριστικότερο ορολογικό εύρημα της νόσου, αν και διάφορα άλλα αυτοαντισώματα, ειδικά ή όχι της νόσου, ανιχνεύονται συχνά. Μία πληθώρα αυτοάνοσων ή ανοσολογικά επαγόμενων εξωηπατικών καταστάσεων συνοδεύουν πολλές φορές τη νόσο, όπως το σύνδρομο Sjogren, η θυροειδίτιδα Hashimoto, η πορφύρα Henoch-Schonlein, το σκληρόδερμα, το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και πιο σπάνια το οζώδες ερύθημα (318-320).

Η αυξανόμενη διαθεσιμότητα των εργαστηριακών εξετάσεων αλλά και η αυξημένη υποψία από την πλευρά των κλινικών γιατρών, έχουν οδηγήσει στη

συχνότερη και εγκαίρως διάγνωση της νόσου, ώστε σε πολλές μελέτες περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς κατά την πρώτη προσέλευση στον ειδικό να είναι ασυμπτωματικοί (321). Συνήθως σε τυχαίο προληπτικό εργαστηριακό έλεγχο παρατηρείται αυξημένη αλκαλική φωσφατάση, γ-GT και ολική χοληστερόλη ορού και εφόσον τα ευρήματα αυτά παραμείνουν για 6 μήνες, ανιχνευθούν AMA σε υψηλούς τίτλους και δεν υπάρχει άλλη εξήγηση, τίθεται η διάγνωση (322). Η χοληστερόλη ορού είναι συχνά αυξημένη, λόγω της παρουσίας του LpX, ενός μη φυσιολογικού λιποσωματιδίου χαρακτηριστικού για τα χολοστατικά νοσήματα που προέρχεται από τα χολικά λιπίδια που παλινδρομούν στο αίμα. Κατατάσσεται στις λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας αλλά διαφέρει από τις υπόλοιπες. Σε αντίθεση με τις φυσιολογικές που έχουν πυρήνα γεμάτο με ουδέτερα λιπίδια, το LpX αποτελείται από λιποσώματα με υδατώδες περίβλημα που περιέχουν φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη. Δεν προσλαμβάνεται στις αθηροσκληρωτικές πλάκες και είναι δυνατόν να μειώσει την αθηρογενετικότητα της LDL χοληστερόλης προλαμβάνοντας την οξείδωσή της. Επομένως η αυξημένη χοληστερόλη ορού σε αυτούς τους ασθενείς δεν συνιστά καρδιαγγειακό παράγοντα κινδύνου, μειώνεται όμως και με τη χρήση στατινών και μετά από χρόνια θεραπεία με ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UDCA). Μετά από πολλά χρόνια νόσου παρατηρούνται ξανθώματα και ξανθελάσματα (323,324).

Τα AMA είναι παθογνωμονικά για την PBC και οδηγούν στη διάγνωση με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Τα AMA στρέφονται εναντίον τμημάτων των μιτοχονδριακών πολυενζυμικών συμπλεγμάτων της 2-οξοξικής αφυδρογονάσης (M2) (325). Οι ασθενείς με θετικά AMA > 1:40 είναι πολύ πιθανό να αναπτύξουν τη νόσο, ακόμη και αν δεν υπάρχουν ταυτόχρονες εργαστηριακές ενδείξεις χολόστασης και/ή φλεγμονής (326), ενώ είναι εξαιρετικά πιθανό να εμφανίζουν παθολογικά ευρήματα στη βιοψία (327). Όταν τα ανιχνευθέντα AMA ανήκουν στην υποτάξη IgG3 υπάρχει συσχέτιση με πιο σοβαρή πορεία της νόσου (328). Καθώς στον ορό του 5% των ασθενών με τυπική κατά τα άλλα PBC δεν βρίσκονται AMA (327), για την επιβεβαίωση της διάγνωσης, πέρα από την ηπατική βιοψία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα αυτοαντισώματα που εμφανίζονται σπανιότερα, αλλά με εξίσου μεγάλη ευαισθησία. Τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) που στον

έμμεσο ανοσοφθορισμό παρουσιάζουν πρότυπο 6-12 κηλίδων στον πυρήνα (multiple nuclear dots, MND) και στρέφονται κατά των πυρηνικών πρωτεϊνών sp100 και PML και αυτά που μοιάζουν με περιπυρηνική στεφάνη/μεμβράνη (rim like/membranous, RLM) και στρέφονται έναντι τμήματος της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης gp210, όχι μόνο έχουν υψηλή ειδικότητα, αλλά και κλινική αξία καθώς η ανίχνευση του IgG3 ισότυπου συσχετίζεται με σοβαρότερη πορεία της νόσου (329).

Αν και δεν θεωρείται υποχρεωτική για τη διάγνωση της νόσου σε ασθενείς με θετικά AMA και ορολογικούς δείκτες χολόστασης, η ηπατική βιοψία μπορεί να εκτιμήσει το στάδιο και την ενεργότητα της νόσου. Αξιολογώντας το βαθμό περιπυλαίας φλεγμονής, βλάβης και υπερπλασίας των χοληφόρων και την παρουσία ίνωσης και κίρρωσης οι Ludwig et al. το 1978 και Scheuer το 1983 κατηγοριοποίησαν τα ευρήματα σε 4 στάδια. Στο στάδιο 1 η νόσος χαρακτηρίζεται από πυλαία φλεγμονή με κοκκιωματώδη καταστροφή των χοληφόρων πόρων, αν και κοκκιώματα δεν είναι συχνά ορατά. Στο στάδιο 2 παρατηρείται περιπυλαία ηπατίτις και υπερπλασία των πόρων. Παρουσία ινωδών διαφραγμάτων ή γεφυροποιός νέκρωση χαρακτηρίζεται ως στάδιο 3 και η κίρρωση ως στάδιο 4. Ευρήματα ίνωσης ή κίρρωσης (στάδιο 3 ή 4) συσχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση. Τυπικό ιστολογικό εύρημα της νόσου αποτελούν αλλοιώσεις ομοιάζουσες με άνθος (florid duct lesions) στις οποίες παρατηρείται εστιακή απόφραξη του πόρου και σχηματισμός κοκκιώματος. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ιστολογική εικόνα σε όλο το ήπαρ δεν είναι ομοιογενής, καθώς ακόμα και σε ένα τεμάχιο βιοψίας μπορεί να βρεθούν αλλοιώσεις που αντιστοιχούν και στα 4 στάδια (330).

Κατά τη διάγνωση, η πλειοψηφία των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί και προσέρχονται για βοήθεια λόγω παθολογικών εργαστηριακών ευρημάτων. Στους υπόλοιπους, ο κνησμός (19%) και η κόπωση (21%) αποτελούν τις συχνότερες ενοχλήσεις, ενώ ορισμένοι (10%) αναφέρουν αίσθημα δυσφορίας στο δεξιό άνω τεταρτημόριο της κοιλίας. Οι περισσότεροι ασυμπτωματικοί ασθενείς, ειδικά αν δεν λάβουν θεραπεία, θα αναπτύξουν τα συμπτώματα αυτά σε 2-4 έτη, αν και περίπου το 1/3 παραμένει χωρίς συμπτώματα για πολλά χρόνια. Εκτός του κνησμού και της κόπωσης οι ασθενείς παρουσιάζουν συχνά, λόγω ανεπαρκούς έκκρισης χολικών αλάτων, δυσσαπορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών A, D, E και K σε προχωρημένο

στάδιο της νόσου. Αν και ο μεταβολισμός της βιταμίνης D είναι φυσιολογικός, η δυσσπορρόφησή της σε συνδυασμό με αυτή του ασβεστίου αλλά και τη μειωμένη οστεοβλαστική και οστεοκλαστική δραστηριότητα, ενδέχεται να ευθύνονται για τον αυξημένο κίνδυνο οστεοπόρωσης που παρατηρείται στους ασθενείς με PBC (331).

Ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός της PBC παραμένει άγνωστος, αλλά τα πειραματικά δεδομένα συγκλίνουν στην πυροδότηση του από περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά σε γενετικά προδιατεθειμένο άτομο (332). Υπέρ του γενετικού υπόβαθρου της νόσου συνηγορούν η μεγάλη σειρά νοσούντων ομοζυγωτικών διδύμων, η συχνή εμφάνιση συγκεκριμένων HLA αλληλίων, και παραλλαγές στον ανταλλαγή ανιόντων 2 (AE2) και τον TNFα. Ως εξωγενείς παράγοντες θεωρούνται ξενοβιοτικά που μπορούν να οδηγήσουν στην τροποποίηση πρωτεϊνών των θηλαστικών και στη δημιουργία νεοαντιγόνων και διάφοροι λοιμώδεις παράγοντες που έχουν συσχετισθεί με τη νόσο. Ωστόσο, υπάρχουν και γεγονότα που θέτουν υπό αμφισβήτηση την ύπαρξη ενός κοινού μηχανισμού για όλους τους ασθενείς. Το βασικότερο είναι ότι ούτε όλοι οι AMA-θετικοί ασθενείς αναπτύσσουν τη νόσο, ούτε όλοι όσοι νοσούν είναι AMA-θετικοί. Το 1/3 των ασθενών δεν απαντά στη θεραπεία με UDCA ενώ η πορεία της νόσου διαφέρει σημαντικά (331). Ο Jones (332) πρότεινε ένα μοντέλο ανάπτυξης της νόσου διαχωρίζοντας “upstream” από “downstream” γεγονότα. Ως “Upstream” αναφέρονται οι αρχικές αιτίες απώλειας των επιθηλιακών χοληφόρων κυττάρων, η ένδεια χοληφόρων πόρων και η χολόσταση που παρατηρούνται αποκλειστικά στην PBC (και ενδεχομένως είναι μοναδικά για τον κάθε ασθενή) περιλαμβανομένων γενετικών, λοιμωδών, τοξικών και ανοσολογικών παραγόντων. “Downstream” χαρακτηρίζονται τα επερχόμενα μη ειδικά παθολογικά γεγονότα που επιφέρουν τη βλάβη των χοληφόρων πόρων, τη βλάβη των ηπατοκυττάρων τη φλεγμονή και την ίνωση, ανεξάρτητα από την αιτία. Η κατακράτηση των υδρόφοβων χολικών αλάτων επιδεινώνει την υποκείμενη βλάβη (333).

Αυτό το μοντέλο εξηγεί την περιορισμένη αποτελεσματικότητα των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων καθώς στις περισσότερες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου όπου τα μη ειδικά γεγονότα κυριαρχούν. Φαίνεται ότι πρωταρχικό ρόλο παίζει η αυτοάνοση

επίθεση έναντι επιτόπων όπως ο PDC-E2. Οι παρακάτω παράγοντες συμβάλλουν στη ρήξη της ανοσολογικής ανοχής: Υπάρχουν στοιχεία ικανά να στηρίξουν μηχανισμούς διασταυρούμενης αντίδρασης μεταξύ του συμπαράγοντα του PDC-E2 λιποϊκού οξέος και περιβαλλοντικών ξενοβιοτικών που οδηγούν στην τροποποίηση του και σε διασταυρούμενη απάντηση από τα B- κύτταρα. Αυτή προκαλεί ρήξη της ανοχής των T-κυττάρων και καταστροφή των επιθηλιακών χοληφόρων κυττάρων. Εναλλακτικά ή επιπρόσθετα, μηχανισμοί μοριακής μίμησης με βακτήρια ή ιούς μπορεί να επάγουν ή να ενισχύουν τη ρήξη. Επίσης, τα περισσότερα στοιχεία που αφορούν γενετικές συσχετίσεις, αναφέρονται σε γονίδια ή επιτόπους σχετιζόμενους με τη λειτουργία του ανοσοποιητικού. Αλλοιωμένη ρύθμιση της ανοσολογικής ανοχής μπορεί να προκαλέσει ανοσολογική απόκριση έναντι του PDC-E2, είτε εκφράζεται φυσιολογικά είτε όχι από τα χολαγγειοκύτταρα. Απόπτωση ή βλάβη των χολαγγειοκυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε παρουσίαση αυτοαντιγόνων ή στη δημιουργία φλεγμονώδους περιβάλλοντος επιφέροντας δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού. Ο πιθανότερος μηχανισμός γι' αυτό είναι το μεταβολικό-οξειδωτικό stress που πυροδοτείται από τη δυσλειτουργία μεταφορέων που εμπλέκονται στην κυτταρική συντήρηση, όπως ο AE2 (334), καθώς έχει βρεθεί ότι η μορφολογία του αποτελεί ισχυρό και ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την απάντηση στη θεραπεία με UDCA (335). Οι μηχανισμοί αυτοί μπορεί να λειτουργούν διαδοχικά ή ταυτόχρονα αλλά σε διαφορετικό βαθμό έχουν ως αποτέλεσμα την ανοσοεξαρτώμενη ηπατική βλάβη. Όταν η αυτοάνοση αντίδραση ξεκινήσει, εγκαθίστανται διάφοροι φαύλοι ανοσολογικοί κύκλοι που οδηγούν σε μεγαλύτερη χολαγγειοκυτταρική βλάβη, απόπτωση, αυξημένη παρουσίαση αλλοιωμένων αντιγόνων και παραπέρα αύξηση της αυτοαντιδραστικότητας (336,337).

Το UDCA αποτελεί τη μόνη εγκεκριμένη από το FDA θεραπεία της PBC, καθώς βελτιώνει βιοχημικούς δείκτες όπως η χολερυθρίνη, η αλκαλική φωσφατάση, η γGT, και η χοληστερόλη (338-340). Μπορεί να επιβραδύνει την ιστολογική έλευση της κίρρωσης και να βελτιώσει την ποιότητα ζωής, να παρατείνει το χρόνο επιβίωσης και το χρονικό διάστημα στο οποίο θα απαιτηθεί μεταμόσχευση (338,341,342). Είναι ασφαλές και με ελάχιστες παρενέργειες, όμως οι μηχανισμοί δράσης παραμένουν άγνωστοι και στο 1/3

των ασθενών η νόσος ελέγχεται ανεπαρκώς, γεγονός που καθιστά αναγκαία την αναζήτηση επιπρόσθετων λύσεων (343,344). Απάντηση στη θεραπεία θεωρείται η πτώση της ALP στο 40% των προ της αγωγής επιπέδων ή η ομαλοποίηση της, μετά από ένα έτος θεραπείας (κριτήρια Βαρκελώνης) (343) ή αν η χολερυθρίνη ορού $<1 \text{ mg/dl}$, $\text{ALP} \leq 3 \times \text{ανώτερης φυσιολογικής τιμής}$ και $\text{AST} \leq 2 \times \text{ανώτερης φυσιολογικής τιμής}$ μετά από 1 έτος υπό UDCA (κριτήρια Παρισιού) (344).

4.2β. ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ PBC

Η βιταμίνη Α ενδέχεται να συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της PBC. Σε μία μελέτη βρέθηκε πως στο ήπαρ αυτών των ασθενών τα ρετινοειδή παρουσιάζονται αυξημένα, αν και στον ορό είναι μειωμένα. Η μείωση αυτή δεν οφείλεται (ειδικά στα αρχικά στάδια) σε δυσαπορρόφηση αλλά σε ανεπαρκή κινητοποίηση τους από το ήπαρ, λόγω της αναστολής που προκαλούν τα αυξημένα ηπατικά ρετινοειδή στην ηπατική έκκριση της RBP. Η χολόσταση στην PBC προκαλεί την παλινδρόμηση των μεταβολιτών των ρετινοειδών (ρετινουλ-β-γλυκουρονίδιο ρετινικό οξύ ρετινοταυρίνη) στα ηπατοκύτταρα προκαλώντας τοξικά φαινόμενα. Πολλά από τα συμπτώματα που χαρακτηρίζουν την υπερβιταμίνωση Α παρατηρούνται στους ασθενείς. Ο κνησμός, το αίσθημα κόπωσης καθώς και η ξηροφθαλμία, η ξηροστομία η οστεοπόρωση και οι αρθραλγίες χαρακτηρίζουν και τις δύο καταστάσεις ενώ παρατηρούνται και ομοιότητες όσον αφορά ο εργαστηριακό προφίλ των ασθενών αυτών. Έτσι δημιουργούνται υπόνοιες για τον πιθανό ρόλο της ενδογενούς τοξικότητας των ρετινοειδών στην παθοφυσιολογία της PBC (345).

Στο ήπαρ, Th17 κύτταρα είναι παρόντα σε ορισμένες περιπτώσεις χρόνιας ηπατίτιδας C ενώ στην PBC συναθροίζονται γύρω από τα χοληφόρα. Συσχετίζονται επίσης με την παρουσία περιπυλαίας ηπατίτιδας. Οι Th17 συσχετιζόμενες κυταρροκίνες παρατηρούνται αυξημένες γύρω από τα χοληφόρα στην PBC και ενδεχομένως εμπλέκονται στην ιστοπαθολογία της (346). Σε καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων, βακτηριακά PAMPs προκαλούν την παραγωγή κυταροκινών απαραίτητων για την επαγωγή της Th17 διαφοροποίησης (IL-6 και IL-1β) αλλά και για τη διατήρησή της (IL-23) (347).

Στο περιφερικό αίμα των ασθενών με PBC τα Th17 κύτταρα βρέθηκαν επίσης αυξημένα, ενώ το ίδιο ισχύει τόσο για τη συγκέντρωση, όσο και για τη γονιδιακή έκφραση των κυτταροκινών IL-17, IL-1B, IL-6 και IL-23 (348). Αύξηση υπάρχει και στον αριθμό των IL-17-θετικών κυττάρων στο ήπαρ ασθενών με PBC, αλλά και σε πειραματικό μοντέλο αρουραίων με ανεπάρκεια υποδοχέων IL-2 (305,346).

Αντίστοιχα, ο αριθμός των Tregs σε ασθενείς με PBC είναι μειωμένος, χωρίς να υπάρχει συσχέτιση με το στάδιο της νόσου, την παρουσία AMA και τα επίπεδα της IgM. Μάλιστα μετά από θεραπεία με UDCA για ένα χρόνο, τα Tregs στον ορό αυξήθηκαν, γεγονός που καταδεικνύει πως η ανεπάρκεια τους μπορεί να συμμετέχει στην παθογένεση της νόσου (349,350). Αυτό άλλωστε αποδεικνύεται και σε αρουραίους με ανεπάρκεια υποδοχέων IL-2 που παρουσιάζουν κλινικές εκδηλώσεις παρόμοιες με την PBC, αλλά και σε άτομο που γεννήθηκε με τη συγκεκριμένη διαταραχή (351,352).

Οι PPAR-γ υποδοχείς παίζουν ρόλο στη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής στα χοληφόρα, καθώς εξουδετερώνουν τα σήματα που μπορούν να προκαλέσουν αυτοάνοσες αντιδράσεις αναστέλλοντας την έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο TNF-α. Ενδεχομένως, η χρήση PPAR-γ αγωνιστών θα μπορούσε να βοηθήσει προς αυτή την κατεύθυνση (346,347,353).

4.3. ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΤΙΚΗ ΧΟΛΑΓΓΕΙΙΤΙΔΑ (PSC)

4.3α. Στοιχεία επιδημιολογίας και παθοφυσιολογίας

Πρόκειται για χρόνια χολοστατικό νόσημα που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και ίνωση και των ενδοηπατικών και των εξωηπατικών χοληφόρων που οδηγεί στην ανάπτυξη πολυεστιακών στενώσεων, σε χολόσταση, χολαγγειίτιδα και κίρρωση (354,355). Εκτός από την ηπατική νόσο, περίπου το 75% των ασθενών με PSC έχει ιστορικό ή πάσχει από ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (inflammatory bowel disease -IBD) (355,356). Όμως, αν και στην επίπτωση της IBD οι γυναίκες εμφανίζουν μια σχετική υπεροχή, στην PSC η αναλογία ανδρών/γυναικών είναι 2 προς 1. Αν και η νόσος πλήττει παιδιά και νεαρούς ενήλικες, συνήθως εμφανίζεται στην τέταρτη δεκαετία της ζωής του ασθενούς (257). Ωστόσο παρατηρούνται

διαφορές από χώρα σε χώρα στη συσχέτιση ανδρών/γυναικών, τη συνύπαρξη με την IBD, την ηλικία έναρξης και την επίπτωση της νόσου στο γενικό πληθυσμό (358).

Πρόκειται για ανοσολογικά επαγόμενη προοδευτική διαταραχή, που τελικά εξελίσσεται σε κίρρωση, στην πλειοψηφία των ασθενών. Η PSC των μικρών πόρων, αποτελεί παραλλαγή που χαρακτηρίζεται από τα ίδια ιστολογικά χαρακτηριστικά αλλά από φυσιολογικούς χοληδόχους πόρους στη χολαγγειογραφία. Αντίθετα, η δευτεροπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (SSC) έχει αναγνωρισμένες αιτίες όπως η μακροχρόνια απόφραξη των χοληφόρων, η λοίμωξη και η φλεγμονή που με τη σειρά της οδηγεί σε καταστροφή των χοληδόχων πόρων και δευτεροπαθή χολική κίρρωση. Πιθανότατα, η IgG4-θετική σκληρυντική χολαγγειίτιδα αποτελεί ξεχωριστό νόσημα (359,360). Η διάγνωση τίθεται σε ασθενείς με χολοστατικό βιοχημικό προφίλ και χαρακτηριστικά ευρήματα από τη χολαγγειογραφία (ανάστροφη ενδοσκοπική, μαγνητική ή διαδερμική διηπατική), δηλαδή αλλοιώσεις των χοληφόρων με πολυεστιακές στενώσεις και τμηματικές διατάσεις και αποκλεισμό των αιτίων δευτεροπαθούς νόσου. Ασθενείς με κλινικά, βιοχημικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά της νόσου αλλά φυσιολογική χολαγγειογραφία, χαρακτηρίζονται ως έχοντες νόσο των μικρών πόρων. Ο διαχωρισμός της PSC από την SSC δεν είναι πάντα εύκολος καθώς ασθενείς με PSC μπορεί να έχουν υποβληθεί σε επέμβαση στα χοληφόρα, να έχουν συνυπάρχουσα χοληδοχολιθίαση ή ακόμα και χολαγγειοκαρκίνωμα (CCA). Βοήθεια μπορεί να προσφέρει το ιστορικό, η κατανομή των χολαγγειογραφικών ευρημάτων και η συνύπαρξη IBD. Η κλινική εικόνα περιλαμβάνει δυσφορία στο άνω τεταρτημόριο της κοιλίας, κόπωση, κνησμό και απώλεια βάρους. Επεισόδια χολαγγειίτιδας με πυρετό και ρίγος αρχικά είναι πολύ σπάνια, εκτός και αν έχει προηγηθεί επέμβαση ή ERCP. Περίπου το 75% των ασθενών με PSC έχουν και IBD, συνήθως ελκώδη κολίτιδα (UC) (361). Εργαστηριακά, συνήθως παρατηρείται χολόσταση με αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης και των τρανσαμινασών, αν και φυσιολογικά επίπεδα δεν αποκλείουν τη διάγνωση. Η χολερυθρίνη συνήθως είναι φυσιολογική, ενώ η IgG στο 60% των ασθενών είναι αυξημένη, ως 1,5 φορές το ανώτερο επίπεδο του φυσιολογικού (360).

Άλλοτε άλλα αυτοαντισώματα ανευρίσκονται σε χαμηλούς τίτλους στον ορό των ασθενών, υποδεικνύοντας δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού, αλλά δεν

παίζουν ρόλο στη διάγνωση. Τα συχνότερα από αυτά είναι τα p-ANCA, τα οποία όμως είναι μη ειδικά αυτοαντισώματα. Η ηπατική βιοψία συνήθως δεν προσφέρει επιπλέον διαγνωστικές πληροφορίες, καθώς η συγκεντρική ίνωση πέριξ του πόρου (onion skin), αν και αποτελεί κλασσικό ιστοπαθολογικό εύρημα της νόσου, παρατηρείται και στην SSC, ενώ είναι δύσκολο και σπάνιο να βρεθεί σε τμήματα βιοψίας. Χαρακτηριστικό είναι ότι σε μία αναδρομική μελέτη 138 ασθενών, με χολαγγειογραφικά χαρακτηριστικά PSC η βιοψία δεν βοήθησε περισσότερο. Παραμένει όμως χρήσιμη όταν τίθεται υποψία νόσου μικρών χολαγγείων και στα σύνδρομα επικάλυψης (362).

Η IgG4 συσχετιζόμενη χολαγγειίτιδα σε συνύπαρξη συνήθως με αυτοάνοση παγκρεατίτιδα (AIP), αποτελεί κλινική οντότητα που χαρακτηρίζεται από στένωση του παγκρεατικού πόρου, εστιακή ή γενικευμένη διόγκωση του παγκρέατος, αύξηση των επιπέδων της IgG4, λεμφοπλάσματοκυτταρική διήθηση στη βιοψία και καλή απάντηση στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή (363). Όταν συνυπάρχουν και στενώσεις των εξωηπατικών χοληφόρων, παρόμοιες με την PSC τότε ονομάζεται AIP-PSC. Ορισμένες φορές όμως, παγκρεατικές ανωμαλίες δεν υπάρχουν, ενώ αυξημένες τιμές IgG και IgG4 παρατηρούνται σε ασθενείς με PSC οι οποίοι, αν και έχουν χειρότερο βιοχημικό προφίλ, πάσχουν λιγότερο συχνά από IBD. Ακόμη δεν έχει εξακριβωθεί αν πρόκειται για διαφορετικά νοσήματα ή για παραλλαγές του ίδιου, αν και το δεύτερο φαίνεται περισσότερο πιθανό (364,365).

Όσον αφορά στην παθοφυσιολογία της νόσου, φαίνεται, ότι πριν την ανάπτυξη της νόσου τα εντερικά λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται στον εντερικό λεμφικό ιστό και ωθούνται από τα δενδριτικά κύτταρα στην έκφραση των υποδοχέων $\alpha 4\beta 7$ και CCR9, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την επαφή αυτών των κυττάρων με τους υποδοχείς MAdCAM-1 και CCL25, αντίστοιχα. Φυσιολογικά η έκφραση αυτών των υποδοχέων περιορίζεται στο έντερο, αλλά στην PSC ο MAdCAM-1 βρίσκεται στο ενδοθήλιο της πυλαίας φλέβας και ο CCL25 στο περιπυλαίο κολποειδικό ενδοθήλιο. Αν και παραμένει αδιευκρίνιστη η πύλη εισόδου των λεμφοκυττάρων στο ήπαρ (πυλαία φλεβίδια, κολποειδή ή μετακολποειδικά τριχοειδή) η έκφραση των MAdCAM-1 και CCL25 οδηγεί στη συλλογή CD44+ $\alpha 4\beta 7$ + CCR9+ κυττάρων μνήμης από το έντερο. Οι μηχανισμοί έκφρασης των MAdCAM-1 και CCL25 στο ήπαρ είναι άγνωστοι, αλλά φαίνεται ότι είναι ειδικοί για τη νόσο, καθώς αυτή

υποτροπιάζει στο μόσχευμα. Η επαγωγή τους μπορεί να είναι απάντηση σε μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με παθογόνα (pathogen-associated molecular patterns *PAMPs*) που εισέρχονται από το έντερο στο ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας ή κολποειδών και συνδέονται στους Toll-like receptors (*TLRs*) μακροφάγων και δένδριτικών κυττάρων. Η ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών οδηγεί στην έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών που επάγουν την έκφραση των MAdCAM-1 στα ηπατικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Στη συνέχεια, υπό την επίδραση του (transforming growth factor- β *TGF- β*) τα $\alpha 4\beta 7+$ λεμφοκύτταρα μετατρέπονται σε $\alpha E\beta 7$ και προσκολλώνται στα χοληφόρα επιθηλιακά κύτταρα και ξεκινά η φλεγμονώδης διαδικασία, στην οποία όμως πολλά σημεία παραμένουν αδιευκρίνιστα, όπως το πώς έρχονται οι *TLRs* σε επαφή με τα *PAMPs*, καθώς αυτοί βρίσκονται στην κορυφαία μεμβράνη και θα μπορούσαν να συναντηθούν, θεωρητικά, μόνο σε περίπτωση ανιούσας χολαγγειίτιδας. Επίσης, αντισώματα έναντι των χολαγγειοκυττάρων έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με *PSC* και θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε συνάθροιση φλεγμονωδών κυττάρων (358,366,367).

PSC ΚΑΙ ΧΟΛΑΓΓΕΙΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ (CCA)

Οι κακοήθεις όγκοι των χολαγγείων και της χοληδόχου κύστης είναι συχνότεροι στους ασθενείς με *PSC* (368,369). Για τον λόγο αυτό, σε ασθενείς με απρόσμενες αλλαγές στην κλινική εικόνα ή στα εργαστηριακά ευρήματα θα πρέπει να μελετάται το ενδεχόμενο ύπαρξης *CCA*. Ο καλύτερα μελετημένος νεοπλασματικός δείκτης είναι το CA 19-9, το οποίο όμως αυξάνεται και στη βακτηριακή χολαγγειίτιδα, ενώ στο 7% του φυσιολογικού πληθυσμού, οι οποίοι είναι αρνητικοί στο αντιγόνο Lewis, δεν ανιχνεύεται καθόλου (370). Το *CCA* συχνά μιμείται τη στενωτική εικόνα της νόσου καθιστώντας τη διάγνωση δύσκολη. Απεικονιστικά η παρουσία μάζας με όψη κακοήθειας και καθυστερημένη φλεβική φάση θέτει τη διάγνωση, αλλά είναι δύσκολο να παρατηρηθεί σε πρώιμο στάδιο, ενώ οι επεμβατικές χολαγγειογραφίες δεν χρησιμεύουν ιδιαίτερα, εκτός βέβαια από τη δυνατότητα της ERCP να προσφέρει υλικό για κυτταρολογική ή παθολογοανατομική εξέταση (371).

ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Αποτελεσματική θεραπεία για την PSC, παραμένει μόνο η ηπατική μεταμόσχευση, αν και η νόσος υποτροπιάζει στο μόσχευμα σε 20-25% των ασθενών σε 5-10 έτη μετά την επέμβαση (372). Η αβεβαιότητα που υπάρχει όσον αφορά την αιτιοπαθογένεια της νόσου αποτέλεσε εμπόδιο στην ανακάλυψη άλλων θεραπειών, ενώ θεραπευτικές αγωγές που σε άλλα χολοστατικά νοσήματα έφεραν αποτελέσματα, δοκιμάστηκαν στην PSC χωρίς μεγάλη επιτυχία. Το UDCA επέφερε εργαστηριακή βελτίωση στους ασθενείς (373), αλλά χωρίς ύφεση των συμπτωμάτων ή βελτίωση της κλινικής πορείας, ενώ ο φόβος παρενεργειών απέτρεψε τη διεξαγωγή μελετών με χορήγηση μεγαλύτερων δόσεων (374). Η χρήση ανοσοκατασταλτικών επίσης δεν έδειξε ιδιαίτερα αποτελέσματα, με εξαίρεση τα σύνδρομα επικάλυψης, και τις περιπτώσεις IgG4 χολαγγειίτιδας (375). Η βενζαφιβράτη, επέφερε μείωση των χολοστατικών ενζύμων στο 40% των ασθενών σε μία μικρή Ιαπωνική μελέτη. Παραμένει άγνωστο όμως αν επηρεάστηκε η κλινική πορεία της νόσου, και καθώς οι ασθενείς ήταν λίγοι, σίγουρα θα χρειαστούν περισσότερες έρευνες (376).

4.3β. PETINOΕΙΔΗ ΚΑΙ PSC

Όπως προαναφέρθηκε, τα εντερικά λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται στον εντερικό λεμφικό ιστό και ωθούνται από τα δενδριτικά κύτταρα στην έκφραση των υποδοχέων α4β7 και CCR9. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν πως το RA παίζει σημαντικό ρόλο στην εξώθηση αυτή (45,377). Τα δενδριτικά κύτταρα του εντέρου εκφράζουν ισοένζυμα της αφυδρογονάσης της ρετινάλης που τους δίνουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν τη ρετινόλη σε ATRA, το οποίο αντιδρά με τους πυρηνικούς υποδοχείς RAR και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των α4β7 και CCR9 (45). Αντίθετα, δενδριτικά κύτταρα από το σπλήνα, το ήπαρ, τους πυλαίους και τους περιφερικούς λεμφαδένες, δεν έχουν την αφυδρογονάση της ρετινάλης και δεν μπορούν να παράγουν ATRA. Αρουραίοι με ανεπάρκεια βιταμίνης Α παράγουν χαμηλούς αριθμούς CCR9+α4β7+ λεμφοκυττάρων και έχουν λιγότερα λεμφοκύτταρα στη βασική μεμβράνη του εντέρου (45,377,378). Παρόλο που το RA αποθηκεύεται κυρίως εξωεντερικά και μάλιστα στα HSC, ο τροπισμός των λεμφοκυττάρων είναι ανεξάρτητος από τα CCR9/α4β7, εκτός από την περίπτωση της PSC, όπου

προσέρχονται λόγω της έκτοπης έκφρασης των MAdCAM-1 και CCL25 (378,379). Τα ηπατικά κολποειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα (liver sinusoidal endothelial cells-LSEC) είναι ικανά να προκαλέσουν μετανάστευση CD4⁺ T κυττάρων στο έντερο, τροπισμός που επίσης εξαρτάται από το RA και την έκφραση των υποδοχέων CCR9/α4β7, καθώς τα LSEC έχουν το ένζυμο αφυδρογονάση της ρετινάλης και μπορούν να παράγουν ATRA. Επομένως, χάρη στους παραπάνω μηχανισμούς παρατηρείται μια εντεροηπατική κυκλοφορία λεμφοκυττάρων (380).

II. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Α ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΩΝ

A. Ο ρόλος των ρετινοειδών

Η κίρρωση είναι μία χρόνια, μη αντιστρεπτή βλάβη του ήπατος που χαρακτηρίζεται από καταστροφή της αρχιτεκτονικής του παρεγχύματος και του αγγειακού του δικτύου, εξαιτίας του σχηματισμού αναγεννητικών όζων και διαφραγμάτων συνδετικού ιστού. Αιτίες της είναι ο αλκοολισμός, η μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, ιοί όπως ο HBV και ο HCV, μεταβολικά νοσήματα (νόσος Wilson), φάρμακα, η χρόνια ισχαιμία ή η απόφραξη των απαγωγών ηπατικών φλεβών, παράσιτα (σχιστόσωμα). Επίσης, μπορεί να προκληθεί από επίθεση του ανοσοποιητικού έναντι επιτόπων των ηπατοκυττάρων ή των επιθηλιακών κυττάρων των μικρών χοληφόρων πόρων που επιφέρει, μετά από ανεξέλεγκτη φλεγμονώδη διαδικασία, είτε καταστροφή ηπατοκυττάρων είτε καταστροφή μικρών ενδοηπατικών χολαγγείων. Τέλος μπορεί να συμβεί μετά από παρατεταμένη απόφραξη χολαγγείων από λίθο, όγκο ή άλλη αιτία (δευτεροπαθής χολική κίρρωση) ή από ανοσολογικής αιτιολογίας φλεγμονή των μεγάλων χολαγγείων και δημιουργία στενώσεων που δυσχεραίνουν την απόδοση της χολής (PSC), που επιφέρει την παλινδρόμηση της χολής και την τοξική επίδραση της στα ηπατοκύτταρα. Ανεξάρτητα από την αρχική αιτία, συμβαίνει νέκρωση ηπατοκυττάρων και αναγεννητική αντίδραση γειτονικών. Λόγω της καταστροφής του δομικού σκελετού του ηπατικού παρεγχύματος στις περιοχές νέκρωσης, η αναγέννηση είναι ανατομικώς αναποτελεσματική και απλά δημιουργούνται αναγεννητικοί όζοι. Αυτοί περιβάλλονται από συνδετικό ιστό. Αρχικά τα διαφραγμάτια του συνδετικού ιστού σχηματίζονται παθητικά από τη σύμπτωση των δικτυωτών ινών που παρατηρείται στις περιοχές ηπατονέκρωσης. Στη συνέχεια σχηματίζονται νέες ίνες κολλαγόνου στο σχηματισμό των οποίων παίζουν ρόλο τα κύτταρα Ito (4).

Τα κύτταρα Ito αποτελούν το σημείο αποθήκευσης της βιταμίνης Α στον οργανισμό. Μετά από βλάβη του ήπατος, υπερπλάθονται και μετατρέπονται σε δραστικά κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες. Το γεγονός αυτό συμπίπτει χρονικά με μείωση των επιπέδων της βιταμίνης Α, τόσο σε αυτά, όσο και στον ορό (381). Σε τέτοιες καταστάσεις, ευνοείται η υδρόλυση των εστέρων

ρετινόλης. Η μετάπτωση των κυττάρων του Ito από τον λιποκυτταρικό στον ινοβλαστικό φαινότυπο συνδέεται με την απώλεια των λιπιδίων σταγονιδίων και την συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας (6). Επιγραμματικά, έτσι ξεκινά η διαδικασία της ίνωσης, και αν δεν βρεθεί και αντιμετωπισθεί η αιτία επέρχεται η κίρρωση, καθώς η εξωκυττάρια ουσία σχηματίζει ίνες κολλαγόνου που βαθμιαία μεταπίπτουν σε διαφραγμάτια που διαταράσσουν την ηπατική δομή και λειτουργία. Κοινά στοιχεία στον τρόπο έλευσης της κίρρωσης υπάρχουν σε όλες τις χρόνιες ηπατοπάθειες, υπάρχουν όμως και ιδιαιτερότητες στην κάθε ασθένεια, γεγονός που αντικατοπτρίζεται ενίοτε και στην ιστολογική εικόνα, ιδίως σε αρχικά στάδια. Σε όλες τις παθολογικές διεργασίες που διαδραματίζονται, κοινές (όπως αυτές που αφορούν το οξειδωτικό stress και τη λειτουργία της ανοσίας) και ιδιάζουσες, τα ρετινοειδή εμπλέκονται σε άλλοτε άλλο βαθμό και, ενδεχομένως, αυτή η εμπλοκή αποτυπώνεται και στον ορό, με τα κυκλοφορούντα επίπεδα τους.

Τα ρετινοειδή επηρεάζουν την κίρρωτική διαδικασία με πολλούς τρόπους. Άλλοι απαντούνται σε όλες τις ηπατοπάθειες και σχετίζονται με τον ευρύτερο ρόλο τους στον οργανισμό και άλλοι συνδέονται με τη σχέση των ρετινοειδών με τον αιτιολογικό παράγοντα που προκαλεί την κίρρωση. Κοινός παθογενετικός μηχανισμός της κίρρωσης στον οποίο τα ρετινοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο, αποτελεί η υπέρμετρη ανοσοαπόκριση και το οξειδωτικό stress που αυτή προκαλεί. Τα ρετινοειδή, ως μόρια με πολλούς ομοιοπολικούς διπλούς δεσμούς, ευρισκόμενα στο τμήμα του οργανισμού που είναι επιφορτισμένο με την αδρανοποίηση τοξινών (ενδογενών ή εξωγενών), αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά συστήματα. Σε όλες τις χρόνιες ηπατοπάθειες έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη οξειδωτικού stress, ακόμη και σε μη κίρρωτικούς ασθενείς. Ανεξάρτητα από την αιτία, η παραγωγή οξειδωτικών μορίων, τα οποία προέρχονται κυρίως από τα κύτταρα Kupffer, μπορεί να ενεργοποιήσει τα αστεροειδή κύτταρα και αυτά να μεταμορφωθούν σε μυοϊνοβλάστες και να χάσουν τα ρετινοειδή τους με τον εξής μηχανισμό: οι αλδεϋδες-προϊόντα της υπεροξειδωτικής λιπιδίων, έλκουν και ενεργοποιούν φλεγμονώδη κύτταρα και κυτταροκίνες αυξάνοντας τη σύνθεση ινών κολλαγόνου. Παράλληλα, το οξειδωτικό stress αυξάνει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (382). Αποτέλεσμα της ελάττωσης των αποθηκών της βιταμίνης Α είναι η

μεγαλύτερη έκθεση των ηπατοκυττάρων στο οξειδωτικό stress που προκαλούν οι εισερχόμενες από την κυκλοφορία ελεύθερες ρίζες, καθώς δεν υπάρχει σε επάρκεια το βασικό αντιοξειδωτικό τους σύστημα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την επιβάρυνση και των υπόλοιπων αντιοξειδωτικών συστημάτων του ηπατοκυττάρου. Έτσι, τα αντιοξειδωτικά μαλονδιαλδεΐδη, ανηγμένη γλουταθειόνη, σελήνιο, καθώς και οι βιταμίνες E και C βρέθηκαν μειωμένα, όχι μόνο στο ήπαρ, αλλά και στο αίμα και τα ούρα κίρρωτικών ασθενών. Αντίθετα, ο δείκτης υπεροξειδωσης λιπιδίων 8-ισοπροστανό, βρέθηκε σημαντικά αυξημένος (383,384). Επίσης, η μείωση της βιταμίνης A προκαλεί στα ηπατοκύτταρα διαταραχή της διακυτταρικής επικοινωνίας. Έτσι μειώνεται η ικανότητά τους για ανταλλαγή και αποβολή ιόντων και μορίων κάτι που τα εκθέτει περισσότερο στο οξειδωτικό stress(385). Το οξειδωτικό stress όμως προϋπάρχει της κίρρωσης και εγκαθιστά ένα φαύλο κύκλο οξείδωσης λιπιδίων, απώλειας αντιοξειδωτικών που επιτείνεται με τη μετατροπή των κυττάρων Ito σε μυοϊνοβλάστες και παραπέρα απώλεια ρετινοειδών. Για να διακοπεί αυτός, είτε θα πρέπει να αρθεί ο αιτιολογικός παράγοντας (ιός, οινόπνευμα, άθροιση λίπους) είτε να κατασταλεί η δράση του ανοσοποιητικού.

Το RA γενικά, εμποδίζει την παραγωγή κυτταροκινών όπως ο παράγων νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor -TNF), το οξείδιο του αζώτου, και η IL-12, που ευοδώνουν τη δημιουργία T κυττάρων τύπου Th1, ενώ αυξάνει την παραγωγή κυτταροκινών που ευνοούν την γένεση Th2 κυττάρων όπως η IL-10 και η IL-4 (30-35). Επίσης προκαλεί μείωση της σύνθεσης της IgG1, γεγονός που φαίνεται πως οφείλεται σε δυσλειτουργία των CD4+ T (36). Η βιταμίνη A επιδρά στην οντογένεση, τη λειτουργία και τη διαφοροποίηση των ώριμων T κυττάρων, καθώς φαίνεται πως μπορεί να συντεθεί ενδογενώς στο Θύμο αδένι και να αποτρέψει την αρνητική επιλογή, ενώ υπάρχουν ενδείξεις πως στη διαδικασία συμμετέχουν και οι RAR/RXR πυρηνικοί υποδοχείς (38,39). Πέρα από την επίδραση του στην ισορροπία Th1/Th2, το RA έχει δείχθει ότι εμποδίζει την Th-17 T-διαφοροποίηση. Αυτή λαμβάνει χώρα με την παρουσία του TGF-β και προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-6, IL-1 και TNFα. Σημαντικό ρόλο παίζουν και οι πυρηνικοί υποδοχείς RORα και RORγt (orphan nuclear receptor). Το RA μειώνει την έκφρασή τους, καταστέλλοντας έτσι την Th-17 αντίδραση. Με τον τρόπο αυτό επηρεάζει την

ισορροπία μεταξύ Th-17 και Treg (ρυθμιστικών) κυττάρων. Η όλη διαδικασία φαίνεται πως ελέγχεται από τον LXR (40,41,309,310). Τα δενδριτικά κύτταρα που έχουν το ένζυμο αφυδρογονάση της Ρετινάλης και είναι σε θέση να παράγουν RA με αποτέλεσμα αντίδραση τύπου Th1, Th2 ή Th17, επάγοντας την έκφραση των κατάλληλων μορίων προσκόλλησης, ελέγχουν τον αποικισμό και τη διαφοροποίηση των T- ρυθμιστικών κυττάρων (42,43).

Το RA, *in vitro*, προωθεί τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των NKT κυττάρων (53-55), και μειώνει από αυτά την παραγωγή IFN- γ και IL-4. Καθώς όμως η παραγωγή TNF- α δεν μειώνεται, η προσθήκη του δεν προκαλεί ύφεση της ηπατικής βλάβης σε όλες τις πειραματικές ηπατίτιδες, γεγονός που δείχνει πως η δράση του εξαρτάται και από τη υποκείμενη παθοφυσιολογία (386).

Τα NK κύτταρα παράγουν IFN- γ και μέσω αυτής αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο των HSC και την απευθείας απόπτωσή τους. Οι μεταβολίτες της Ρετινόλης παίζουν σημαντικό ρόλο στην ευαισθητοποίηση των NK ώστε να φονεύσουν τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα, αυξάνοντας την έκφραση του γονιδίου (retinoic acid–induced early gene 1-RAE1) που καθιστά τα αστεροειδή κύτταρα ευάλωτα και διεγείρει τα NK. Ένας άλλος τρόπος δράσης της στα NK, είναι η αύξηση της παραγωγής από αυτά του προαποπτωτικού για τα HSC παράγοντα (tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand -TRAIL) (106,120,121).

B. Ο ειδικός ρόλος των ρετινοειδών στην παθοφυσιολογία της κάθε ηπατοπάθειας

B1. ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΝΟΣΟΣ

Το οινόπνευμα επιδρά στον ενδοηπατικό μεταβολισμό της βιταμίνης Α, επάγοντας τα μικροσωμιακά συστήματα που μεταβολίζουν τα ρετινοειδή (387). Η επίδραση αυτή θεωρείται μάλιστα ότι προκαλεί έλλειψη All-trans RA και ευθύνεται για τις παραμορφώσεις που παρατηρούνται στα έμβρυα αλκοολικών εγκύων γυναικών (20). Επίσης η σχετική υποξία των ηπατοκυττάρων της ζώνης-3 λόγω ιδιαιτερότητας στην αιμάτωση, επιδεινούμενη από την κατάχρηση οινόπνεύματος μειώνει περαιτέρω την ικανότητα οξειδωσης και αποβολής λιπαρών οξέων. Έτσι λαμβάνει χώρα συσσώρευση λίπους στα ηπατοκύτταρα (125).

Ο καταβολισμός του RA καταλύεται από τα CYP2A1, 2B1 και 2C1. Έχουν παρατηρηθεί μειωμένα επίπεδα ηπατικού RA σε τρωκτικά που τους χορηγούσαν αιθανόλη(129), υπερκαταβολισμός του RA (127,131) και αυξημένα επίπεδα πολικών μεταβολιτών του RA στο ήπαρ τρωκτικών που ελάμβαναν αιθανόλη (127,131,132). Σημαντικό είναι και το γεγονός πως στο ήπαρ των αλκοολικών αρουραίων ενεργοποιείται ένα άλλο ενζυμικό σύστημα για τον καταβολισμό του RA, το CYP2E1, που αναστέλλεται από τη χλωρμεθειαζόλη. Η χρήση της φέρεται να ομαλοποιεί τόσο τα επίπεδα των ηπατικών RA, αλλά και της ρετινόλης και των εστέρων. (127,131,132) Τις μεταβολές των ηπατικών ρετινοειδών ακολουθούν και τα HSCs, καθώς μειώνονται σε αριθμό αλλά και τα λιποσταγονίδια τους αλλάζουν μορφή και αριθμό (8,134).

Τουλάχιστον με βάση τις μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες, κρίσιμο σημείο για την παραπέρα εξέλιξη της νόσου, και ενδεχομένως απάντηση στο γιατί δεν προκαλείται κίρρωση σε όλους τους αλκοολικούς, αποτελεί η δράση των κυττάρων NK. Κατά τη διάρκεια της ηπατικής βλάβης τα κύτταρα Ito ενεργοποιούνται και γίνονται ευάλωτα στα κύτταρα NK. Αυτό συμβαίνει χάρη στην αυξημένη έκφραση του γονιδίου RAE-1. Υπέρμετρη έκφραση του

ενεργοποιεί πρώιμα τα κύτταρα NK που φονεύουν τα HSCs. Η διαδικασία ενεργοποίησης των κυττάρων Ito φαίνεται να περνά από τη φάση ηρεμίας, στη φάση μερικής ενεργοποίησης και έπειτα στη φάση πλήρους ενεργοποίησης. Η υπέρμετρη έκφραση του γονιδίου RAE-1 (retinoic acid early inducible gene 1), παρατηρείται μόνο στη φάση μερικής ενεργοποίησης, οπότε είναι δυνατή η εξώθηση των HSCs σε απόπτωση και η διακοπή των ινωτικών διαδικασιών. Όταν όμως η ενεργοποίηση γίνει πλήρης, η έκφραση της RAE-1 σταματά, τα HSCs δεν μπορούν να φονευθούν από τα κύτταρα NK και οι διεργασίες που ευνοούν την ίνωση συνεχίζονται (135). Τα ενεργοποιημένα HSCs εκφράζουν και την CRBP-1 αλλά και την α -SMA (smooth muscle actin), εικόνα που παρουσιάζουν και οι πυλαίοι και οι διαφραγματικοί ινοβλάστες. Η έκφραση της CRBP-1 αυξάνεται ανάλογα με τη βαρύτητα της κίρρωσης (136).

Η χρόνια κατανάλωση οινόπνεύματος καταστέλλει τον αντικιρρωτικό άξονα NK/IFN- γ /STAT. Ο STAT1 εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των αστεροειδών κυττάρων, καταστέλλει την έκφραση του PDGF και του TGF και διεγείρει την επίθεση των κυττάρων NK προς τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. Ενεργοποιείται από τις INF- α και $-\gamma$. Αντίθετα, κυτταροκίνες όπως ο TGF- β (transforming growth factor- β) και ο PDGF (platelet-derived growth factor) συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων (137,138).

Τα ηπατικά NK κύτταρα τροποποιούν την ηπατική βλάβη εξισορροπώντας την τοπική παραγωγή προφλεγμονωδών (Th-1) και αντιφλεγμονωδών (Th-2) κυτταροκινών. Η έλλειψή τους οδηγεί την παραγωγή προς την κατεύθυνση Th-1 αυξάνοντας τον TNF, γεγονός που ενισχύει την ηπατοτοξικότητα που προκαλείται από τους λιποπολυσακχαρίτες (162). Το RA σε γενικές γραμμές εμποδίζει την παραγωγή κυτταροκινών που οδηγούν την ανοσολογική απάντηση προς την κατεύθυνση Th1 απόκρισης, προάγοντας τις κυτταροκίνες που ευνοούν την Th2 απάντηση. Μετά από ενεργοποίηση, τα μακροφάγα παράγουν TNF και οξειδίο του αζώτου (NO) το οποίο είναι ισχυρά οξειδωτικό μόριο. Σε ενεργοποιημένα από λιποπολυσακχαρίτες περιτοναϊκά μακροφάγα, το all-trans RA μείωσε τα επίπεδα του mRNA του TNF και την παραγωγή NO (388), ενώ σε καλλιέργειες μονοπύρηνων αύξησε την έκκριση

της IL-10 και εμπόδισε κυτταροκίνες όπως ο TNFα και η IL-12. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε και μελέτη in vivo σε αρουραίους. Το πώς προγραμματίζεται ο φαινότυπος και η λειτουργία των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων είναι άγνωστο, αλλά φαίνεται ότι το RA, δρώντας στα μακροφάγα, στρέφει τη λειτουργία των T-κυττάρων προς την Th2 απόκριση (42,389).

B2. ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΣΤΕΑΤΟΗΠΑΤΙΤΙΣ

Η λεπτίνη, η ρεσιστίνη, η IL-6, ο TNFα, η RBP4 και η αδιπονεκτίνη, είναι πολυπεπτίδια που εκκρίνονται από το σπλαχνικό λίπος. Ορισμένα εκφράζονται μόνο από λιποκύτταρα, ενώ στην έκφραση άλλων παίζουν ρόλο ιστικά μακροφάγα όπως τα κύτταρα Kupffer. Συνολικά ονομάζονται αδιποκίνες. Η αδιπονεκτίνη θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο, αποτρέποντας το «δεύτερο χτύπημα», στην παθοφυσιολογική διαδικασία της NAFLD. Διεγείρει την οξείδωση λιπαρών οξέων και την κετογένεση ενώ αναστέλλει τη σύνθεση χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στα ηπατοκύτταρα, ενδεχομένως μέσω καταστολής του SREBP-1c (155). Αποτρέπει τη μετάδοση φλεγμονωδών σημάτων στα κύτταρα Kupffer, πιθανότατα με δρόμους που σχετίζονται με την IL-10 και την NADPH οξειδάση, λειτουργώντας έτσι και ως αντιοξειδωτικό (162). Στη NAFLD, η τιμή της μειώνεται ανάλογα με τη βαρύτητα της νόσου αλλά, τα επίπεδα της σε ασθενείς με άλλες χρόνιες ηπατοπάθειες αυτοάνοσης αιτιολογίας, σε μία μελέτη, βρέθηκαν συγκριτικά αυξημένα (390).

Η RBP4, εκκρίνεται κυρίως από το ήπαρ και το σπλαχνικό λίπος, αυξάνεται σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης και στη φλεγμονώδη αντίδραση που χαρακτηρίζει την παχυσαρκία. Υψηλά επίπεδα παρατηρούνται και σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό μεταβολικού συνδρόμου (158). Ανεξάρτητα από την αιτία, τα επίπεδα της μειώνονται σε ενήλικες κίρρωτικούς λόγω της μείωσης της ηπατικής ικανότητας για πρωτεϊνοσύνθεση (391).

Τα εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα (τα οποία ονομάστηκαν M2, σε αντιδιαστολή με τα ενεργοποιημένα μέσω των κλασσικών προφλεγμονωδών διαδικασιών M1) αποτελούν ένα άλλο κρίσιμο βήμα για τη διακοπή της υπερβολικής φλεγμονής. Η εναλλακτική ενεργοποίηση διεγείρεται από τις Th2

κυτταροκίνες IL-4 και IL-13, που προκαλεί την έκφραση χαρακτηριστικών M2 γονιδίων στην επιφάνεια των μακροφάγων όπως τα mannose receptor, arginase-1, and dectin-1. Όπως προαναφέρθηκε, η στεάτωση προάγει την παραγωγή Th1 κυτοκινών, τη μείωση των NK και την M1 ενεργοποίηση. Οι πυρηνικοί υποδοχείς PPARα, PPARγ, PPARδ, LXR-α και LXR-β ελέγχουν το μεταβολισμό λιπιδίων και μπορούν να συνδεθούν με την εναλλακτική ενεργοποίηση, δημιουργώντας έτσι μια νέα διάσταση στην αντιμετώπιση της NAFLD. Ενώ ο PPARγ προωθεί την ενεργοποίηση μακροφάγων που συντελούν σε μεταβολικές αλλαγές όπως η βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη ο PPARδ απαιτείται για παρόμοιες δράσεις στα κύτταρα Kupffer. Πράγματι, χωρίς αυτόν η εναλλακτική ενεργοποίηση τους είναι αδύνατη, αλλά η δράση του φαίνεται να τροποποιείται και από την σύσταση των λιπαρών οξέων και του ηπατικού μικροπεριβάλλοντος (162,392). Επίσης, υπάρχουν ερευνητές που θεωρούν ότι η υπερβολική M2 ενεργοποίηση μέσω των IL-5 και IL-13 και της δράσης των ηωσινόφιλων, επιδεινώνει την ίνωση καταστέλλοντας την INF-γ, τουλάχιστον σε πειραματικό μοντέλο που μελέτησε την κίρρωση που προκαλείται από το σχιστόσωμα (393).

Τα ηπατικά NK κύτταρα ελέγχονται και από κυτταροκίνες που παράγονται από τα κύτταρα Kupffer (228). Τα τελευταία, ως ιστικά μακροφάγα υπεύθυνα για την φαγοκύτωση, την αντιγονοπαρουσίαση και την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και λόγω της θέσης στους στα ηπατικά κολποειδή, έρχονται πρώτα σε επαφή με τις προερχόμενες από το έντερο τοξίνες αλλά και τους λιποπολυσακχαρίτες. Όταν διεγερθούν οι υποδοχείς TLR4 τα κύτταρα Kupffer παράγουν TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-18, και IL-10. Οι IL-12 και IL-18 ενεργοποιούν τα κύτταρα (NK) και αυτά με τη σειρά τους παράγουν IFN-γ. Επίσης, παράγουν οξειδωτικά μόρια και τους PDGF και TGF-β που εύνουν την κίρρωτική διεργασία (107). Η συσσώρευση λίπους που επηρεάζει τους υποδοχείς TLR4, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο καθώς η ανεπάρκειά τους σε πειραματικά μοντέλα επιφέρει αδυναμία ανάπτυξης NAFLD, ακόμη και σε αρουραίους που η χορηγούμενη διαίτα βοήθησε στην πρόκληση της νόσου (160). Στα κύτταρα Kupffer έχει παρατηρηθεί έκφραση των υποδοχέων RAR σε επίπεδα παρόμοια με αυτά των HSCs, ενώ τα επίπεδα mRNA των RXR-α και -β είναι σχεδόν δεκαπλάσια (161). Όταν η ιστολογική εικόνα επιδεινωθεί, η στεάτωση και η

διαταραγμένη ομοιόσταση των λιπιδίων μπορεί να εμποδίζει την κολποειδική μικροκυκλοφορία αυξάνοντας την απαντητικότητα των κυττάρων Kupffer, επηρεάζοντας δυσμενώς τον υποδοχέα TLR4, κάτι που μπορεί να συμβεί και με την παραγωγή ελευθέρων ριζών και αδιποκινών. Προκαλείται με τον τρόπο αυτό, παραπέρα διέγερση των κυττάρων και εγκαθίσταται με αυτόν τον τρόπο ένας φαύλος κύκλος (162). Τα αστεροειδή κύτταρα, η κύρια πηγή παραγωγής πρωτεϊνών εξωκυττάριας ουσίας στο ήπαρ, όπως το κολλαγόνο τύπου I, III, και IV εκφράζουν τους TLR4 και TLR9, και μέσω των TLR4 αποκτούν προφλεγμονώδη χαρακτηριστικά (107).

B.3. ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C

Είναι φανερό από τα παραπάνω ότι τα ρετινοειδή συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο ήπαρ. Οι ιοί χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς λειτουργίας των κυττάρων ξενιστών για να επιβιώσουν και να αναπαραχθούν. Έτσι, ο HCV χρησιμοποιεί τα λιποσταγονίδια για τον πολλαπλασιασμό του αλλά και την επίδραση των ρετινοειδών στην παραγωγή κυτταροκινών για να αποφεύγει την εξόντωση (228,229,231-233).

Επίσης, κυκλοφορεί στο αίμα σε συμπλέγματα από λιποπρωτεΐνες, ενώ με τη χρόνια λοίμωξη συνδέονται, διαταραχές στον μεταβολισμό των λιπιδίων, μείωση των β-λιποπρωτεϊνών στον ορό και ανώμαλη συσσώρευση αυτών στα ηπατικά παρεγχυματικά κύτταρα (στεάτωση), η οποία ορισμένες φορές συσχετίζεται και με την ένταση αναπαραγωγής του ιού (230). Η στεάτωση αυτή πιθανότατα επέρχεται εξαιτίας της αλληλεπίδρασης με τους πυρηνικούς υποδοχείς που ρυθμίζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων, όπως ο PPAR-α (234-238), ο PPAR-γ (244-247), ο FXR (248-253) και ο LXRα (239,254).

Η στενή αλληλεπίδραση του ιού με τους πυρηνικούς υποδοχείς που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό των λιπιδίων και η εκτροπή προς την κατεύθυνση της λιπώδους διήθησης που παρατηρείται σε ένα μέρος των ασθενών με ηπατίτιδα C οδήγησε στον όρο ιική στεάτωση. Πράγματι, ο ιός αυξάνει τη δράση του SREBP 1c και του RXRa, κάτι που μπορεί να ευνοεί την λιπογένεση, και την επαγωγή της σύνθεσης της RBP4, ενώ *in vitro* μειώνει την έκφραση των PPARα και PPARγ υποδοχέων, γεγονότα που θεωρείται ότι προάγουν την ινσουλινοαντίσταση και τη στεάτωση. Επίσης, αρκετά φάρμακα

της κατηγορίας των στατινών αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του ιού *in vitro*, ενώ η στεάτωση σε αυτούς τους ασθενείς επιδεινώνεται σε συνάρτηση με τα επίπεδα HCV RNA και βελτιώνεται με τη θεραπεία. Το αντίστροφο συμβαίνει με τα επίπεδα αδιπονεκτίνης (256), ενώ τα αρχικά χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης είναι ανεξάρτητα από το φύλλο, το δείκτη μάζας σώματος και την παρουσία ινσουλινοαντίστασης (257). Η στεάτωση όμως δεν απαντάται σε όλους τους ασθενείς, μπορεί να μην επιδεινώνεται με τον πολλαπλασιασμό του ιού (ειδικά σε λοιμώξεις από γονότυπο 1) ή να προϋπάρχει της λοίμωξης και να μην βελτιώνεται με τη θεραπεία, ενώ δεν έχει βρεθεί ακόμα τμήμα του γονιδιώματος του ιού που να προκαλεί στεάτωση (258-260). Οι παθοφυσιολογικές διαδικασίες που παρατηρούνται στην εγκατάσταση της στεάτωσης είναι σίγουρο πως ωφελούν τον ιό, αλλά δεν είναι ξεκάθαρο αν ο ιός τις προκαλεί.

Το ATRA επάγει το ένζυμο (gastrointestinal glutathione peroxidase - GI-GPx), που αποτελεί βασικό αντιοξειδωτικό μέσο των ηπατοκυττάρων, ενώ η έκφραση του καταστέλλεται στη χρόνια HCV λοίμωξη (268,269). Η παρατήρηση αυτή, σε συνδυασμό με τις ενδείξεις από μελέτες σε κυτταρικές σειρές πως το ATRA ενισχύει τη δράση της IFN-α (270), οδήγησαν στη χορήγηση του σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (267) .

B.4. ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β

Τα ρετινοειδή εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της χρόνιας ηπατίτιδας Β με δύο τρόπους: (α) Οι μεταγραφικές διαδικασίες του ιού αλλά και το γεγονός πως η χρόνια λοίμωξη συνδέεται με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, σχετίζονται με τους πυρηνικούς υποδοχείς και τα RA. (β) Τα ρετινοειδή παίζουν ρόλο στην ανοσολογική απάντηση και στην κάθαρση του ιού ή την εξέλιξη της λοίμωξης σε χρόνια.

(α) Στο ένα από τα δύο τμήματα του επαυξηνητή του ιού που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση, υπάρχει περιοχή στην οποία συνδέεται ο RXR-α (24). Οι υποδοχείς PPARα, FXRα, και HNF4α επίσης εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής του ιού (147,183). Το HBx, το κατεξοχήν ογκογόνο προϊόν του HBV, προκαλεί παθολογική μεθυλίωση στο RARβ2, καταστέλλει την έκφραση

του σε κυτταρικές σειρές HKK. Καθώς το RAR-β2 είναι από τους κύριους εκτελεστές των αντι-ογκογόνων ιδιοτήτων του RA, η υπορύθμιση του από τον HBx ενδεχομένως να είναι σημαντικό βήμα κατά τη προκαλούμενη από τον HBV ογκογένεση (200).

(β) Όπως προαναφέρθηκε, τα ρετινοειδή, παίζουν μέσω της καταστολής του RORγt σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της Tregs και της Th-17 απάντησης (40,41,56). Σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β, φαίνεται πως αυξάνονται τα Treg και τα Th17 κύτταρα στο περιφερικό αίμα (201,204-206). Ωστόσο, η αντίδραση αυτή δεν επιφέρει κάθαρση του ιού αλλά η λοίμωξη γίνεται χρόνια (207).

B.5. ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΗΠΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Η καταστολή του ROR-γ από το RA παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην καταστολή της Th17 αντίδρασης (40,41). Καθώς η ισορροπία Treg/Th17 έχει βρεθεί πως διαταράσσεται στα αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα, ο ρόλος των ρετινοειδών φαίνεται σημαντικός (56,302-305). Στη διαδικασία συμβάλλουν ο RAR-α (306,307) και ο LXR που επάγει τον Srebp-1, ο οποίος με τη σειρά του αναστέλλει τη μεταγραφή της IL-17 (309,310). Έτσι, δοκιμάζονται από διάφορους ερευνητές ουσίες που επιδιώκουν να καταστείλουν τους ROR υποδοχείς, διεγείροντας, έστω και ήπια, τους RAR-α και LXR (308,314).

Στο ήπαρ, Th17 κύτταρα είναι παρόντα σε ορισμένες περιπτώσεις χρόνιας ηπατίτιδας C ενώ στην PBC συναθροίζονται γύρω από τα χοληφόρα. Οι Th17 συσχετιζόμενες κυτταροκίνες επίσης ενδεχομένως εμπλέκονται στην ιστοπαθολογία της PBC, καθώς παρατηρούνται αυξημένες γύρω από τα χοληφόρα (346). Αντίστοιχα, ο αριθμός των Tregs σε ασθενείς με PBC είναι μειωμένος, φαινόμενο που αποκαθίσταται στο φυσιολογικό μετά από θεραπεία με UDCA (349,350). Οι PPAR-γ υποδοχείς παίζουν επιπρόσθετο ρόλο στη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής στα χοληφόρα, και η χρήση αγωνιστών τους θα μπορούσε να εξουδετερώσει τα σήματα που μπορούν να προκαλέσουν αυτοάνοσες αντιδράσεις αναστέλλοντας την έκφραση προφλεγμονωδών κυττοκινών όπως ο TNF-α (346,347,353).

Κύτταρα που εκφράζουν ισοένζυμα της αφυδρογονάσης της ρετινάλης είναι σε θέση να παράγουν RA με οξείδωση της ρετινόλης, όπως τα δένδριτικά κύτταρα του εντέρου και τα ηπατικά κολποειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Με τη χρήση του ATRA εξωθούνται τα λεμφοκύτταρα και εκφράζουν τους υποδοχείς α4β7 και CCR9 και στη συνέχεια κατευθύνονται προς το έντερο ή τα χολαγγεία όπου ξεκινούν οι παθολογικές διεργασίες για IBD και PSC, όταν υπάρχει έκτοπη έκφραση των MAdCAM-1 και CCL25 (45,377,380).

B.6. ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΚΑΙ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΗ

Η πτώση των επιπέδων της βιταμίνης A στον ορό ηπατοπαθών είναι γνωστή από το 1976 (394). Σε μελέτες, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της βιταμίνης A, στον ορό με την βαρύτητα της ιστολογικής εικόνας του εξεταζόμενου κίρρωτικού ήπατος. Παρατηρήθηκε επίσης ότι ορισμένοι κίρρωτικοί ασθενείς που στην συνέχεια ανέπτυξαν ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα είχαν αρχικά χαμηλότερες τιμές βιταμίνης A στον ορό, σε σχέση με αυτούς που δεν ανέπτυξαν στο διάστημα της επταετίας που παρακολουθούνταν από τους ερευνητές (381,395).

Η παρουσία της βιταμίνης A είναι αναγκαία για τον ομαλό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων. Στην κίρρωση, πραγματοποιούνται αλληπάλληλοι πολλαπλασιασμοί από τα ευρισκόμενα σε φάση αναγέννησης ηπατοκύτταρα κάτι που αυξάνει τις ανάγκες σε βιταμίνη A. Παραπέρα μείωση της βιταμίνης A παρατηρείται λόγω της κακής θρέψης που παρατηρείται συχνά στους ηπατοπαθείς. Από τα παραπάνω, είναι φανερό ότι ευνοούνται μεταλλάξεις που μπορούν να συμβούν χάρη στις ελεύθερες ρίζες, η παρουσία των οποίων είναι αυξημένη πλέον στα ηπατοκύτταρα. Πράγματι, η μείωση της βιταμίνης A προκαλεί αυξημένη έκφραση αντιγόνων κυτταροκερατίνης A στην επιφάνεια τους. Φυσιολογικά αυτό παρατηρείται μόνο σε κύτταρα χοληφόρων πόρων. Η αύξηση αυτή συσχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου και παρατηρείται περισσότερο σε ηπατοκύτταρα που περιέχουν σωμάτια Mallory (συχνό ιστοπαθολογικό εύρημα στην κίρρωση) (396).

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη θετική προστατευτική δράση που προκύπτει από την παρουσία της βιταμίνης A, στον ομαλό πολλαπλασιασμό και τη

διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων, είναι η δομική ακεραιότητα των γονιδιακών υποδοχέων στους οποίους συνδέεται. Η υπερμεθυλίωση που παρατηρείται τόσο στον RAR-β, όσο και στο γονίδιο που κωδικοποιεί την CRBP, σε καρκινικά ηπατοκύτταρα, συσχετίζεται με την απώλεια του mRNA και την ελάττωση της CRBP. Βλάβες παρατηρούνται επίσης και στον υποδοχέα RXR-α καρκινικών ηπατοκυττάρων (200,397). Αναδείχθηκε επίσης, ότι ο RXR-α υποδοχέας των καρκινικών ηπατοκυττάρων είναι φωσφορυλιωμένος στη θέση σερίνη 260, σε αντίθεση με τον RXR-α των φυσιολογικών (26). Έτσι, δικαιολογείται η κατά 50% παραπέρα μείωση της βιταμίνης A που παρατηρήθηκε σε καρκινικά ηπατοκύτταρα, σε σχέση με την περιεκτικότητα των κίρρωτικών ηπατοκυττάρων που τα περιβάλλουν. Σημειώνεται ότι σε μεταστατικούς όγκους του ήπατος η περιεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων σε βιταμίνη A, ήταν διπλάσια σε σχέση με τα φυσιολογικά που τα περιέβαλλαν (398,399).

Από τα παραπάνω είναι φανερό η σημασία της βιταμίνης A στις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο φυσιολογικό στο κίρρωτικό και στο προσβεβλημένο από καρκίνο ήπαρ .

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ ΡΕΤΙΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΗΣ
ΣΤΙΣ ΧΡΟΝΙΕΣ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΕΣ

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η προερχόμενη από τις τροφές ρετινόλη, συνδέεται με την κυτταρική πρωτεΐνη σύνδεσης της (cellular retinol - binding protein - CRBP). Από το σημείο αυτό, υπάρχουν τρεις πιθανές μεταβολικές διαδικασίες. Πρώτον, μπορεί να μεταφερθεί στην πρωτεΐνη σύνδεσης της ρετινόλης (retinol - binding protein - RBP), η οποία με τη σειρά της συνδέεται με την τρανσθυρετίνη (transthyretin - TTR) και το σύμπλεγμα αποδίδεται στην κυκλοφορία. Δεύτερον, μπορεί να εστεροποιηθεί σε ρετινυλικό εστέρα (retinyl ester), αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο ακυλτρανσφεράση λεκιθίνης-ρετινόλης (lecithin : retinol acyltransferase - LRAT), και να αποθηκευτεί στα κυτταροπλασματικά λιποσταγονίδια (lipid droplets). Αντίστροφα, όταν χρειαστεί μπορεί να προκύψει παραγωγή ρετινόλης από υδρόλυση των εστέρων με τη βοήθεια της υδρολάσης των ρετινυλικών Εστέρων (REH - retinyl ester hydrolase). Τρίτον, μπορεί να μεταβολισθεί αρχικά σε ρετιναλδεΰδη (retinaldehyde), αντίδραση που είναι αμφίδρομη και καταλύεται από τα ένζυμα αλκοολική αφυδρογονάση (ADH - alcohol dehydrogenase) και αφυδρογονάση της ρετινόλης (RDH-retinol dehydrogenase). Στη συνέχεια να μετατραπεί, με μονόδρομη αντίδραση που καταλύεται από την αφυδρογονάση της ρετιναλδεΰδης (RALDH- retinaldehyde dehydrogenase), σε ρετινοϊκό οξύ (Retinoic acid - RA). Το RA μπορεί να συνδεθεί με την κυτταρική πρωτεΐνη σύνδεσης ρετινοϊκού οξέος (cellular retinoic acid binding protein - CRABP), η οποία το οδηγεί απ' ευθείας στον πυρήνα (nucleus) και στην πρόσδεση του στους μεταγραφικούς παράγοντες retinoic acid receptor (RAR) και retinoid X receptor (RXR). Αντίθετα, το RA (ανάλογα με τα υπάρχοντα επίπεδά του και για την αποφυγή τοξικότητας) μπορεί να οδηγηθεί σε καταβολισμό. Μετατρέπεται από διάφορα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYP) σε πολικούς μεταβολίτες (1,87,128).

Εικόνα (1). Σχηματοποιημένος μεταβολισμός της ρετινόλης (128). RBP – Retinol Binding Protein = Πρωτεΐνη που συνδέεται με τη ρετινόλη, TTR – Transthyretin = Τρανσθυρετίνη, CRBP – Cellular Retinol Binding Protein = κυτταρική πρωτεΐνη που συνδέεται με τη ρετινόλη, LRAT - lecithin : retinol acyltransferase = ακυλτρανσφεράση λεκιθίνης-ρετινόλης, REH - retinyl ester hydrolase = υδρολάση των ρετινυλικών εστέρων, retinyl ester = ρετινυλικός εστέρας, lipid droplets = κυταροπλασματικά λιποσταγονίδια, retinaldehyde = ρετιναλδεύδη, ADH - alcohol dehydrogenase = αλκοολική αφυδρογονάση, RDH-retinol dehydrogenase = αφυδρογονάση της ρετινόλης, RALDH - retinaldehyde dehydrogenase = αφυδρογονάση της ρετιναλδεύδης, RA - Retinoic acid = ρετινοϊκό οξύ, CRABP-cellular retinoic acid binding protein = κυτταρική πρωτεΐνη σύνδεσης ρετινοϊκού οξέος, Nucleus = πυρήνας, RAR - retinoic acid receptor, RXR - retinoid X receptor πυρηνικοί υποδοχείς-μεταγραφικοί παράγοντες, Polar metabolites = πολικοί μεταβολίτες, CYP P450 = ένζυμο του κυττοχρώματος P450.

Οι πυρηνικοί υποδοχείς χωρίζονται σε δύο οικογένειες: α) Τους υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος (RAR) α, -β και -γ που θεωρούνται ομόλογοι με την υπεροικογένεια των υποδοχέων των στεροειδικών και θυροειδικών ορμονών και δείχνουν υψηλή συγγένεια με το ρετινοϊκό οξύ, κυρίως στην all-trans μορφή. β) Τους Retinoid-X-receptors(RXR) α, -β και -γ , που απαντούν σε υψηλές συγκεντρώσεις all-trans RA αλλά δείχνουν 40 φορές μεγαλύτερη συνάφεια στο 9-cis RA. Οι RXR σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς τάξης II. Αυτοί είναι οι CAR (constitutive androstenedione receptor), FXR (farnesoid X receptor), LXR (liver X

receptor), PPAR (peroxisomal proliferator receptor), PXR/SXR (pregnane X receptor/steroid and xenobiotic receptor), RAR, TR (thyroid hormone receptor), VDR (vitamin D receptor), hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4α). Σημειώνεται ότι όλοι οι άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς τάξης II, αν δεν σχηματίσουν ετεροδιμερή με τον RXR δεν μπορούν να δράσουν. Αυτά τα ετεροδιμερή συνδέονται σε συγκεκριμένες περιοχές γονιδίων στόχων και ελέγχουν την έκφρασή τους (22,23).

(a)

(b)

Εικόνα (2). Δομή και λειτουργία των πυρηνικών υποδοχέων (427). (α) Σχηματική αναπαράσταση ενός τυπικού πυρηνικού υποδοχέα. Αυτοί αποτελούνται από 5 περιοχές με βάση δομικές και λειτουργικές ομοιότητες (A, B, C, D, E, και F). Οι περιοχές C και E περιέχουν τους διατηρούμενους

επιτόπους σύνδεσης του DNA (DNA-binding domains-DBDs) και του μορίου πρόσδεσης (ligand-binding domains-LBDs) που αποτελούν χαρακτηριστικά της υπεροικογένειας. Επιπρόσθετα, το στοιχείο μετάβασης (constitutive transport element - CTE) αποτελείται από μία περιοχή διμερισμού (dimerization region) μέσα στον LBD και δύο ενεργοποιητικές περιοχές (AF-1 και AF-2/TC). (β) Λειτουργία των πυρηνικών υποδοχέων (Nuclear Receptors-NR). Η σύνδεση του μορίου πρόσδεσης - ligand binding στον NR πυροδοτεί αλλαγές στη δομή του, που οδηγούν στην αποκόλληση των συγκαταστολέων (co-repressors) και στην προσκόλληση των συνενεργοποιητών (co-activators). Μετά από αυτή την αλλαγή ενεργοποιείται η RNA-πολυμεράση II (RNA polymerase II) και ξεκινά η μεταγραφή του mRNA (mRNA transcription).

Ο κύριος χώρος αποθήκευσης των ρετινοειδών είναι τα αστεροειδή κύτταρα ή κύτταρα Ito (HSC-Hepatic Stellate Cells). Σε συνθήκες ανοσολογικής ηρεμίας και επάρκειας του οργανισμού σε ρετινόλη, στα λιποσταγονίδια τους και σε μορφή εστέρων, βρίσκεται περίπου το 60% των ολικών ρετινοειδών του οργανισμού. Μετά από ηπατική προσβολή οποιασδήποτε αιτιολογίας (αιθανόλη, ιός, φλεγμονή) τα κύτταρα αυτά ενεργοποιούνται και μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες, παράγοντας μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών εξωκυττάριας ουσίας, ξεκινώντας με αυτό τον τρόπο τη διαδικασία της κίρρωσης. Η ενεργοποίηση των HSCs χωρίζεται σε τρεις φάσεις, τη μύηση, την προώθηση και τη λύση. Στην πρώτη παρατηρούνται πρώιμες αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και στο φαινότυπό τους που τα καθιστούν ικανά να απαντούν σε κυτταροκίνες και ερεθίσματα. Η προώθηση επέρχεται από τη διατήρηση του ενεργοποιημένου φαινότυπου και τη δημιουργία της ίνωσης χαρακτηρίζεται από συσταλτικότητα, ινωδογένεση, απώλεια των ρετινοειδών και διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων. Με τον όρο λύση της ίνωσης αναφερόμαστε στους μηχανισμούς που είτε οδηγούν τα HSCs σε απόπτωση είτε τα οδηγούν σε φαινότυπο ηρεμίας (88).

Τα ρετινοειδή είτε απευθείας, είτε μέσω των πυρηνικών υποδοχέων, λαμβάνουν μέρος σε δράσεις που αφορούν το μεταβολισμό λιπών και υδατανθράκων (58,255) και την ανοσολογική απάντηση (56,122). Θεωρείται σημαντική και η συμβολή τους στην αναστολή των ινωτικών διαδικασιών, καθώς επάγουν την έκφραση του γονιδίου (retinoic acid-induced early gene 1

-RAE1) που αφενός καθιστά τα HSCs ευάλωτα, αφετέρου διεγείρει τα κύτταρα φυσικοί φονείς (natural killer cells-NK) ώστε να απελευθερώσουν τον προαποπτωτικό παράγοντα (tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand - TRAIL), και στη φάση της πρώιμης ενεργοποίησης των HSCs να τα οδηγήσουν σε απόπτωση (121).

Υπάρχουν μελέτες όπου μετρήθηκε η ρετινόλη στον ορό ηπατοπαθών, οι οποίες εξετάζουν όμως μόνο την υποβιταμίνωση Α και το ρόλο της ρετινόλης στην ογκογένεση ή ως αντιοξειδωτικό (381,382,395,400,401), ενώ δεν έχουν μετρηθεί ποτέ τα ρετινοϊκά οξέα, παρά το γεγονός ότι αποτελούν τα κατεξοχήν βιολογικά δραστικά ρετινοειδή, ειδικά όσον αφορά τους πυρηνικούς υποδοχείς. Είναι αβέβαιο και δύσκολο να ξεκαθαριστεί αν τα επίπεδα των ρετινοειδών στον ορό συσχετίζονται με τα ιστικά επίπεδά τους. Είναι γενικά αποδεκτό πως η ρετινόλη και τα ρετινοϊκά οξέα εισέρχονται στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Οι υπάρχουσες μελέτες σε αρουραίους βασίζονται είτε σε εξωγενή ενδοφλέβια χορήγηση ρετινοειδών, είτε σε σίτιση υπερεπαρκή ή ανεπαρκή σε ρετινόλη. Οι δε μελέτες σε κυτταροκαλιέργειες δεν εγγυώνται συμβατότητα με το τι συμβαίνει πραγματικά στον οργανισμό. Ωστόσο το ήπαρ και ο εγκέφαλος φαίνεται να λαμβάνουν το 70% των ρετινοειδών από το πλάσμα, ενώ ο όρχις και το πάγκρεας σχεδόν καθόλου (402). Καθώς όμως ο προσδιορισμός των ιστικών ρετινοειδών τεχνικά δεν είναι εύκολος όσον αφορά την καθημερινή κλινική πρακτική, απομένει να εξεταστεί αν η μέτρηση των ρετινοειδών στον ορό μπορεί να μας δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τον εξεταζόμενο ασθενή.

Με βάση τα παραπάνω, μετρήθηκαν σε πάσχοντες από χρόνιες ηπατοπάθειες και σε υγιείς τα επίπεδα της ρετινόλης και των ρετινοϊκών οξέων. Ο στόχος της μελέτης αρχικά ήταν να γίνει σύγκριση των τιμών των ρετινοειδών των υγιών με αυτές των ασθενών, καθώς και μεταξύ των πασχόντων από διαφορετικές ασθένειες. Επίσης αξιολογήθηκαν σε σχέση με τα ρετινοειδή παράμετροι από το ιστορικό των εξεταζομένων, και τέλος αναζητήθηκαν συσχετίσεις των επιπέδων της ρετινόλης και των μεταβολιτών της με γνωστές εργαστηριακές δοκιμασίες που διεξήχθησαν ταυτόχρονα, καθώς και με χαρακτηριστικά από πρόσφατες βιοψίες ήπατος, όπου αυτές ήταν διαθέσιμες.

II. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Μελετήθηκαν **185 ασθενείς** (92 γυναίκες / 93 άντρες, μέση ηλικία 51 έτη, εύρος 17-81 έτη) με διάφορα χρόνια ηπατικά νοσήματα, οι οποίοι παρακολουθούνται στην Παθολογική Κλινική & Ομώνυμο Ερευνητικό Εργαστήριο του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Επιπλέον, ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν **54 υγιή άτομα** (31 γυναίκες και 23 άνδρες, μέση ηλικία 46 έτη, εύρος 22-86 έτη)

Όλοι οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν για το σκοπό της μελέτης και έδωσαν τη συγκατάθεσή τους για την αιμοληψία και την εξέταση του δείγματος.

Στους ασθενείς αυτούς αναλυτικά συμπεριλαμβάνονται:

- **48 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β** (19 γυναίκες / 29 άνδρες, μέση ηλικία 53 έτη, εύρος 20-81 έτη). Από αυτούς 29 παρουσίαζαν χρόνια ηπατίτιδα Β, ενώ οι υπόλοιποι 19 ήταν ανενεργοί φορείς του ιού.
- **41 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C** (20 γυναίκες / 21 άνδρες, μέση ηλικία 49 έτη, εύρος 21-80 έτη).
- **21 ασθενείς με μη-αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος** (8 γυναίκες / 13 άνδρες, μέση ηλικία 48 έτη, εύρος 17-75 έτη).
- **18 ασθενείς με αλκοολική νόσο του ήπατος** (0 γυναίκες / 18 άνδρες, μέση ηλικία 53 έτη, εύρος 38-74 έτη).
- **16 ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα** (11 γυναίκες και 5 άνδρες, μέση ηλικία 52 έτη, εύρος 20-75 έτη).
- **41 ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα του ήπατος**, πρωτοπαθής χολική κίρρωση ή πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (34 γυναίκες και 7 άνδρες, μέση ηλικία 53 έτη, εύρος 35-74 έτη).

Σχήμα (1). Ραβδόγραμμα όπου απεικονίζεται ο αριθμός των ασθενών ανά νόσημα.

Η **διάγνωση της χρόνιας ηπατίτιδας Β** βασίστηκε σε κλινικά, εργαστηριακά και ιστολογικά δεδομένα, όπως ορίστηκαν από την Ευρωπαϊκή Εταιρεία για τη Μελέτη του Ήπατος (403). Σύμφωνα με τους ορισμούς, HBV λοίμωξη χαρακτηρίζεται από την παρουσία του ιού στον ξενιστή. Η διάγνωση βασίζεται στην ανίχνευση του HBsAg ή του HBV DNA στον ορό ή σε ιστοτεμάχιο βιοψίας. Η σχετιζόμενη με τον HBV ενεργός ηπατική νόσος, τεκμηριώνεται από τις αυξημένες αμινοτρανσφεράσες στον ορό και/ή την ιστολογική εικόνα ηπατικής φλεγμονής που δε μπορεί να αποδοθεί σε άλλη αιτία. Η ανενεργός ηπατική νόσος χαρακτηρίζεται από φυσιολογικές τρανσαμινάσες και απούσες ή ελάχιστες ιστολογικές ενδείξεις φλεγμονής. Στην κατάσταση του HBsAg ανενεργού φορέα, τα HBsAg και anti-HBe είναι παρόντα στον ορό αλλά οι τρανσαμινάσες είναι επίμονα αρνητικές και υπάρχει ελάχιστη ή καθόλου νεκροφλεγμονώδης δραστηριότητα στη βιοψία ήπατος. Οι ασθενείς αυτοί έχουν πολύ χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα HBVDNA ($\text{HBVDNA} < 2000 \text{ IU/ml}$). Καθώς η διαφοροποίηση του ανενεργού φορέα από τον ασθενή με HBeAg αρνητική

χρόνια ηπατίτιδα Β απαιτεί διαδοχικές μετρήσεις, η διάγνωση της κατάστασης της ανενεργούς φορείας τίθεται μετά από παρακολούθηση των τρανσαμινασών και των επιπέδων του HBVDNA για ένα έτος (403).

Η **διάγνωση της χρόνιας ηπατίτιδας C** έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια της Ευρωπαϊκής Εταιρίας για τη μελέτη του Ήπατος (EASL Clinical Practice Guidelines for HCV) (404). Εν συντομία, οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη πληρούσαν τα παρακάτω κριτήρια: (α) ορολογική απόδειξη χρόνιας λοίμωξης από τον HCV, όπως αυτή ορίζεται από την ανίχνευση αντισωμάτων εναντίον του ιού (αντι-HCV) με ανοσοενζυμική μέθοδο δεύτερης ή τρίτης γενεάς (Murex Diagnostics, Temple Hill, Dartford, UK), τουλάχιστον δύο φορές μέσα σε έξι μήνες πριν την είσοδο στη μελέτη και (β) ενεργό πολλαπλασιασμό του ιού όπως ορίζεται από την ανίχνευση του HCV-RNA με τη χρήση της μεθόδου πραγματικού χρόνου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (real time PCR, Cobas Amplicor HCV Monitore test, Roche) ή με τη μέθοδο τροποποιημένης ενίσχυσης του προϊόντος μεταγραφής (transcription mediated amplification, TMA, Bayer).

Η **διάγνωση της μη-αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος** βασίστηκε στην παρουσία μεταβολικού συνδρόμου, τον αποκλεισμό άλλων αιτίων χρόνιας ηπατικής νόσου (ιογενή, αυτοάνοσα, φαρμακευτικά) συμπεριλαμβανομένου της χρήσης αλκοόλ και τη συμβατή βιοψία ήπατος (405).

Η **διάγνωση της αλκοολικής νόσου του ήπατος** βασίστηκε στο ιστορικό κατανάλωσης αυξημένης ποσότητας αλκοόλ, συμβατά εργαστηριακά ή/και ιστολογικά ευρήματα και τον αποκλεισμό άλλων αιτίων χρόνιας ηπατικής νόσου.

Η **διάγνωση της αυτοάνοσης ηπατίτιδας** ετέθη με βάση την παρουσία αυξημένων επιπέδων αμινοτρανσφερασών, αυξημένα επίπεδα ανοσοσφαιρίνης IgG, παρουσία αυτοαντισωμάτων και συμβατών ιστολογικών ευρημάτων. Σε όλους τους ασθενείς τόσο το αναθεωρημένο (283) όσο και το απλοποιημένο (284) score για τη διάγνωση της αυτοάνοσης ηπατίτιδας ήταν συμβατά με πιθανή ή βέβαιη αυτοάνοση ηπατίτιδα. Κατά τη συλλογή των δειγμάτων, όλοι οι ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα, πλην ενός, ελάμβαναν ανοσοκατασταλτική θεραπεία, δηλαδή πρεδνιζολόνη ή/και mycophenolate mofetil.

Οι ασθενείς με **πρωτοπαθή χολική κίρρωση** πληρούσαν τουλάχιστον 2 από τα 3 παρακάτω κριτήρια: αύξηση των χολοστατικών ενζύμων, βιοψία ήπατος με χαρακτηριστικές αλλοιώσεις για πρωτοπαθή χολική κίρρωση και ανίχνευση στον ορό των ασθενών αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων σε τίτλο $\geq 1:40$ (410). Τα αντισώματα προσδιορίστηκαν με in-house μέθοδο έμμεσου ανοσοφθορισμού σε υπόστρωμα ήπατος-στομάχου-νεφρού ποντικού. Επιπλέον, η παρουσία των αντιμιτοχονδριακών αυτοαντισωμάτων επιβεβαιώθηκε με εμπορικές ανοσοενζυμικές μεθόδους (ELISA) και in-house Western blot με αντιγόνο στόχο την E2 ενζυμική υπομονάδα της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης ή τη 2-κετοξική δεϋδρογενάση με διακλαδούμενη άλυσσο (279,285,406-410) .

Η **διάγνωση της πρωτοπαθούς σκληρυντικής χολαγγειίτιδας** βασίστηκε σε βιοχημικές και κλινικές ενδείξεις χολόστασης, συμβατή βιοψία ήπατος, επανειλημμένα αρνητικά αντιμιτοχονδριακά αντισώματα με έμμεσο ανοσοφθορισμό, Western blot ή ELISA και/ή τυπικά ευρήματα στην ενδοσκοπική παλίνδρομο χολαγγειοπαγκρεατογραφία ή στη μαγνητική χολαγγειοπαγκρεατογραφία (409-411). Κατά τη συλλογή των δειγμάτων, 9 ασθενείς δεν ελάμβαναν θεραπεία, ενώ οι υπόλοιποι 36 ελάμβαναν αρκτο-δεοξυχολικό οξύ (UDCA).

Η **ομάδα ελέγχου - control group** απαρτίσθηκε από 54 υγιείς εθελοντές αιμοδότες. Τα άτομα επιλέχθηκαν με βάση τη φυσιολογική κλινική εξέταση και τις φυσιολογικές ηπατικές δοκιμασίες. Ο έλεγχος για λοίμωξη από τους ιούς HCV, HBV και HIV ήταν αρνητικός. Επιπρόσθετα, δεν υπήρχε προηγούμενο ιστορικό ηπατοπάθειας ή/και χρόνιας κατανάλωσης οινοπνευματωδών. Ελήφθησαν πληροφορίες σχετικές με τους συνήθεις παράγοντες κινδύνου για ηπατικά νοσήματα πλήρες διαιτητικό και ιατρικό ιστορικό καθώς και πληροφορίες για τον τρόπο ζωής .

Κανένας από τους συμμετέχοντες στη μελέτη δεν ελάμβανε συμπληρώματα διατροφής που περιείχαν βιταμίνη Α, καθώς και αγωγή με φαρμακευτικούς παράγοντες που ενδέχεται να επιδρούν στο μεταβολισμό των ρετινοειδών, όπως αντισυλληπτικά δισκία, ρανιτιδίνη και αντιμυκητιασικά, για διάστημα τουλάχιστον δύο μηνών πριν από την ένταξή του στη μελέτη. Επίσης, τόσο οι ασθενείς όσο

και η ομάδα ελέγχου είχαν παρόμοια κοινωνική, οικονομική κατάσταση και διατροφικές συνήθειες.

B. ΒΙΟΨΙΕΣ ΗΠΑΤΟΣ

Ηπατική βιοψία ήταν διαθέσιμη σε 84 ασθενείς. Οι βιοψίες εκτιμήθηκαν με βάση το δείκτη ενεργότητας Knodell (412). Το score φλεγμονώδους δραστηριότητας προέκυψε από την άθροιση των score για την πυλαία, περιπυλαία και λοβιακή φλεγμονή (διακύμανση 0-18). Το score της ίνωσης ήταν 0 (χωρίς ίνωση), 1 (πυλαία ίνωση), 2 (πυλαία ίνωση με λίγα διαφραγμάτια), 3 (γεφυροποιός ίνωση) και 4 (κίρρωση) (412). Με βάση δημοσιεύσεις από την ομάδα μας (413,414), οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες με βάση τη φλεγμονώδη δραστηριότητα: 58 ασθενείς με ελάχιστη/ήπια (0-8) και 25 μέτρια/σοβαρή (9-18) δραστηριότητα, όπως επίσης με βάση την ίνωση: 70 ασθενείς με καθόλου/ήπια/μέτρια (0-8) και 14 με σοβαρή/κίρρωση (3-4).

Πίνακας (4). Διαχωρισμός των ασθενών με βάση το βαθμό ίνωσης στη βιοψία ήπατος.

ΙΝΩΣΗ	ΣΥΝΟΛΟ	ΑΙΗ	PBC/PSC	ALD	NAFLD	HBV	HCV
Ήπια/Μέτρια	70	5	24	3	7	15	16
Σοβαρή	14	3	2	0	0	5	4

Πίνακας (5) Διαχωρισμός των ασθενών με βάση το βαθμό ενεργότητας στη βιοψία ήπατος.

ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ	ΣΥΝΟΛΟ	ΑΙΗ	PBC/PSC	ALD	NAFLD	HBV	HCV
Ελάχιστη/Ήπια	58	5	22	2	4	12	13
Μέτρια/Σοβαρή	25	2	4	1	3	8	7

Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΩΝ

Γ.1. Χρωματογραφία-Γενικές αρχές

Χρωματογραφία είναι μία φυσικοχημική μέθοδος διαχωρισμού ουσιών, με την οποία οι ουσίες που πρόκειται να διαχωριστούν κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων. Η μία φάση είναι στατική, ενώ η άλλη είναι κινητή κατά μήκος της στατικής φάσεως. Πρόκειται για μία αναλυτική μέθοδος διαχωρισμού, ταυτοποίησης και προσδιορισμού ουσιών και μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις ουσίες που μπορούν να διαλυθούν ή να εξαερωθούν χωρίς την αλλαγή της χημικής τους σύστασης.

Εικόνα (3). Σχηματική απεικόνιση της διάταξης της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης

Στην Εικόνα 3 αποδίδεται σχηματικά η **διάταξη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης**. Στη θέση Α βρίσκεται ο διαλύτης ή το σύστημα διαλυτών, στη θέση Β η βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος το οποίο εισάγεται συνήθως με μικροσύριγγα (συνήθως 10μl) και στη θέση Γ βρίσκεται η προστήλη, η οποία περιέχει κόκκους μικρότερης διαμέτρου από την κύρια στήλη που βρίσκεται στη θέση Δ. Αποστολή της προστήλης είναι η προφύλαξη της κύριας στήλης από παρεμποδίσσεις, ενδεχομένως ο καθαρισμός του δείγματος και γενικά η διασφάλιση της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Στο σημείο Ε βρίσκεται ο ανιχνευτής, ο οποίος ανιχνεύει τα κλάσματα που φτάνουν στην κυψελίδα συνεχούς ροής. Αυτός με τη σειρά του συνδέεται με υπολογιστή (ΣΤ) που διαθέτει εκτυπωτή (Η) και μονάδα αποθήκευσης δεδομένων (Ζ). Η τεχνική της χρωματογραφίας στηρίζεται πάνω στη σχετική κίνηση των δύο φάσεων. Οι διάφορες ουσίες που είναι διαλυμένες στην κινητή φάση, εξαναγκάζονται σε κίνηση κατά μήκος της στατικής φάσεως, με μία ταχύτητα ανάλογη με τη σχετική τους συγγένεια προς τις ουσίες που αποτελούν τη στατική φάση. Η κινητή φάση

μπορεί να είναι υγρή ή αέρια, ενώ η στατική στερεά ή υγρή, με αποτέλεσμα να υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες χρωματογραφικών τεχνικών.

Σε κάθε χρωματογραφικό πείραμα, εισάγεται στην είσοδο της στήλης ένα δείγμα που περιέχει διάφορα συστατικά. Όλα τα συστατικά του δείγματος ξεκινούν την ίδια χρονική στιγμή από την ίδια θέση της στήλης, αλλά καθένα από αυτά κινείται με διαφορετική ταχύτητα λόγω του διαφορετικού συντελεστή κατανομής. Μετά από ορισμένο χρόνο, τα συστατικά του δείγματος βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις της χρωματογραφικής στήλης και έτσι διαχωρίζονται μεταξύ τους. Οι ουσίες εξέρχονται από τη στήλη ανάλογα με την πολικότητά τους σε σχέση με το εκλουστικό σύστημα. Γενικά, η κατανομή ενός συστατικού εξαρτάται από μία ισορροπία δυνάμεων ανάμεσα στα μόρια του συστατικού και στα μόρια της στατικής και της κινητής φάσης αντίστοιχα. Οι δυνάμεις αυτές μπορεί να οφείλονται σε έλξεις ιόντων, σε παροδικά ή μόνιμα ηλεκτρικά πεδία αλλά και σε δυνάμεις van der Waals ανάμεσα στα μόρια του συστατικού και σε αυτά του εκλουστικού συστήματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της παραπάνω τεχνικής είναι η χρωματογραφία σε χαρτί. Σε μια σταθερή θέση της χρωματογραφικής στήλης και συγκεκριμένα στην έξοδο της τα διάφορα συστατικά του δείγματος εμφανίζονται σε διαφορετικούς χρόνους και ανιχνεύονται από έναν ανιχνευτή. Η γραφική παράσταση της απόκρισης του ανιχνευτή έναντι του χρόνου καλείται χρωματογράφημα. Ο χρόνος που χρειάζεται ένα συστατικό για να διατρέξει όλο το μήκος της χρωματογραφικής στήλης ονομάζεται χρόνος συγκράτησης (retention time) και συμβολίζεται ως tR.

Αν όλα τα μόρια ενός συστατικού συμπεριφερόταν όπως τα μόρια που εξετάσαμε παραπάνω θα είχαμε μια ιδανική κατάσταση. Στην ιδανική χρωματογραφία, οι ζώνες των συστατικών που ονομάζονται επίσης και κορυφές έκλουσης (peaks) δεν παρουσιάζουν τάση διεύρυνσης και συνεπώς η κατανομή κάθε συστατικού με το χρόνο ή τον όγκο στην έξοδο είναι η ίδια με την κατανομή στην είσοδο. Επειδή δε η κατανομή εισόδου είναι συνήθως μια οξεία συμμετρική κορυφή, στο ιδανικό χρωματογράφημα θα εμφανίζονται οξείες συμμετρικές κορυφές που είναι διαχωρισμένες μεταξύ τους, ακόμη κι αν το δείγμα περιέχει πολλά συστατικά. Στην πραγματικότητα όμως η χρωματογραφία ποτέ δεν είναι ιδανική και οι ζώνες

των συστατικών, που στην είσοδο της στήλης είναι οξείες, διευρύνονται καθώς διέρχονται μέσα από τη στήλη. Το φαινόμενο της διερεύνησης των κορυφών έκλουσης έχει μελετηθεί από δυο θεωρίες, τη θεωρία των πλακών και τη θεωρία της ταχύτητας.

Το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό μιας χρωματογραφικής στήλης είναι η ικανότητα της να διαχωρίζει τα συστατικά ενός μείγματος με παρόμοιο χημικό χαρακτήρα. Η δυνατότητα αυτή εκφράζεται με τον όρο διαχωριστική ικανότητα (resolution). Για να βελτιώσουμε τη διαχωριστική ικανότητα μπορούμε, (α) να μεταβάλουμε τη θερμοκρασία ή τη φύση των φάσεων ώστε, να έχουμε μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ των κορυφών, (β) να ελαττώσουμε το πλάτος των κορυφών, βελτιώνοντας την απόδοση της στήλης και (γ) να συνδυάσουμε τις περιπτώσεις α και β, οπότε ο διαχωρισμός είναι περισσότερο ικανοποιητικός (415).

Γ.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance - Liquid Chromatography)

Σαν χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ορίζεται η μέθοδος διαχωρισμού ενός μίγματος στα συστατικά του, που λαμβάνει χώρα με διαδοχικές προσροφήσεις - εκροφήσεις ή κατανομές μεταξύ μιας στερεής ή υγρής στατικής φάσης με τη βοήθεια πίεσης μεγαλύτερης από την ατμοσφαιρική. Τα φυσικοχημικά φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά το διαχωρισμό μπορεί να είναι: προσρόφηση, κατανομή, ιοντοανταλλαγή. Η HPLC έχει προέλθει από τη σύμπραξη τριών ερευνητικών περιοχών (της χημικής τεχνολογίας, της τεχνολογίας ανιχνευτών και της διαχείρισης δεδομένων). Η υγρή χρωματογραφία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για δείγματα με μεγάλα μόρια ή ιονισμένα σωματίδια με χαμηλές τάσεις ατμών και για θερμικά ασταθείς ενώσεις που δε μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν (416). Η μεγαλύτερη απόδοση στην υγρή χρωματογραφία επιτυγχάνεται με χαμηλές ταχύτητες ροής, που συνεπάγονται μεγάλη διάρκεια διαχωρισμού, με την εφαρμογή υψηλής πίεσης και τη χρήση μικρότερων σωματιδίων σαν υλικών πλήρωσης της στήλης. Το εύρος ροής στην

υγρή χρωματογραφία είναι από 0.1 έως 1 ml/min και επιτυγχάνεται με αντλίες που λειτουργούν σε πιέσεις 300 - 7500 psi. Οι συνηθισμένες στήλες με υλικό πλήρωσης 5 μ m, λειτουργούν με ροή 1 ml/min και πιέσεις 1000 - 2000 psi.

Εικόνα (4). Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, HPLC DIONEX P680.

Η έκλουση γίνεται είτε ισοκρατικά όπου η σύσταση της κινητής φάσης δε μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, είτε βαθμιδωτά όπου η ισχύς της κινητής φάσης μεταβάλλεται επιτυγχάνοντας καλύτερο διαχωρισμό. Με την ισοκρατική έκλουση όταν το δείγμα περιέχει πολλά συστατικά είναι δύσκολο να διαχωριστεί, ενώ παράλληλα τα συστατικά του δείγματος που συγκρατούνται ισχυρά από τη στήλη, εκλούνται πολύ αργά με αποτέλεσμα τη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών τους. Με τη βαθμιδωτή έκλουση γίνεται ανάμειξη ενός δείγματος με έναν ισχυρό διαλύτη σε ποσοστά που μπορεί να μεταβάλλονται με το χρόνο, με την περιεκτικότητα του ισχυρού διαλύτη διαρκώς αυξανόμενη. Έτσι διαχωρίζονται στην αρχή οι ουσίες που έχουν μικρό χρόνο συγκράτησης στη στήλη και με την αύξηση της ισχύος εκλούνται καλύτερα και όσες συγκρατούνται για περισσότερο χρόνο (416).

Η κινητή φάση είναι μίγμα δύο ή περισσότερων διαλυτών (συνήθως μέχρι 4) με ή χωρίς προσθήκη πρόσθετων ουσιών (π.χ. ρυθμιστικά διαλύματα). Οι παράμετροι

για την επιλογή των κατάλληλων διαλυτών είναι η πολικότητα και η εκλεκτικότητά τους. Η επιλογή της κινητής φάσης γίνεται έτσι ώστε να διαφέρει η πολικότητά της από αυτή της στατικής φάσης, ώστε να υπάρχει ικανοποιητικός διαχωρισμός στα συστατικά του δείγματος που αναλύεται. Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, η ισχύς της κινητής φάσης αυξάνεται με την αύξηση της πολικότητάς της, ενώ στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης συμβαίνει το αντίθετο. Η εκλεκτικότητα του διαλύτη εξαρτάται από την ικανότητά του να δρα ως πρωτονιοδέκτης, πρωτονιοδότης ή με ισχυρές διπολικές ροπές σε σχέση με τις διάφορες ουσίες (416).

Οι στήλες κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα έχουν συνήθως μήκος 25 cm, εσωτερική διάμετρο 4.6 mm και είναι πληρωμένες με μικρά σωματίδια στατικής φάσης παρόμοιου μεγέθους (3-10 μm). Η πορώδης ουσία χρησιμοποιείται ως μια στερεή ακίνητη φάση ή καλύπτεται με ένα πολύ λεπτό στρώμα υγρής ακίνητης φάσης με πολύ μεγάλο εμβαδόν επιφάνειας. Η χρωματογραφία κανονικής φάσης γίνεται με στήλες προσρόφησης silica ή με προσδεσμένη στατική φάση (CN, NH_2 , OH), η οποία έχει μεγαλύτερη επαναληψιμότητα και ανταποκρίνεται ταχύτερα σε αλλαγές της σύστασης της κινητής φάσης. Στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης χρησιμοποιούνται στήλες με στατική φάση που περιέχει χημικά προσδεσμένη πλευρική αλυσίδα C_8 ή C_{18} ή C_1 , C_4 , C_{12} , CN, NO_2 , C_6H_5 , $(\text{OH})_2$. (417).

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται είναι οι παρακάτω: (1) Ανιχνευτής UV-VIS ο οποίος είναι ευαίσθητος στην περιοχή 10-6 έως 10-10 g/ mL για αρκετές ενώσεις. (2) Ανιχνευτής σειράς φωτοδιοδίων (photodiode array) στον οποίο διέρχεται πολυχρωματική ακτινοβολία από την κυψελίδα του ανιχνευτή, η προκύπτουσα ακτινοβολία διαθλάται και στη συνέχεια προσπίπτει σε σειρά φωτοδίοδων. Κάθε μία φωτοδίοδος δέχεται μία διαφορετική δέσμη με μικρό εύρος μήκους κύματος. Όλη η σειρά των δίοδων «σαρώνεται» πολλές φορές το δευτερόλεπτο από έναν μικροεπεξεργαστή και το προκύπτον φάσμα προβάλλεται σε οθόνη και ταυτόχρονα αποθηκεύεται στη μνήμη ηλεκτρονικού υπολογιστή για μετέπειτα εκτύπωση σε καταγραφικό. Ο υπολογιστής επιτρέπει την ταυτοποίηση της ουσίας συγκρίνοντας το φάσμα της με τα φάσματα που διαθέτει σε ειδικά αρχεία -

βιβλιοθήκη. Η ανίχνευση μπορεί να γίνει σε ένα ή περισσότερα μήκη κύματος ταυτόχρονα, ενώ η καθαρότητα μιας χρωματογραφικής κορυφής, δηλαδή το κατά πόσον πρόκειται για μία ουσία ή όχι μπορεί να ελεγχθεί από τους λόγους των απορροφήσεων σε επιλεγμένα μήκη κύματος (πχ. 254 nm και 280 nm). (3) Ανιχνευτές φθορισμού: Φθορισμός είναι ως γνωστόν η ιδιότητα ορισμένων ουσιών που όταν απορροφούν UV ακτινοβολία, αυτομάτως εκπέμπουν ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος, ενώ εάν η εκπομπή συμβεί με χρονική καθυστέρηση το φαινόμενο ονομάζεται φωσφορισμός. Κατάλληλες για ανίχνευση με φθορισμό είναι ουσίες, που εκπέμπουν σημαντικό ποσοστό της ακτινοβολίας που έχουν απορροφήσει. Οι φυσικά φθορίζουσες ουσίες είναι λίγες και είναι αυτές με συζυγή κυκλική δομή, όπως οι πολυτυρηνικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, ενώ ουσίες που δε φθορίζουν μπορούν να ανιχνευθούν με φθορισμό αφού πρώτα μετατραπούν με κατάλληλη αντίδραση σε φθορίζον παράγωγο. Οι ανιχνευτές φθορισμού είναι 2 με 3 τάξεις μεγέθους πιο ευαίσθητοι από τους ανιχνευτές UV, ενώ παρουσιάζουν μεγάλη εκλεκτικότητα, αφού οι περισσότερες ουσίες δε φθορίζουν. (4). Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές: μετράνε είτε την αγωγιμότητα της κινητής φάσης (ανιχνευτές αγωγιμότητας), είτε το ρεύμα που σχετίζεται με τη οξείδωση ή την αναγωγή του δείγματος (αμπερομετρικοί ή κουλομετρικοί ανιχνευτές). Οι ανιχνευτές αγωγιμότητας βρίσκουν εφαρμογή στην ανίχνευση των ιόντων μετά από διαχωρισμό με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων. Επειδή η κινητή φάση έχει υψηλή αγωγιμότητα έχουν βρεθεί χημικοί και ηλεκτρονικοί τρόποι για να μην παρεμποδίζεται η μέτρηση (415,418-421).

Γ.3. Ειδικά χαρακτηριστικά της μεθόδου

Τα τεχνικά χαρακτηριστικά της μεθόδου που ακολουθήσαμε είναι τα παρακάτω:

- Υγρή εκχύλιση - αποπρωτεϊνοποίηση με ακετονιτρίλιο
- Φυγοκέντρηση
- Έγχυση 100 μl του υπερκειμένου στο σύστημα χρωματογραφίας
- Στήλη Betabasic C₁₈
- Ισοκρατική έκλουση.

- Διαλύτης: Ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, τετραϋδροφουράνιο και οξικό νάτριο 100 mM ρυθμισμένο σε pH 5.4 με οξικό οξύ (αναλογία 43:35:7:15 κατ'όγκο).
- Ανίχνευση στα 350 nm

Γ.4. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η συλλογή των δειγμάτων αίματος πραγματοποιήθηκε μεταξύ 8:00 – 11:00 π.μ., ενώ είχε προηγηθεί νηστεία 12 ωρών. Τα δείγματα ελήφθησαν με φλεβοκέντηση και χρήση σωλήνων κενού χωρίς EDTA. Οι συλλέκτες καλύφθηκαν με φύλλο αλουμινίου, ώστε το περιεχόμενο τους να προστατευθεί από το ηλιακό φως και τοποθετήθηκαν στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C. Το αργότερο σε χρονικό διάστημα 60 min έγινε φυγοκέντρηση για 10 min, στις 4000 στροφές/min, σε θερμοκρασία 4°C και με αυτό τον τρόπο ελήφθη ο ορός. Aliquots των 500 μl συλλέχθηκαν σε πλαστικά erpendorfs και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20°C, μέχρι την πραγματοποίηση των μετρήσεων.

Γ.5. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΩΝ ΜΕ HPLC

Ολόκληρη η διαδικασία έλαβε χώρα σε σκοτεινό χώρο. Αρχικά, 500 μl του εξεταζόμενου ορού αναμείχθηκαν με 500 μl ακετονιτρίλιο και αναδεύθηκαν σε αναδευτήρα vortex για 2 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στις 4000 στροφές/min, σε θερμοκρασία 4°C. Η διάταξη HPLC διέθετε σύστημα αυτόματης έγχυσης. Ακολούθως, 200 μl του καθαρού υπερκείμενου μεταφέρθηκαν σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια autosampler, συμβατά με το προαναφερθέν σύστημα. Τα φιαλίδια πωματίστηκαν και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο δειγμάτων του αυτόματου εγχυτή και από εκεί 100 μl του δείγματος εγχύθηκαν στο σύστημα HPLC για ανάλυση. Η κινητή φάση αποτελούνταν από μείγμα ακετονιτρίλιου, μεθανόλης, τετραϋδροφουρανίου και οξικού νατρίου 100 mM ρυθμισμένου σε pH 5.4 με οξικό οξύ (43:35:7:15 κατ'όγκο). Η ανάλυση έγινε κάτω από ισοκρατικές συνθήκες και με ρυθμό ροής 1 ml/min. Ένας ευαίσθητος ανιχνευτής με μήκος κύματος τα 350 nm παρακολουθούσε το έκλυμα. Το

σύστημα χρωματογραφίας ελεγχόταν μέσω ειδικού λογισμικού. Οι χρόνοι ανάκτησης των 13-cis RA, 9-cis RA, all-trans RA, ρετινόλης και all-trans ρετινάλης ήταν 8.36, 8.34, 9.54, 13.5 και 14.5 λεπτά αντίστοιχα, ενώ ο διαχωρισμός τους ήταν απόλυτα ικανοποιητικός (422).

Εικόνα (5): Ρυθμιστικά γραφήματα (calibration graphs) για τα οξέα (9-cis, 13-cis, all-trans) και τη ρετινόλη. Παρατηρείται καλή γραμικότητα για όλα τα ρετινοειδή.

Εικόνα (6): Διαχωρισμός των επιλεγμένων ρετινοειδών με ισοκρατική φυσιολογικής φάσης HPLC

A) Ορός εμπλουτισμένος με ρετινοειδή σε υψηλή συγκέντρωση (RA: 50 ngr/ml, Retinol: 5000 ngr/ml) B) Ορός εμπλουτισμένος με ρετινοειδή σε χαμηλή συγκέντρωση (RA: 5 ngr/ml, Retinol: 500 ngr/ml) επικαλυμμένο με σκέτο ορό. C) Ορός εμπλουτισμένος με ρετινοειδή σε χαμηλή συγκέντρωση (RA: 5 ngr/ml, Retinol: 500 ngr/ml) επικαλυμμένο με σκέτο ορό σε μεγαλύτερη μεγέθυνση, όπου φαίνονται τα λεπτά 6-11 του χρωματογραφήματος για τον καλύτερο προσδιορισμό των οξέων. Όλα τα χρωματογραφήματα ανιχνεύθηκαν στα 350 nm.

Παράλληλα με τον προσδιορισμό των ρετινοειδών, επιπλέον αίμα ελήφθη και χρησιμοποιήθηκε για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό, με τις συνήθεις τεχνικές, των ακόλουθων εργαστηριακών παραμέτρων: αλβουμίνη, AST, ALT, γ-GT, INR, χολερυθρίνη, χοληστερόλη, αλκαλική φωσφατάση.

Επίσης αξιολογήθηκαν οι παρακάτω παράμετροι από το ιστορικό των ασθενών: ηλικία, φύλο, έκβαση - κατάσταση της λοίμωξης (για ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες), το Child-Pugh score, τα ιστολογικά ευρήματα (φλεγμονώδη δραστηριότητα και ίνωση) σε βιοψία που διεξήχθη σε κοντινό χρονικό διάστημα με την αιμοληψία.

Δ.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όλοι οι στατιστικοί υπολογισμοί έγιναν με τη χρήση προγράμματος SPSS. Οι ποσοτικοί παράμετροι εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ σταθερή απόκλιση ($\text{mean} \pm \text{SD}$) ή διάμεση τιμή (εύρος μεταξύ 25^{ης} – 75^{ης} εκατοστιαίας θέσης, *interquartile range*) ανάλογα εάν ακολουθούν κανονική κατανομή ή όχι. Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι, ανάλογα όπου ήταν εφαρμόσιμες: *Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney*, *unpaired t-test*, *Pearson's coefficient of correlation* ή *Spearman's coefficient of correlation* και *multiple linear regression analysis*. Στατιστικά σημαντική διαφορά θεωρήθηκε εκείνη όπου η διπλής κατεύθυνσης τιμή του P ήταν μικρότερη του 0.05 ($P < 0.05$).

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δημογραφικά, επιδημιολογικά, κλινικά, εργαστηριακά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών κατά τη στιγμή του προσδιορισμού των ρετινοειδών παρουσιάζονται στον πίνακα (6).

Πίνακας (6). Δημογραφικά, επιδημιολογικά, κλινικά, εργαστηριακά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

	HBV (n=48)	HCV (n=41)	NAFLD (n=21)	ALCOHOL (n=18)	AIH (n=16)	PBC/PSC (n=41)	TOTAL (n=185)	HEALTHY (n=54)
Φύλο (Θ/Α)	19/29	20/21	8/13	0/18	11/5	34/7	92/93	31/23
Ηλικία	52±13	49±19	48±15	53±10	52±16	53±10	51±15	46±24
AST (IU/L)	27 (13)	31 (32)	32 (20)	35 (24)	40 (32)	26 (10)	29 (33)	21 (5)
ALT IU/L	30 (25)	46 (38)	60 (59)	33 (20)	44 (90)	31 (24)	35 (36)	19 (12)
γGT U/L	22 (14)	27 (23)	37 (45)	74 (102)	34 (54)	30 (54)	28 (38)	14 (7)
ALP U/L	65 (27)	63 (28)	84 (32)	91 (43)	72 (65)	103 (72)	74 (44)	69 (24)
albumin g/dL	4.2 (0.5)	4.1 (0.6)	4.7 (0.5)	4.2 (0.9)	4.2 (0.7)	4.3 (0.5)	4.3 (0.6)	4.3 (0.3)
total bilirubin mg/dL	0.7 (0.3)	0.8 (0.8)	0.8 (0.5)	1.4 (1.1)	0.8 (0.3)	0.7 (0.3)	0.8 (0.4)	0.5 (0.2)
INR	1 (0.2)	1.1 (0.2)	1 (0.15)	1.3 (0.6)	1.1 (0.3)	1 (0.2)	1.1 (0.2)	n.a.
PLT (x10 ³ /μl)	193±63	216±78	246±49	151±69	161±71	239±77	208±75	236±45
Cholesterol mg/dL	200±43	163±39	214±56	190±47	208±89	223±51	199±49	204±42
HDL mg/dL	49 (22)	47 (28)	47 (18)	49 (17)	59 (22)	65 (29)	55 (24)	52 (15)
LDL mg/dL	125±39	96±30	136±52	118±37	133±50	138±43	124±41	132±35
Triglycerides mg/dL	114 (78)	94 (59)	119 (90)	95 (51)	89 (67)	105 (86)	100 (70)	85 (60)
Βιοψία ήπατος (ναι/όχι)	20/28	20/21	7/14	3/15	8/8	26/15	84/101	n.a.
Νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα (ελάχιστη/ήπια) vs (μέτρια/σοβαρή)	12/8	13/7	4/3	2/1	5/2	22/4	58/25	n.a.
Ίνωση (καθόλου/ήπια/μέτρια) vs (σοβαρή/κίρρωση)	15/5	16/4	7/0	3/0	5/3	24/2	70/14	n.a.
Cirrhosis (yes/no)	4/44	5/36	0/21	7/11	8/8	4/37	28/157	n.a.
Child-Pugh Score (A/B/C)	2/2/0	3/1/1	0/0/0	3/4/0	5/3/0	3/1/0	16/11/1	n.a.

Οι ποσοτικές παράμετροι που ακολουθούν κανονική κατανομή εκφράζονται ως mean±SD, ενώ οι ποσοτικές τιμές που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή ως median (IQR).

Τα επίπεδα των ρετινοειδών συνολικά αλλά και για κάθε υπό ομάδα μελέτη παρουσιάζονται στον πίνακα (7) και στα σχήματα (2),(3),(4)

Πίνακας (7). Συγκεντρώσεις των ρετινοειδών

	HBV	HCV	NAFLD	ALCOHOL	AIH	PBC/PSC	TOTAL	HEALTHY
Retinol (ng/ml)	370±160	378±215	455±171	258±203	345±165	480±214	383±194	351±214
13-cis- retinoic acid (ng/ml)	1.68±0.96	1.19±0.96	1.31±0.95	0.79±0.74	0.99±0.48	1.46±0.93	1.65±1.41	2.7±2.18
all-trans- retinoic acid (ng/ml)	3.02±1.68	2.81±1.07	3.34±1.88	2.30±1.26	2.45±0.77	2.08±0.71	2.97±1.48	3.90±1.49

ΣΧΗΜΑ (2). Σύγκριση των επιπέδων της ρετινόλης μεταξύ των διάφορων ομάδων ασθενών και των υγιών μαρτύρων. (ALD= αλκοολική ηπατοπάθεια, NAFLD= λιπώδης διήθηση μη αλκοολικής αιτιολογίας, AIH= αυτοάνοση ηπατίτις, PBC= πρωτοπαθής χολική κίρρωση, PSC= πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτις, HBV= HBV λοίμωξη, HCV= HCV λοίμωξη, HEALTHY= ομάδα ελέγχου.

Παρατηρούμε πως οι αλκοολικοί ασθενείς έχουν τα χαμηλότερα επίπεδα ρετινόλης (258 ± 203 ng/ml) και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με τους πάσχοντες από ιογενείς ηπατίτιδες (έναντι της HBV ομάδας, $p=0.021$, έναντι της HCV ομάδας $p=0.05$) μη αλκοολική λιπώδη νόσο ($p=0.02$) και αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα ($p<0.01$). Αντίστροφα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ρετινόλης παρατηρούνται στους πάσχοντες από PBC/PSC και NAFLD, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές σε όλες τις υπόλοιπες κατηγορίες ασθενών για όσους πάσχουν από PBC/PSC και σε όλες τις υπόλοιπες κατηγορίες ασθενών εκτός από την ομάδα των πασχόντων από HCV, για τους ασθενείς με NAFLD.

ΣΧΗΜΑ (3). Σύγκριση των επιπέδων του 13-cis-RA μεταξύ των διάφορων ομάδων ασθενών και των υγιών μαρτύρων. (ALD= αλκοολική ηπατοπάθεια, NAFLD= λιπώσδης διήθηση μη αλκοολικής αιτιολογίας, AIH= αυτοάνοση ηπατίτις, PBC= πρωτοπαθής χολική κίρρωση, PSC= πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτις, HBV= HBV λοίμωξη, HCV= HCV λοίμωξη, HEALTHY= ομάδα ελέγχου.

Οι υγιείς έχουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις 13-cis-RA (2.7 ± 2.18 ng/ml) με στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες

ασθενών (έναντι HBV $p=0.002$, έναντι HCV $p<0.001$, έναντι NAFLD $p<0.001$, έναντι ALD $p<0.001$, έναντι AIH $p<0.001$, έναντι PBC/PSC $p<0.001$). Οι αλκοολικοί ασθενείς έχουν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0.79 ± 0.74 ng/ml), με στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες ασθενών (έναντι HBV $p<0.001$, έναντι NAFLD $p=0.01$, έναντι PBC/PSC $p=0.014$) πλην των πασχόντων από AIH και HCV οι οποίοι έχουν οριακά υψηλότερες τιμές από τους αλκοολικούς, αλλά σημαντικά χαμηλότερες από τους πάσχοντες από HBV (έναντι HCV $p=0.007$, έναντι AIH $p<0.009$) που έχουν τις δεύτερες υψηλότερες τιμές (1.68 ± 0.96 ng/ml).

ΣΧΗΜΑ (4). Σύγκριση των επιπέδων του ATRA μεταξύ των διάφορων ομάδων ασθενών και των υγιών μαρτύρων. (ALD= αλκοολική ηπατοπάθεια, NAFLD= λιπώσης διήθηση μη αλκοολικής αιτιολογίας, AIH= αυτοάνοση ηπατίτις, PBC= πρωτοπαθής χολική κίρρωση, PSC= πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτις, HBV= HBV λοίμωξη, HCV= HCV λοίμωξη, HEALTHY= ομάδα ελέγχου.

Οι υγιείς έχουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ATRA (3.90 ± 1.49 ng/ml) με στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες ασθενών (έναντι HBV $p < 0.001$, έναντι HCV $p < 0.001$, έναντι ALD $p < 0.001$, έναντι NAFLD $p = 0.044$ έναντι AIH $p < 0.001$, έναντι PBC/PSC $p < 0.001$). Οι ασθενείς με PBC/PSC έχουν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (2.08 ± 0.71 ng/ml), αν και είναι η ομάδα με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ρετινόλης (480 ± 214 ng/ml), με στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες ασθενών (έναντι HBV $p < 0.001$, έναντι HCV $p < 0.002$, έναντι NAFLD $p < 0.001$) πλην των πασχόντων από AIH και αλκοολική νόσο, οι οποίοι έχουν οριακά υψηλότερες τιμές από τους πάσχοντες από χολοστατικά νοσήματα.

Όσον αφορά το βαθμό της νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας και το βαθμό της ίνωσης όπως αυτά καθορίστηκαν μετά από βιοψία ήπατος δεν βρέθηκαν διαφορές σχετικά με τις συγκεντρώσεις των ρετινοειδών (Πίνακας 8).

Πίνακας (8). Τιμές των ρετινοειδών σε σχέση με τα ιστοπαθολογικά ευρήματα.

	ΝΕΚΡΟΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ			ΙΝΩΣΗ		
	ελάχιστη/ήπια	μέτρια/σοβαρή	p-value	καθόλου/ελάχιστη/μέτρια	σοβαρή/κίρρωση	p-value
Retinol (ng/ml)	424±173	419±139	0.890*	427±170	380±129	0.326*
13-cis-RA (ng/ml)	1.3 (1.2)	1.3 (1.1)	0.743**	1.4 (1.0)	1 (1.6)	0.223**
all-trans RA (ng/ml)	2.5 (1.7)	2.8 (2.1)	0.230**	2.7 (1.5)	2 (1.9)	0.227**

*t-test, **Mann-Whitney test

Αντιθέτως, όταν η διάγνωση της κίρρωσης βασίστηκε εκτός από τα παθολογοανατομικά και σε κλινικο-εργαστηριακά ευρήματα παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση της ρετινόλης και του 13-cis-RA και οριακές διαφορές στη συγκέντρωση του ATRA μεταξύ κίρρωτικών και μη κίρρωτικών ασθενών (Πίνακας 9). Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα της ρετινόλης ήταν σημαντικά υψηλότερα στους μη κίρρωτικούς ασθενείς σε σύγκριση με τους κίρρωτικούς (404 ± 186 ng/ml έναντι 328 ± 188 ng/ml, $p = 0.047$). Αντίστοιχα, τα επίπεδα του 13-cis-RA ήταν σημαντικά χαμηλότερα στους κίρρωτικούς [0.8 (0.35) ng/ml έναντι 1.2 (1.0) ng/ml, $p < 0.001$], ενώ υπήρχε μικρή διαφορά και στα επίπεδα του ATRA [2.5 (1.5) ng/ml έναντι 2.3 (1.2) ng/ml, $p = 0.113$].

Πίνακας (9). Τιμές των ρετινοειδών σε σχέση με την ύπαρξη κίρρωσης.

	ΚΙΡΡΩΣΗ		
	όχι (n=157)	ναι (n=28)	p-value
retinol (ng/ml)	404±186	328±188	0.047*
13-cis-RA (ng/ml)	1.2 (1.0)	0.8 (0.35)	<0.001**
all-trans RA (ng/ml)	2.5 (1.5)	2.3 (1.2)	0.113**

*t-test, **Mann-Whitney test

Στην υποομάδα των κίρρωτικών παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση της ρετινόλης μεταξύ κίρρωτικών ασθενών τάξης A κατά CHILD-PUGH σε σύγκριση με τους ασθενείς που ανήκουν στις κατηγορίες B/C (Πίνακας 10). Οι ασθενείς που ανήκουν στην κατηγορία A έχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ρετινόλης [374 (210) ng/ml έναντι 153 (71) ng/ml, p<0.001].

Πίνακας (10). Τιμές των ρετινοειδών σε σχέση με τη βαθμολογία κατά CHILD-PUGH

	CHILD-PUGH SCORE		
	A (n=16)	B/C (n=13)	p-value
Retinol (ng/ml)	374 (210)	153 (71)	<0.001*
13-cis-RA (ng/ml)	0.7 (0.4)	0.9 (0.4)	0.110*
all-trans RA (ng/ml)	2.5 (1.2)	2.2 (1.4)	1.000*

*Mann-Whitney test

Πίνακας (11). Τιμές των ρετινοειδών σε σχέση με δείκτες ηπατικής λειτουργίας

	retinol*	13-cis-RA	all-trans-RA
albumin*	p=0.002, r=0.230	n.s.	n.s.
AST	p=0.05, r=-0.146	n.s.	n.s.
ALT	n.s.	n.s.	n.s.
γGT	n.s.	n.s.	n.s.
ALP	n.s.	n.s.	p<0.001, r=-0.273
INR	p<0.001, r=-0.358	n.s.	n.s.
bilirubin	p=0.006, r=-0.203	p=0.003, r=-0.221	n.s.
cholesterol*	p<0.001, r=0.318	p=0.015, r=0.181	n.s.

*normal distribution Οι συσχετίσεις μεταξύ παραμέτρων με κανονική κατανομή έγινε κατά Pearson, ενώ για τις παραμέτρους με μη-κανονική κατανομή έγινε κατά Spearman.

Από τον Πίνακα 11 προκύπτει ότι υπάρχει θετική συσχέτιση των επιπέδων των ρετινοειδών με τη βιοσυνθετική ικανότητα του ήπατος. Ειδικότερα, υπάρχει θετική συσχέτιση των επιπέδων της ρετινόλης με τα επίπεδα της αλβουμίνης (p=0.002,

$r=0.230$) και της χοληστερόλης ($p<0.001$, $r=0.318$) και αρνητική συσχέτιση των επιπέδων της ρετινόλης με τα επίπεδα της AST ($p=0.05$, $r=-0.146$), της χολερυθρίνης ($p=0.006$, $r=-0.203$) και των τιμών του INR ($p<0.001$, $r=-0.358$). Για το 13-cis-RA παρατηρείται θετική συσχέτιση των επιπέδων του με επίπεδα της χοληστερόλης ($p=0.015$, $r=0.181$) και αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα της χολερυθρίνης ($p=0.003$, $r=-0.22$). Όσον αφορά το all-trans-RA, υπάρχει αρνητική συσχέτιση των τιμών του συγκριτικά με αυτές της αλκαλικής φωσφατάσης($p<0.001$, $r=-0.273$).

Σχήμα (5). Τιμές της ρετινόλης σε συσχέτιση με τη χοληστερόλη.

Σχήμα (6). Τιμές της ρετινόλης σε συσχέτιση με την αλβουμίνη.

Σχήμα (7). Τιμές του 13-cis RA σε συσχέτιση με την χοληστερόλη.

ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Πίνακας (12). Πολυπαραγοντική ανάλυση των τιμών της ρετινόλης σε σχέση με δείκτες ηπατικής λειτουργίας.

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	517.373	161.328		3.207	.002
	albumin	.533	30.571	.001	.017	.986
	ast	-.717	.335	-.162	-2.141	.034
	inr	-190.706	60.663	-.249	-3.144	.002
	total_bili	-27.284	18.767	-.114	-1.454	.148
	chol	.768	.297	.201	2.586	.011

a. Dependent Variable: retinol

Πολυπαραγοντική ανάλυση (multiple linear regression analysis) έδειξε ότι παραμένει η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ρετινόλης και των AST, INR, χολερυθρίνης και χοληστερόλης. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές του Beta ήταν : - 0.162 για την AST, -0.249 για το INR, - 0.114 για τη χολερυθρίνη και 0.201 για τη χοληστερόλη.

Πίνακας (13). Πολυπαραγοντική ανάλυση των τιμών του 13-cis-RA σε συσχέτιση με δείκτες ηπατικής λειτουργίας.

Coefficients ^a					
Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1 (Constant)	1.231	.290		4.238	.000
total_bili	-.202	.073	-.208	-2.764	.006
chol	.001	.001	.084	1.115	.267

a. Dependent Variable: cis.RA.13

Στην ομάδα των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα B έγινε σύγκριση των τιμών στους ανενεργούς φορείς vs ατόμων με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα B.

Πίνακας (14). Σύγκριση των ρετινοειδών μεταξύ χρονίως πασχόντων και ανενεργών φορέων

	Hepatitis B Virus Infection		
	Inactive carriers (n=19)	Active carriers (n=29)	p-value
retinol	455 (177)	341 (281)	0.043*
13-cis-RA	1,18 (1,63)	1.49 (1.7)	0.209*
all-trans RA	2.4 (1.1)	3 (1)	0.168*

*Mann-Whitney

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της ρετινόλης μεταξύ ανενεργών φορέων και ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα B. Στα επίπεδα των οξέων δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές.

Συνοπτικά, μετρήθηκαν για πρώτη φορά τα επίπεδα των ρετινοϊκών οξέων σε ασθενείς με χρόνιες ηπατοπάθειες και βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα σε σύγκριση με τους υγιείς.

Επίσης, για πρώτη φορά μετρήθηκαν τα επίπεδα ρετινόλης ταυτόχρονα σε ασθενείς με χρόνιες ηπατοπάθειες και έγιναν συγκρίσεις και συσχετίσεις μεταξύ ασθενών με διαφορετικά νοσήματα του ήπατος, όπως επίσης και μεταξύ ασθενών και υγιών.

Προέκυψε πως η συγκέντρωση της ρετινόλης δε συσχετίζεται με αυτή των οξέων, καθώς και οι ομάδες ασθενών με σημαντικά υψηλότερες τιμές ρετινόλης από

τους υγιείς, δηλαδή οι πάσχοντες από PBC και NAFLD, είχαν χαμηλές τιμές οξέων σε σύγκριση με τους υγιείς, αλλά και διαφορετικές μεταξύ τους, επομένως οι συγκεντρώσεις των οξέων δεν εξαρτώνται από τα επίπεδα ρετινόλης .

Η ρετινόλη και το 13-cis RA είναι χαμηλότερα στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς, ενώ ασθενείς με μεγαλύτερη βαθμολογία κατά CHILD-PUGH έχουν χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης A.

Τέλος, προέκυψε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση των επιπέδων των ρετινοειδών με τη βιοσυνθετική ικανότητα του ήπατος και στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της ρετινόλης μεταξύ ανενεργών φορέων και ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β, χωρίς σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των οξέων.

IV.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ταυτόχρονη μέτρηση για πρώτη φορά των επιπέδων της ρετινόλης και των ρετινοϊκών οξέων σε ασθενείς με χρόνιες ηπατοπάθειες και υγιείς εθελοντές και οι συγκρίσεις μεταξύ ασθενών με διάφορα ηπατικά νοσήματα, και μεταξύ ασθενών και υγιών, οδηγούν σε χρήσιμα συμπεράσματα. Σε όλες τις κατηγορίες ηπατοπαθών οι τιμές των οξέων ήταν σημαντικά χαμηλότερες από αυτές των υγιών, ακόμη και σε ηπατικά νοσήματα (PBC και NAFLD) με συγκεντρώσεις ρετινόλης υψηλότερες της ομάδας ελέγχου, γεγονός που καταδεικνύει πως οι συγκεντρώσεις των οξέων δε συνδέονται με αυτές της ρετινόλης.

Παρατηρήθηκε επίσης πως οι κίρρωτικοί ασθενείς είχαν χαμηλότερα επίπεδα ρετινόλης και 13-cis RA σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς, ενώ ασθενείς με μεγαλύτερη βαθμολογία κατά CHILD-PUGH είχαν χαμηλότερες τιμές ρετινόλης. Υπάρχει θετική συσχέτιση των επιπέδων των ρετινοειδών με τη βιοσυνθετική ικανότητα του ήπατος, δηλαδή θετική συσχέτιση των επιπέδων της ρετινόλης με τα επίπεδα της αλβουμίνης και της χοληστερόλης και αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα της AST, της χολερυθρίνης και των τιμών του INR. Όσον αφορά το 13-cis-RA παρατηρείται θετική συσχέτιση των επιπέδων του με τα επίπεδα της χοληστερόλης και αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα της χολερυθρίνης, ενώ για το all-trans-RA, υπάρχει αρνητική συσχέτιση των τιμών του συγκριτικά με αυτές της αλκαλικής φωσφατάσης. Τέλος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της ρετινόλης μεταξύ ανενεργών φορέων και ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β, χωρίς σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των οξέων.

Η «μεταμόρφωση» των πλούσιων σε βιταμίνη Α αστεροειδών κυττάρων σε μυοϊνοβλάστες που παράγουν κολλαγόνο, αποτελεί σημείο κλειδί κατά την ανάπτυξη της ίνωσης και της κίρρωσης. Στη διάρκεια της διαδικασίας αυτής τα αστεροειδή κύτταρα χάνουν την αποθηκευμένη σε μορφή εστέρων ρετινόλη (88). Παρά την εμφανή του σημασία, το γεγονός αυτό (που δεν γνωρίζουμε καν, αν αποτελεί αίτιο ή αποτέλεσμα των ινωτικών εξεργασιών) δεν αποτελεί τη μόνη συσχέτιση της ρετινόλης με τα χρόνια ηπατικά νοσήματα. Με βάση τα όσα

αναλύθηκαν προηγουμένως, οι δράσεις των ρετινοειδών στην παθοφυσιολογία των χρόνιων ηπατοπαθειών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε έμμεσες και άμεσες.

Οι έμμεσες αφορούν τους πυρηνικούς υποδοχείς και είναι δύσκολο να αποδειχθεί *in vivo* ότι τα επίπεδα των ρετινοειδών στον ορό μπορούν να συσχετισθούν με αυτές. Μάλιστα, το γεγονός ότι το ισομερές με την ισχυρότερη δράση στους πυρηνικούς υποδοχείς, το 9-cisRA (26), δεν ανιχνεύεται καν στον ορό, ενισχύει την άποψη αυτή. Πράγματι, αν και η μέθοδος μας ήταν ικανή να προσδιορίσει συγκεντρώσεις του 9-cis RA, αυτές ήταν μηδενικές, τόσο στους ασθενείς, όσο και στην ομάδα ελέγχου. Το εύρημα αυτό, αν και παράξενο, έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (13,18). Καθώς οι βιβλιογραφικές αναφορές για μετρήσεις των ρετινοϊκών οξέων στον ορό είναι ελάχιστες, μόνο υποθέσεις μπορούν να γίνουν :

- 1) Το 13-cis RA ή το ATRA μετατρέπονται σε 9-cis RA μόνο στα κύτταρα στόχους, με άγνωστο μηχανισμό, ώστε να αποφευχθεί ανεπιθύμητη ενεργοποίηση των πυρηνικών υποδοχέων ή τοξικότητα .
- 2) Οι υπάρχουσες μέθοδοι είναι ανίκανες να μετρήσουν τις υπαρκτές, αλλά εξαιρετικά χαμηλές, ποσότητες 9-cis RA, οι οποίες ωστόσο είναι ικανές και αναγκαίες για το παρατηρούμενο βιολογικό αποτέλεσμα.
- 3) Η *in vivo* δράση των 13-cis RA και ATRA στους πυρηνικούς υποδοχείς έχει υποτιμηθεί.

Υπενθυμίζεται ότι το ενζυμικό σύστημα που ονομάζεται CYP26C1, απαντάται στον άνθρωπο και καταβολίζει το ATRA, αλλά δείχνει προτίμηση στο 9-cis RA (21).

Οι άμεσες δράσεις των ρετινοειδών κινούνται συνοπτικά στους παρακάτω άξονες:

- 1) Την ανοσορρύθμιση
- 2) Το οξειδωτικό stress
- 3) Τις αδιποκίνες και τον μεταβολισμό
- 4) Τον STAT1

5) Τη χρησιμοποίηση από τους ηπατοτρόπους ιούς μηχανισμών του ξενιστή στους οποίους εμπλέκονται τα ρετινοειδή με σκοπό την επιβίωσή τους.

Όπως προαναφέρθηκε, τα ρετινοειδή είναι δυνητικά βλαβερά, αλλά και απολύτως αναγκαία σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, γι' αυτό και είναι απαραίτητο ένα σύστημα το οποίο να διασφαλίζει ότι επαρκείς αλλά όχι τοξικές ποσότητες βρίσκονται στα κύτταρα στόχους.

Ο μεταβολισμός περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα :

Εικόνα (7). Μοντέλο των ρόλων της λεκιθιν - ρετινολ - ακυλτρανσφεράσης (LRAT), και του κυτοχρώματος P450 CYP26 στο μεταβολισμό των ρετινοειδών, όπου η ρετινόλη είτε εκκρίνεται και μεταφέρεται (secretion and transport), είτε υφίσταται οξειδωτική ενεργοποίηση (oxidative activation) σε ρετινάλη, έπειτα σε ρετινοϊκό οξύ και στη συνέχεια σε πολικούς μεταβολίτες (polar RA metabolites). RE = εστέρες ρετινόλης Ral = ρετινάλη, RA = ρετινοϊκά οξέα, REH = υδρολάση εστέρων ρετινόλης, + = θετική ρύθμιση από τα RA (1).

Τουλάχιστον στο υγιές ήπαρ, όταν τα επίπεδα των ρετινοϊκών οξέων αυξάνονται, το σύστημα του κυτοχρώματος, μία υπεροικογένεια μονοοξυγενασών που περιέχουν αίμη, ενεργοποιείται με σκοπό την επαναφορά των συγκεντρώσεων τους στο φυσιολογικό. Το ATRA οξειδώνεται κυρίως από το CYP26A1, ενώ το 13-cisRA από το CYP2C8 (19,423). Οι μηχανισμοί ελέγχου των επιπέδων των ρετινοϊκών οξέων είναι αναγκαίοι για την ομαλή λειτουργία κυττάρων, ιστών και οργάνων, καθώς αυξημένη παρουσία των οξέων στους ιστούς μπορεί να προκαλέσει βραχυπρόθεσμα απρόσφορη γονιδιακή έκφραση και μακροπρόθεσμα τοξικότητα, αλλοιώνοντας την οξειδωτική κατάσταση του κυττάρου. Ενώ η παραγωγή των οξέων από τη ρετινόλη ελέγχεται από τις

αφυδρογονάσεις, η οξείδωση του καταλύεται από τις δραστηριότητες των κυτοχρωμάτων P450. Το P450 που είναι γνωστό ως CYP26A1 (P450RA1) έχει μελετηθεί περισσότερο εκτεταμένα. Πρόκειται για μία RA-4-υδροξυλάση που μετατρέπει το ATRA σε πολικά παράγωγα στα οποία περιλαμβάνονται το 4-OH-RA, το 4-oxo-RA, και το 18-OH-RA. Το CYP26A1 θεωρείται το κύριο ένζυμο που καταλύει την οξείδωση των οξέων στους περισσότερους ιστούς, αν και στον εγκέφαλο, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει και το CYP26B1. Το γονίδιο του CYP26A1 είναι καλά διατηρημένο σε όλα τα σπονδυλωτά και η πρωτεΐνη εμφανίζει υψηλή ειδικότητα για την οξείδωση του ATRA, το οποίο δεν αποτελεί μόνο το ειδικό υπόστρωμα για το CYP26A1 αλλά και ένα ισχυρό επαγωγέα της έκφρασης του γονιδίου του. Στο ήπαρ, το CYP26A1 ελέγχεται στενά. Έχει παρατηρηθεί ότι χορήγηση ATRA σε αρουραίους με υποβιταμίνωση A προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων του CYP26A1 mRNA, 6 ώρες μετά τη χορήγηση, τα οποία επανήλθαν στις βασικές τιμές σε 48 ώρες. Επιπρόσθετα, το CYP26A1 mRNA αυξήθηκε προοδευτικά με την πρόσληψη βιταμίνης A με την τροφή και εμφάνισε ισχυρή συσχέτιση με τα ηπατικά επίπεδα ρετινόλης, δείκτη της συνολικής επάρκειας του οργανισμού σε βιταμίνη A. Σχεδόν όλη η επαγωγή του mRNA οφειλόταν στην ενεργοποίηση της μεταγραφικής διαδικασίας στο ήπαρ ενηλίκων αρουραίων, ηπατοκύτταρα χρησιμοποιούν μια ομάδα που περιλαμβάνει μέχρι 4 RAREs (Retinoic Acid Response Elements – σημεία απάντησης στο ρετινοϊκό οξύ) τα οποία είναι όλα ικανά αλλά και απαραίτητα για την απάντηση στο RA σε κυτταρικές σειρές HepG2. Παρατηρούμε λοιπόν πως υπάρχει ένα σύστημα αυτορύθμισης μέσω του οποίου οι αυξημένες ποσότητες RA εξουδετερώνονται μετατρεπόμενες σε πολικούς μεταβολίτες, ενώ σε καταστάσεις ένδειας, υπάρχει ετοιμότητα για την αποκατάσταση των επιθυμητών επιπέδων, όταν οι διαιτητικές συνθήκες το επιτρέψουν (1,19).

Η σημασία της απώλειας των ρετινοειδών των αστεροειδών κυττάρων στην παθοφυσιολογία της ίνωσης, είχε παραβλεφθεί για χρόνια. Πρωταρχική αιτία αποτελεί το γεγονός ότι η ηπατική βλάβη αποτελεί κομμάτι της κλινικής εικόνας της υπερβιταμίνωσης A και όχι της υποβιταμίνωσης, ενώ ακόμη και όταν στην

τελευταία παρατηρηθεί ηπατική δυσλειτουργία, δεν αποκλείεται ο συνυπάρχων υποσιτισμός να φέρει την κύρια ευθύνη. Επιπρόσθετα, το RA έχει αποδειχθεί ότι είναι ικανό να αυτορυθμίζει τα επίπεδα του μέσω του ελέγχου ρυθμού επαγωγής του CYP και της LRAT, ακόμη και σε καταστάσεις με περιορισμένη πρόσληψη ρετινόλης από τις τροφές (1).

Κατά την ενεργοποίηση των HSC παρατηρείται ταχεία μείωση του ρυθμού μεταγραφής της LRAT. Η ιντερλευκίνη-1 δρα ως σήμα τραυματισμού, καθώς μετά από ηπατοκυτταρική βλάβη, τα επίπεδα της αυξάνονται, ενώ παράλληλα ελαττώνεται η μεταγραφή της LRAT (424). Έτσι, σε ένα περιβάλλον που το οξειδωτικό stress κυριαρχεί και η ικανότητα εστεροποίησης της ρετινόλης είναι μειωμένη, η οξείδωση της σε RA φαίνεται αναπόφευκτη. Τα αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάριου RA αυξάνουν τη δραστηριότητα του CYP με σκοπό να επιτευχθούν ξανά φυσιολογικά επίπεδα. Ωστόσο, οι ασθενείς στη μελέτη μας είχαν μειωμένα επίπεδα RA σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η μόνη πιθανή εξήγηση γι' αυτό είναι ότι οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες επάγουν τη δραστηριότητα του CYP και η επίδραση αυτή συνεχίζεται χωρίς να «αναγνωρίζονται» φυσιολογικά επίπεδα. Δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που να στηρίζουν την άποψη αυτή, καθώς δεν έχει βρεθεί κάποια κυτταροκίνη που προκαλεί απορρύθμιση του καταβολισμού του RA, σε αντιστοιχία με την εστεροποίηση της ρετινόλης και την ιντερλευκίνη-1. Ωστόσο, αν και οι μελέτες που αφορούν το μεταβολισμό της ρετινόλης σε όλες τις χρόνιες ηπατοπάθειες είναι ελάχιστες, υπάρχουν στοιχεία που αφορούν τη δράση της αιθανόλης και θα αναλυθούν στη συνέχεια.

Θα μπορούσε να υποτεθεί ότι εφόσον κατά την ίνωση τα επίπεδα της ρετινόλης μειώνονται, τα επίπεδα των ATRA και 13-cis-RA μειώνονται ακολούθως. Όμως στη μελέτη μας τα επίπεδα των RA βρίσκονται μειωμένα, ακόμα και στους ασθενείς με χολοστατικά νοσήματα και NAFLD, όπου τα επίπεδα της ρετινόλης είναι αυξημένα. Αποδεικνύεται με αυτό τον τρόπο πως ο αυξημένος υπερκαταβολισμός των RA μέσω πιθανής υπερβολικής δραστηριότητας του CYP 450 μπορεί να ευθύνεται για τα παρατηρούμενα χαμηλά επίπεδα τους στον ορό.

Η χρόνια αλκοολική νόσος του ήπατος αποτελεί τη μοναδική χρόνια ηπατοπάθεια που έχει τεκμηριωθεί πειραματικά ο υπερκαταβολισμός του RA. Η δραστηριότητα των αφυδρογονασών της ρετιναλδεύδης (RALDH1 - RALDH3), φαίνεται πως αυξάνεται από την αιθανόλη, σε μελέτες αρουραίων, γεγονός που αποτελεί μια εξήγηση για τα χαμηλά επίπεδα ηπατικού RA που παρατηρήθηκαν (129). Ωστόσο, τα επίπεδα του RA εξαρτώνται κυρίως από τον καταβολισμό του, μέσω των προαναφερθέντων κυτοχρωμάτων P450 και από την επάρκεια του υποστρώματος (130). Σε χρόνια κατανάλωση αλκοόλ, τα μειωμένα επίπεδα RA στο ήπαρ έχουν συσχετισθεί με απορρύθμιση του καταβολισμού του. Στο συμπέρασμα αυτό μας οδηγούν τα μειωμένα επίπεδα ηπατικού RA σε τρωκτικά που τους χορηγούσαν αιθανόλη (129), ενδείξεις υπερκαταβολισμού του RA (127,131), αυξημένα επίπεδα πολικών μεταβολιτών του RA στο ήπαρ τρωκτικών που ελάμβαναν αιθανόλη (127,131,132). Θεωρείται πως στο ήπαρ των αλκοολικών αρουραίων ενεργοποιείται ένα άλλο ενζυμικό σύστημα για τον καταβολισμό του RA, το CYP2E1, που αναστέλλεται από τη χλωρομεθειαζόλη. Η χρήση του αναστολέα φέρεται να ομαλοποιεί τόσο τα επίπεδα των ηπατικών RA, αλλά και της ρετινόλης και των εστέρων (127,131,132). Η μελέτη μας ενισχύει τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα, καθώς οι αλκοολικοί ασθενείς παρουσιάζουν τα χαμηλότερα επίπεδα ρετινόλης στον ορό, συγκριτικά με τις άλλες ομάδες, ενώ και οι συγκεντρώσεις των οξέων είναι σημαντικά χαμηλότερες από αυτές των υγιών.

Τα ρετινοειδή φαίνεται να συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της μη αλκοολικής νόσου του ήπατος, έμμεσα με τη δράση των πυρηνικών υποδοχέων και των αδιποκινών στο μεταβολισμό των λιπιδίων, όπου η παθολογική συσσώρευση λίπους στα ηπατοκύτταρα και η οξειδωση τους σε συνδυασμό με το οξειδωτικό stress θεωρούνται σημεία κλειδιά για την έλευση της νόσου (144,147,148). Οι ασθενείς με μη αλκοολική νόσο του ήπατος είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα οξέων από τους υγιείς, αν και είχαν τις υψηλότερες τιμές από όλες τις άλλες ομάδες ασθενών, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά. Αξιοσημείωτες επίσης είναι οι σημαντικά αυξημένες τιμές ρετινόλης που παρατηρούνται στους ασθενείς αυτούς σε σχέση με τους υγιείς. Καθώς η υπερλιπιδαιμία αποτελεί

χαρακτηριστικό της νόσου, η συσχέτιση που παρατηρείται στη μελέτη μας μεταξύ ρετινόλης και χοληστερόλης ενδέχεται να εξηγεί το εύρημα αυτό, καθώς σε ασθενείς με υψηλές τιμές χοληστερόλης μετρήθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις ρετινόλης. Γενικά, οι ασθενείς αυτής της ομάδας είχαν και τα λιγότερα ευρήματα ηπατικής δυσλειτουργίας και τις υψηλότερες τιμές οξέων από όλους τους υπόλοιπους ασθενείς.

Ο ιός της ηπατίτιδας C χρησιμοποιεί τα λιποσταγονίδια στα οποία αποθηκεύονται τα ρετινοειδή για τον πολλαπλασιασμό του και κυκλοφορεί στο αίμα σε συμπλέγματα από λιποπρωτεΐνες. Επίσης, η επίδραση των ρετινοειδών στην παραγωγή κυτταροκινών και στην πρόκληση ή την αποφυγή οξειδωτικού stress είναι διαταραγμένες στη χρόνια ηπατίτιδα C, η οποία συνδυάζεται πολλές φορές με στεάτωση. Ορισμένοι μάλιστα υποστηρίζουν πως ο ιός την προκαλεί, καθώς σχετίζεται με την ένταση της αναπαραγωγής του ιού (228-233, 256-260). Στους μηχανισμούς έλευσής της εμπλέκεται και η αλληλεπίδραση του ιού με τους πυρηνικούς υποδοχείς που ρυθμίζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων, όπως ο PPAR- α (234-238), ο PPAR- γ (244-247), ο FXR (248-253) και ο LXR α (239,254). Τέλος, η ικανότητα του ATRA να επάγει το ένζυμο gastrointestinal glutathione peroxidase (GI-GPx), βασικού αντιοξειδωτικού «όπλου» των ηπατοκυττάρων, που η έκφραση του καταστέλλεται στη χρόνια HCV λοίμωξη (268, 269), σε συνδυασμό με τις ενδείξεις πως το ATRA ενισχύει τη δράση της IFN- α (270), οδήγησαν στη χορήγηση του σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη, με αποτελέσματα που έμμεσα αποδεικνύουν το ρόλο των ρετινοειδών στη χρόνια HCV λοίμωξη (267). Η συχνή συνύπαρξη στεάτωσης και υπερλιπιδαιμίας στους ασθενείς με χρόνια HCV λοίμωξη ενδεχομένως εξηγεί τη μη στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των ασθενών αυτών και των υγιών στα επίπεδα ρετινόλης. Ο υπερκαταβολισμός των RA παρατηρείται και σε αυτή την ομάδα ασθενών και εξηγεί τις μειωμένες συγκεντρώσεις οξέων.

Τα ρετινοειδή όμως επηρεάζουν και την παθοφυσιολογία της χρόνιας ηπατίτιδας B, μέσω των πυρηνικών υποδοχέων. Στον επαυξηνητή (enhancer) του ιού, υπάρχει περιοχή στην οποία συνδέεται ο RXR- α (24). Οι υποδοχείς PPAR α , FXR α , και HNF4 α επίσης εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής του ιού

(147,183). Το HBx, το κατεξοχήν ογκογόνο προϊόν του HBV, προκαλεί παθολογική μεθυλίωση στο RAR β 2, καταστέλλει την έκφραση του σε κυτταρικές σειρές ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Δεν αποκλείεται αυτό να είναι σημαντικό γεγονός κατά τη προκαλούμενη από τον HBV ογκογένεση (200). Τα ρετινοειδή, παίζουν μέσω της καταστολής των ROR ή RAR υποδοχέων σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της Treg και της Th-17 κατεύθυνσης (40,41,56). Αν και σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B, φαίνεται πως αυξάνονται τα Treg και τα Th17 κύτταρα στο περιφερικό αίμα (201,204-206), η αντίδραση αυτή δεν επιφέρει κάθαρση του ιού αλλά η λοίμωξη γίνεται χρόνια (207). Η ομάδα των ασθενών με HBV λοίμωξη περιελάμβανε ανενεργούς φορείς και ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα B. Τα επίπεδα της ρετινόλης ήταν σημαντικά χαμηλότερα στους ασθενείς με χρόνια ενεργό νόσο, ενώ στα οξέα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο, μετρήθηκαν όμως σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με τους υγιείς. Ενδεχομένως, η επαφή με τον ιό αρκεί για να πυροδοτηθεί ο μηχανισμός που συμβάλει στον υπερκαταβολισμό των οξέων, ανεξάρτητα από την τελική έκβαση της λοίμωξης. Ο ρόλος των ρετινοειδών στη διατήρηση της ισορροπίας Treg/Th17 αφορά και τα αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα, όπου έχει παρατηρηθεί πως αυτή διαταράσσεται (56,302-305). Οι πυρηνικοί υποδοχείς RAR- α και LXR αναστέλλουν την παραγωγή κυτταροκινών, όπως η IL-17 και η εύρεση ουσιών που τους επηρεάζουν με στόχο την επιθυμητή-εκλεκτική ανοσοκαταστολή αποτελεί αντικείμενο μελέτης (306-310,314). Η προσθήκη ATRA σε πειραματικά αυτοάνοσα μοντέλα, μέσω των παραπάνω μηχανισμών, βελτιώνει την κλινική εικόνα της νόσου (308). Επομένως, δεν θα πρέπει να προκαλεί εντύπωση το γεγονός ότι στους ασθενείς αυτούς τα επίπεδα των ρετινοϊκών οξέων είναι μειωμένα.

Η ισορροπία Treg/Th17 σχετίζεται και με την παθοφυσιολογία της PBC (56,346,349,350). Οι PPAR- γ υποδοχείς παίζουν επιπρόσθετο ρόλο στη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής στα χοληφόρα, και εξετάζεται το αν μπορούν να χρησιμεύσουν στην αντιμετώπιση της νόσου (346,347,353). Κύτταρα που εκφράζουν ισοένζυμα της αφυδρογονάσης της ρετινόλης είναι σε

θέση να παράγουν RA με οξείδωση της ρετινόλης, όπως τα δενδριτικά κύτταρα του εντέρου και τα ηπατικά κολποειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Το γεγονός αυτό επηρεάζει τον τροπισμό των λεμφοκυττάρων και σχετίζεται με τις παθολογικές διεργασίες των IBD και PSC. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται έκτοπη έκφραση των MAdCAM-1 και CCL25 που αφορά τα λεμφοκύτταρα τα οποία λόγω του τροπισμού τους, εκφράζουν τους υποδοχείς $\alpha 4\beta 7$ και CCR9, γεγονότα που πυροδοτούν τη φλεγμονώδη διαδικασία (45,377,380). Τα επίπεδα της ρετινόλης στη μελέτη μας είναι σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα σε σύγκριση με τους υγιείς, εύρημα που έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες όπου είχε παρατηρηθεί υποβιταμίνωση A, η οποία αποδόθηκε σε δυσαπορόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών λόγω ανεπαρκούς έκκρισης χολής και χολικών αλάτων (345,425). Ωστόσο, οι περισσότεροι ασθενείς μας ελάμβαναν UDCA κατά τον χρόνο προσδιορισμού των ρετινοειδών. Η χρήση του UDCA στην κυστική ίνωση, έχει βρεθεί πως βελτιώνει το μεταβολισμό της ρετινόλης, γεγονός που ενδεχομένως εξηγεί το εύρημα μας (426), αν και ούτως η άλλως η δυσαπορόφηση της βιταμίνης A αποτελεί χαρακτηριστικό των χολοστατικών νοσημάτων σε προχωρημένο και παραμελημένο στάδιο, και οι ασθενείς μας δεν ανήκαν σε αυτή την κατηγορία.

Με βάση μελέτες σε καλλιέργειες αστεροειδών κυττάρων, έγινε γνωστό πως στο υγιές ήπαρ, η επάρκεια του RA διατηρεί άθικτο τον αντικιρρωτικό άξονα STAT, παρέχει ευνοϊκό αποτέλεσμα στην ανοσοαπάντηση και καθιστά ικανά τα NK κύτταρα στο να φονεύουν τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα πριν σταματήσουν να εκφράζουν το γονίδιο RAE-1 (πρώιμα ενεργοποιημένα HSCs). Η απώλεια των ρετινοειδών φαίνεται να επηρεάζει την ρύθμιση, τη λειτουργία των NK κυττάρων και τον άξονα STAT και να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας του ήπατος να επουλώνει τις πληγές του (135).

Έχει βρεθεί από τους ίδιους ερευνητές, ότι τα ρετινοειδή μπορούν επίσης να αναστείλουν την ενεργοποίηση του STAT1, για την οποία μεσολαβεί η IFN- γ , μέσω της επαγωγής του καταστολέα σήματος κυτταροκινών - suppressor of cytokine signalling 1 (SOCS1), ενός ισχυρού αναστολέα της σηματοδότησης της IFN- γ στα όψιμα ενεργοποιημένα HSCs. Επιπρόσθετα, το RA μπορεί να

ενεργοποιήσει τον TGF- β , που καταστέλλει τη δραστηριότητα των NK κυττάρων. Επομένως, ο μεταβολισμός των ρετινοειδών κατά τη διάρκεια ενεργοποίησης των HSC μπορεί είτε να προωθήσει την ενεργοποίηση των NK με την επαγωγή του RAE1, ή να την μειώσει, μέσω της επαγωγής του SOCS1 που αναστέλλει το σήμα της IFN (121). Στη μελέτη μας, τα επίπεδα των RA στον ορό βρέθηκαν χαμηλά στους κίρρωτικούς ασθενείς. Αν τα ενδοκυττάρια επίπεδα των RA συσχετίζονται με αυτά, ενδεχομένως η μείωση των επιπέδων των RA να συμβάλλει στην αναστολή της ενεργοποίησης των NK.

Είναι επομένως φανερό πως η απώλεια των ρετινοειδών από τα HSCs συνδέεται με ειδικούς και μη ειδικούς μηχανισμούς με την παθοφυσιολογία των χρόνιων ηπατοπαθειών. Δεν είναι ξεκάθαρο όμως αν αποτελεί αίτιο ή παρενέργεια της. Άλλοι υποστηρίζουν πως η έλλειψη της αντιοξειδωτικής προστασίας τους και του ανοσοτροποποιητικού τους ρόλου, καθιστά το ήπαρ πιο ευάλωτο στις ινωτικές διαδικασίες. Ενδέχεται όμως η ηπατική βλάβη να απορυθμίζει το μεταβολισμό τους και να επιφέρει 'τοξική έκρηξη' μεταγραφικά ενεργών ρετινοειδών που συμβάλλουν στην αλλοιωμένη έκφραση γονιδίων (87,122).

ΠΙΘΑΝΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ ΙΝΩΣΗ

Με βάση τα αποτελέσματα, προτείνεται ο παρακάτω μηχανισμός αναφορικά με το ρόλο της απώλειας των ρετινοειδών στην παθοφυσιολογία της ίνωσης .

Εικόνα (8). Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης των ρετινοειδών στην ίνωση.

Υ.ΠΕΔΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΤΑ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΗ ΣΤΗ ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ-ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ RA

Τα ισομερή του RA χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπευτική. Το 13-cis RA χορηγείται στην ακμή και στο νευροβλάστωμα υψηλού κινδύνου. Το ATRA αρχικά χρησιμοποιήθηκε στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (APL) και στη συνέχεια σε νεοπλάσματα του δέρματος, όπως το σάρκωμα Kaposi και το δερματικό λέμφωμα από T-κύτταρα. Κατά τη χρήση του ATRA με σκοπό την επίτευξη ύφεσης στην APL, παρατηρήθηκε ότι στους ασθενείς που ελάμβαναν εξωγενώς RA χρονίως, επαγόταν ο μεταβολισμός του, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η κάθαρση του από το πλάσμα. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να ευθύνεται για την αδυναμία διατήρησης της ύφεσης σε αυτούς τους ασθενείς. Εφόσον η αύξηση της δόσης δεν θα μπορούσε να λύσει το πρόβλημα καθώς η επαγωγή θα συνεχιζόταν, η επόμενη σκέψη ήταν η ανεύρεση παραγόντων που αναστέλλουν το μεταβολισμό του RA στα ένζυμα του κυττοχρώματος P450 ώστε να αυξηθεί το ενδογενές RA. Μία ομάδα μορίων-αναστολέων του μεταβολισμού του RA (Retinoic Acid Metabolism Blocking Agents -RAMBAs) αξιολογούνται, όχι μόνο σε αιματολογικές κακοήθειες, αλλά και σε νεοπλασίες του μαστού και του προστάτη. Αρχικά δοκιμάστηκαν η Κετοκοναζόλη και η Ιτρακοναζόλη, ουσίες με γνωστή δράση στο P450, που χρησιμοποιούνται ως αντιμυκητιασικά. Οι προσπάθειες ανεύρεσης περισσότερο εκλεκτικών αναστολέων (όπως το πρώτο τρισδιάστατο φαρμακοφόρο μοντέλο) φαίνεται πως αποδίδουν και μόρια όπως η λιαροζόλη είναι έτοιμα για δοκιμές (428-431). Σίγουρα, υπάρχουν ακόμη αρκετά αδιευκρίνιστα σημεία, καθώς ο κάθε υπό εξέταση παράγοντας έχει άλλη αποτελεσματικότητα στις διάφορες κυτταρικές σειρές, ενώ η επιπλέον χορήγηση ATRA φαίνεται πως δρα συνεργικά. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης είναι η

επαγωγή της διαφοροποίησης, η παύση του κυτταρικού κύκλου και η επαγωγή της απόπτωσης (432,433).

Η μείωση των επιπέδων των RA φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ίνωσης, αλλά η χορήγηση εξωγενούς RA δεν αναμένεται να αποφέρει κάποιο όφελος, καθώς η κύρια αιτία της πτώσης των επιπέδων μάλλον είναι ο υπερκαταβολισμός του, ενώ η εξωγενής χορήγηση RA επίσης επάγει τον καταβολισμό του. Θα παρουσίαζε ενδιαφέρον η διεξαγωγή μελετών με τη χρήση αναστολέων του μεταβολισμού του RA σε διάφορα στάδια των χρόνιων ηπατοπαθειών καθώς το προσδοκώμενο αποτέλεσμα είναι η ενίσχυση της ανοσοαπόκρισης, η κάθαρση του ιού στις ιογενείς ηπατίτιδες και η σταθεροποίηση της πορείας της ίνωσης στις υπόλοιπες παθήσεις.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ross A.C. Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic acid oxidation. *J Nutr* 2003;133:291-6.
2. C Halsted, et al. Vitamin and mineral absorption. *Textbook of Gastroenterology* 4th Ed.
3. Akhiko Nagao. Oxidative Conversion of Carotenoids to Retinoids and Other Products. *Functions and Actions of Retinoids and Carotenoids*. A James Allen Olson Memorial Symposium Iowa USA, June 21-24, 2001.
4. Andrew Stolz. Liver physiology and metabolic function. *Sleisenger and Fordtran's. Gastrointestinal and Liver disease* 7th Ed. p1219-20.
5. Blaner WS, et al. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:467-73.
6. V A Fortuna et al. Acyl-CoA: retinol acyltransferase (ARAT) and lecithin retinol transferase (LRAT) activation during the lipocyte phenotype induction in hepatic stellate cells. *J Nutr Biochem* 2001;12:610-21.
7. Heid H, et al. Lipid droplets, perilipins and cytokeratins - unravelled liaisons in epithelium-derived cells. *PLoS One* 2013;8:e63061.
8. Straub BK et al. Differential pattern of lipid droplet -associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. *Hepatology* 2008;47:1936-46.
9. Eckhoff C, et al. Human plasma all-trans-, 13-cis- and 13-cis-4-oxoretinoic acid profiles during subchronic vitamin A supplementation: comparison to retinol and retinyl ester plasma levels. *J Nutr* 1991; 121:1016-25.
10. Fex G, et al. Factors affecting the concentration of free holo retinol-binding protein in human plasma. *Eur J Clin Invest* 1984;14:146-9.
11. Tang GW, et al. 13-cis-retinoic acid is an endogenous compound in human serum. *J Lipid Res* 1990; 31:175-82.

12. Eckhoff C, et al. Identification and quantitation of all-trans- and 13-cis-retinoic acid and 13-cis-4-oxoretinoic acid in human plasma. *J Lipid Res* 1990;31:1445-54.
13. Kane MA, et al. Quantitative profiling of endogenous retinoic acid in vivo and in vitro by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2008; 80:1702-8.
14. Napoli JL. Retinoid binding-proteins redirect retinoid metabolism: biosynthesis and metabolism of retinoic acid. *Semin Cell Dev Biol* 1997;8:403-15.
15. Chen H, et al. Biotransformation of all-trans-retinol and all-trans-retinal to all-trans-retinoic acid in rat conceptual homogenates. *Biochem Pharmacol* 1995;50:1257-64.
16. Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 2008;134:921-31.
17. Napoli JL. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J* 1996;10:993-1001.
18. Thatcher JE, et al. The role of CYP26 enzymes in retinoic acid clearance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009;5:875-86
19. Zhang Y, et al. Multiple retinoic acid response elements cooperate to enhance the inducibility of CYP26A1 gene expression in liver. *Gene* 2010;464:32-43.
20. Fex G, et al. Low serum concentration of all-trans and 13-cis retinoic acids in patients treated with phenytoin, carbamazepine and valproate. Possible relation to teratogenicity. *Arch Toxicol* 1995;69:572-4.
21. Taimi M, et al. A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. *J Biol Chem* 2004;279:77-85.
22. Bastien J, et al. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 2004;328:1-16.
23. Balmer JE, et al. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 2002;43:1773-808.

24. Huan B, et al . Retinoid X receptor RXRa binds to and Trans-activates the Hepatitis B Virus Enhancer. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89:9059-63.
25. Notario B, et al. All-trans-retinoic acid binds to and inhibits adenine nucleotide translocase and induces mitochondrial permeability transition. *Mol Pharmacol* 2003;63:224-31.
26. Shaul J Karpen. Nuclear receptor regulation of hepatic function. *J Hepatol* 2002;36:832-50.
27. Wan YJ, et al. Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor alpha as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. *Mol Cell Biol* 2000;20:4436-44.
28. Frey SK, et al. Isoforms of retinol binding protein 4 (RBP4) are increased in chronic diseases of the kidney but not of the liver. *Lipids Health Dis* 2008;7:29.
29. Mawson AR, et al. Possible role of Retinoids in Hepatitis B Virus-associated liver damage. *Exp Biol Med* 2001;226:734-9.
30. Semba, R.D. Vitamin A, immunity, and infection. *Clin Infect Dis* 1994;19:489-99.
31. Sherry B, et al. Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of inflammatory responses. *J Cell Biol* 1988;107:1269-77
32. Mehta, K. et al. Inhibition by all-trans-retinoic acid of tumor necrosis factor and nitric oxide production by peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 1994;55:336-42.
33. Kang, B.Y. et al. Retinoid-mediated inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages suppresses Th1 cytokine profile in CD4 (+) T cells. *Br J Pharmacol* 2000;130:581-6.
34. Kim, B.H., et al. Effect of retinoids on LPS-induced COX-2 expression and COX-2 associated PGE (2) release from mouse peritoneal macrophages and TNF-alpha release from rat peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol Lett* 2004;150:191–201.

35. Kang, S.G. et al. Vitamin a metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2007;179:3724-33.
36. Carman, J.A., et al. Abnormal regulation of IFN-gamma secretion in vitamin A deficiency. *J Immunol* 1991; 147:1247–52.
37. Ballow, M. et al. The effects of retinoic acid on immunoglobulin synthesis: role of interleukin 6. *J Clin Immunol* 1996;16:171-9.
38. Zhou, X., et al. The expression of retinoic acid receptors in thymus of young children and the effect of all-transretinoic acid on the development of T cells in thymus. *J Clin Immunol* 2008;28:85-91.
39. Kiss, I. et al. Retinoid receptor-activating ligands are produced within the mouse thymus during postnatal development. *Eur J Immunol* 2008;38:147-55.
40. Ivanov, II. et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006;126:1121-33.
41. Mucida, D. et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007;317:256-60.
42. Pino-Lagos K, et al. Retinoic acid in the immune system. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1143:170-87.
43. Bang BG, et al. Lymphocyte depression induced in chickens on diets deficient in vitamin A and other components. *Am J Pathol* 1972;68:147-62.
44. Manicassamy S, et al. Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages. *Semin Immunol* 2009;21:22-7.
45. Iwata M, et al Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 2004;21:527-38.
46. Clark, R. B. The role of PPARs in inflammation and immunity *J Leukoc Biol* 2002;71:388-400.
47. Delerive P., et al. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control *J Endocrinol* 2001;169:453-59.

48. Daynes, R. A., et al. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2:748-59.
49. Natarajan, C., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists inhibit experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 production, IL-12 signaling and Th1 differentiation. *Genes Immun* 2002;3:59-70.
50. Ray, D. M. et al. CD40 engagement prevents peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist-induced apoptosis of B lymphocytes and B lymphoma cells by an NF- κ B-dependent mechanism *J Immunol* 2005;174:4060-9.
51. Natarajan, C., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ -deficient heterozygous mice develop an exacerbated neural antigen-induced Th1 response and experimental allergic encephalomyelitis *J Immunol* 2003;171:5743-50.
52. Housley WJ, et al. PPARgamma regulates retinoic acid-mediated DC induction of Tregs. *J Leukoc Biol* 2009;86:293-301.
53. Szatmari, I., et al. PPARgamma controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *J Exp Med* 2006;203:2351–62.
54. Chen, Q, et al. Retinoic acid regulates CD1d gene expression at the transcriptional level in human and rodent monocytic cells. *Exp Biol Med* 2007;232:488-94.
55. Allan, L. L., et al CD1d and CD1c expression in human B cells is regulated by activation and retinoic acid receptor signalling. *J Immunol* 2011;186:5261-72.
56. Qiu de K, et al. Th17 cells: the emerging reciprocal partner of regulatory T cells in the liver. *J Dig Dis* 2010;11:126-33.
57. Altucci L, et al. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:793-810.
58. Rhee EJ, et al. Retinoid metabolism and diabetes mellitus. *Diabetes Metab J* 2012; 36:167-80.

59. Li L, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma agonists upregulate human macrophage lipoprotein lipase expression. *Atherosclerosis* 2002;165:101-10.
60. Youssef J, et al. Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Inflammation control. *J Biomed Biotechnol* 2004;3:156-66.
61. Duval C, et al. PPAR alpha, fibrates, lipid metabolism and inflammation. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2004;97:665-72.
62. Hihi AK, et al. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:790-8.
63. Tarrade A, et al. PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5017-24.
64. Ciaraldi TP, et al. Free fatty acid metabolism in human skeletal muscle is regulated by PPARgamma and RXR agonists *Ann NY Acad Sci* 2002;967:66-70.
65. Malczewska-Malec M, et al. Hypertension, postprandial lipemia and gene polymorphism in obese families. *Moduzzi Editore* 2002;529-34.
66. Kieć-Wilk B, et al. The selected pathophysiological aspects of PPARs activation. *J Physiol Pharmacol* 2005;56:149-62.
67. Park PJ, et al. Integration of heterogeneous expression data sets extends the role of the retinol pathway in diabetes and insulin resistance. *Bioinformatics* 2009;25:3121-27.
68. Moise AR, et al. Identification of all-trans-retinol: all-trans-13, 14-dihydroretinol saturase. *J Biol Chem* 2004;279:50230-42.
69. Schupp M, et al Retinol saturase promotes adipogenesis and is downregulated in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*.2009;106:1105-10.
70. Fu M, et al. A nuclear receptor atlas: 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* 2005;19:2437-50.
71. Xue JC, et al. Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPARgamma. *Mol Cell Biol* 1996;16:1567-75.

72. Napoli JL. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1999;63:139-88.
73. Ziouzenkova O, et al Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat Med* 2007;13:695-702.
74. Ress NB, et al. Toxicology and carcinogenesis studies of microencapsulated citral in rats and mice. *Toxicol Sci* 2003;71:198-206.
75. Berry DC, et al. All-trans-retinoic acid represses obesity and insulin resistance by activating both peroxisome proliferation-activated receptor beta/delta and retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol* 2009;29:3286-96.
76. Barish GD, et al. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006;116:590-7.
77. Tsutsumi C., et al Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J. Biol. Chem* 1992;267:1805-10.
78. Bonet M.L., et al. Vitamin A and the regulation of fat reserves. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1311-21.
79. Okuno M., et al. Regulation of adipocyte gene expression by retinoic acid and hormones: effects on the gene encoding cellular retinol-binding protein. *J Lipid Res* 1995;36:137-47.
80. Caprioli A., et al. CRBP-III: lacZ expression pattern reveals a novel heterogeneity of vascular endothelial cells. *Genesis* 2004;40:139-45.
81. Muoio D.M., et al. Metabolism: A is for adipokine. *Nature* 2005;436:337-8.
82. Tamori Y, et al. RBP4, an unexpected adipokine. *Nat Med* 2006;12:30-1.
83. Wolf G. Serum retinol-binding protein: a link between obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Nutr Rev* 2007;65:251-6.
84. Janke J. et al,. Retinol-binding protein 4 in human obesity. *Diabetes* 2006;55:2805–10.
85. Vitkova M., et al Plasma levels and adipose tissue messenger ribonucleic acid expression of retinol-binding protein 4 are reduced during calorie restriction in obese subjects but are not related to diet-

- induced changes in insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2330-5.
86. Broch M., et al. Circulating retinol-binding protein-4, insulin sensitivity, insulin secretion, and insulin disposition index in obese and nonobese subjects. *Diabetes Care* 2007;30:1802-6.
 87. D'Ambrosio DN, et al. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients* 2011;3:63-103.
 88. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008;88:125-72.
 89. Y Mezaki, et al. Insoluble, Speckled Cytosolic Distribution of Retinoic Acid Receptor Alpha Protein as a Marker of Hepatic Stellate Cell Activation In Vitro. *J Histochem Cytochem* 2009;57:687-99.
 90. Ohata M, et al. Diminished retinoic acid signaling in hepatic stellate cells in cholestatic liver fibrosis. *Am J Physiol* 1997;272:589–96.
 91. Ulven SM, et al. Expression of retinoic acid receptor and retinoid X receptor subtypes in rat liver cells: implications for retinoid signalling in parenchymal, endothelial, Kupffer and stellate cells. *Eur J Cell Biol* 1998;77:111-6.
 92. Galli A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional regulation is involved in platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000;31:101-8.
 93. Marra F, et al. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;119:466-78.
 94. Planaguma A, et al. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving non-parenchymal cell apoptosis and PPARgamma activation. *FASEB J* 2005;19:1120-2.
 95. Haughton EL, et al. Pregnane x receptor activators inhibit human hepatic stellate cell transdifferentiation in vitro. *Gastroenterology* 2006;131:194-209.

96. Marek CJ, et al. Pregnenolone-16alpha-carbonitrile inhibits rodent liver fibrogenesis via PXR (pregnane X receptor)-dependent and PXR-independent mechanisms. *Biochem J* 2005;387:601-8.
97. Liu QH, et al. Suppressive effects of 17beta-estradiol on hepatic fibrosis in CCl4-induced rat model. *World J Gastroenterol* 2004;10:1315–20.
98. Shimizu I. Impact of oestrogens on the progression of liver disease. *Liver Int* 2003;23:63-9.
99. Claudel T, et al. The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2020-30.
100. Fiorucci S, et al. The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004;127:1497-512.
101. Fiorucci S, et al. A farnesoid X receptor-small heterodimer partner regulatory cascade modulates tissue metalloproteinase inhibitor-1 and matrix metalloproteinase expression in hepatic stellate cells and promotes resolution of liver fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:584-95.
102. Hellemans K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-beta signaling contributes to enhanced proliferation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2003;124:184-201.
103. Gascon-Barre M, et al. The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells. *Hepatology* 2003;37:1034-42.
104. Lissos TW, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 activates Raf kinase and Raf perinuclear translocation via a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 1993;268:25132-8.
105. Dong Z, et al. The roles of innate immune cells in liver injury and regeneration. *Cell Mol Immunol* 2007;4:241-52.
106. Jeong WI, et al. Innate immunity and alcoholic liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1:S112-8.

107. Seki, E., et al. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: Update. *Hepatology* 2008;48:322-35.
108. Myrnel H, et al. The hepatitis C virus enigma. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* 2009;117:427-39.
109. Bettelli E, et al. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 2007;19:652-7.
110. S Manicassamy, et al. TLR2 dependent induction of vitamin A metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits TH-17 mediated autoimmunity. *Nat Med* 2009;15:401-9.
111. Tiegs G, et al. Immune tolerance: what is unique about the liver. *J Autoimmun* 2010;34:1-6.
112. Böttcher JP, et al. Mechanisms balancing tolerance and immunity in the liver. *Dig Dis* 2011;29:384-90.
113. Kobayashi S, et al. Apoptosis of T cells in the hepatic fibrotic tissue of the rat: a possible inducing role of hepatic myofibroblast-like cells. *Cell Tissue Res* 2003;311:353-64.
114. Safadi R, et al. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin-10 from hepatocytes. *Gastroenterology* 2004;127:870-82.
115. Yu MC, et al. Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7–H1-mediated T-cell apoptosis in mice. *Hepatology* 2004;40:1312-21.
116. Chen CH, et al. In vivo immune modulatory activity of hepatic stellate cells in mice. *Hepatology* 2006;44:1171-81.
117. Benten D, et al. Hepatocyte transplantation activates hepatic stellate cells with beneficial modulation of cell engraftment in the rat. *Hepatology* 2005;42:1072-81.
118. Oakley F, et al. Hepatocytes express nerve growth factor during liver injury: evidence for paracrine regulation of hepatic stellate cell apoptosis. *Am J Pathol* 2003;163:1849-58.

119. Fischer R, et al. Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells. *Gastroenterology* 2002;123:845-61.
120. Melhem A, et al. Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *J Hepatol* 2006;45:60-71.
121. Jeong, W.-I., et al. Suppression of innate immunity (natural killer cell/interferon- γ) in the advanced stages of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2011;53:1342-51.
122. Shirakami Y, et al. Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821:124-36.
123. Gaziano JM, et al. Moderate alcohol intake, increased levels of HDL and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. *New Engl J Med* 1993;329:1829.
124. Becker U, et al. Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex and age: a prospective population study. *Hepatology* 1996;23:1025.
125. Israel Y, et al. Hypermetabolic state, hepatocyte expansion ,and liver blood flow: An interacting triad in alcoholic liver injury. *Ann N Y Acad Sci* 1987;492:303.
126. Mobarhan S., et al. Age-related effects of chronic ethanol intake on vitamin A status in fisher 344 rats. *J Nutr* 1991;121:510-17
127. Liu C., et al. Chlormethiazole treatment prevents reduced hepatic vitamin A levels in ethanol-fed rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:1703-9.
128. Clugston RD, et al. The adverse effects of alcohol on vitamin A metabolism. *Nutrients* 2012;4:356-71.
129. Leo M.A., et al. Increased hepatic retinal dehydrogenase activity after phenobarbital and ethanol administration. *Biochem Pharmacol* 1989;38:97-103.
130. Ross A.C., et al. Regulation of hepatic retinol metabolism: Perspectives from studies on vitamin A status. *J Nutr* 2004;134:269-75.

131. Sato M., et al. Increased metabolism of retinoic acid after chronic ethanol consumption in rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1982;213:557-64.
132. Liu C. et al. Ethanol enhances retinoic acid metabolism into polar metabolites in rat liver via induction of cytochrome p4502e1. *Gastroenterology* 2001;120:179-89.
133. M.A. Leo, et al. Hepatic vitamin A depletion in alcoholic liver injury, *N Engl J Med* 1982;307:597-601.
134. Hautenkeete ML, et al. Hepatic Stellate Cells and liver retinoid content in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:494-500.
135. Svetlana Radaeva, et al. Retinoic acid signaling sensitizes hepatic stellate cells to NK cell killing via upregulation of NK cell activating ligand RAE1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:809-16.
136. Lepreux S, et al. Cellular retinol-binding protein-1 expression in normal and fibrotic/cirrhotic human liver: different patterns of expression in hepatic stellate cells and (myo)fibroblast subpopulations. *J Hepatol* 2004;40:774-80.
137. Jeong WI, et al. STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology* 2006;44:1441-51.
138. Jeong WI, et al. Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008;134:248-58.
139. Loguerco C, et al. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Rad Biol Med* 2003;1:1-10.
140. Lemmers A, et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009;49:646-57.
141. Ma X et al. A high-fat diet and regulatory T cells influence susceptibility to endotoxin-induced liver injury. *Hepatology* 2007;46:1519-29.
142. Albano E, et al. Immune mechanisms in alcoholic liver disease. *Genes Nutr* 2010;5:141-7.

143. Byrne CD, et al. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)* 2009;116:539-64.
144. C Day, et al. Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? *Gastroenterology* 1998;114:842-5.
145. Wigg AJ, et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001;48:206-11.
146. Frayn KN. Visceral fat and insulin resistance--causative or correlative? *Br J Nutr* 2000;83 Suppl 1:S71-7.
147. Abstr. Joint EASL-AASLD Monothematic Conference .Nuclear Receptors and Liver Disease. 27 Feb-1 Mar 2009 Vienna, Austria.
148. Yamazaki Y, et al. The role of the nuclear receptor constitutive androstane receptor in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2007;56:565-74.
149. K. Roder, et al. Retinoic acid-mediated transcription and maturation of SREBP-1c regulates fatty acid synthase via cis-elements responsible for nutritional regulation. *Biochemical Society Transactions* 2007;35:1211-4.
150. Denechaud PD, et al. Review. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett* 2008;582:68-73.
151. Dentin R, et al. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 2006;55:2159-70.
152. E Rochi et al. Antioxidant liposoluble vitamins and carotenoids in chronic hepatitis. *Eur Journal of Internal Medicine* 2001;12:116-21.
153. R Zolfagari et al. Fatty acid $\Delta 5$ desaturase mRNA is regulated by dietary vitamin A and exogenous retinoic acid in liver of adult rats. *Arch Biochem Biophys* 2001;391:8-15.
154. Bugianesi E, et al. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 2005;42:987-1000.

155. Shklyayev S, et al. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14217-22.
156. Tsochatzis EA, et al. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediators Inflamm* 2009;2009:831670.
157. Tomita K, et al. Hepatic AdipoR2 signaling plays a protective role against progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2008;48:458-73.
158. Graham TE, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 2006;354:2552-63.
159. Valerio Nobili, et al. Retinol-Binding Protein 4: A Promising Circulating Marker of Liver Damage in Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:575-9.
160. Rivera CA, et al. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2007;47:571-9.
161. M Ohata et al. RAR and RXR Expression by Kupfer cells. *Experimental and Molecular Pathology* 2000;68:13-20.
162. Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *J Hepatol* 2009;51:212-23.
163. I H Bahcecioglu, et al. Levels of serum vitamin A, alpha tocopherol and malondialdehyde in patients with NASH: relationship with histologic severity. *Int J Clin Pract* 2005;59:318-23.
164. Ganem D, et al. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;350:1118-29.
165. Kao JH, et al. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2002;2:395-403.
166. D R Milich, et al. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J Virol* 1997;71:2192-201.

167. Meuleman P, et al. Immune suppression uncovers endogenous cytopathic effects of the hepatitis B virus. *J Virol* 2006;80:2797-807.
168. Rehermann B, et al. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med* 1996;2:1104-8.
169. Yotsuyanagi H, et al. Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B. *Hepatology* 1998;27:1377-82.
170. Blanpain C, et al. Reactivation of hepatitis B after transplantation in patients with pre-existing anti-hepatitis B surface antigen antibodies: report on three cases and review of the literature. *Transplantation* 1998;66:883-6.
171. Pungpapong S, et al. Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians. *Mayo Clin Proc* 2007;82:967-75.
172. C.Chu CJ, et al. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype. *Gastroenterology* 2002;122:1756-62.
173. Fattovich G, et al. Occurrence of hepatocellular carcinoma and decompensation in western European patients with cirrhosis type B: the EUROHEP Study Group on Hepatitis B Virus and Cirrhosis. *Hepatology* 1995;21:77-82.
174. Yim HJ, et al. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 2006;43:S173-81.
175. Hsu YS, et al. Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002;35:1522-7.
176. McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis* 2004;24(suppl 1):17-21.
177. Chung HT, et al. Pathogenic role of hepatitis B virus in hepatitis B surface antigen-negative decompensated cirrhosis. *Hepatology* 1995;22:25-29.

178. Di Bisceglie AM. Hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009;49(5 Suppl):S56-60.
179. Chen CJ, et al. REVEAL-HBV Study Group .Hepatitis B virus DNA levels and outcomes in chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009;49(5 Suppl):S72-84.
180. Zhang YY, et al. Treatment with lamivudine versus lamivudine and thymosin alpha-1 for e antigen-positive chronic hepatitis B patients: a meta-analysis. *Virology* 2009;6:63.
181. Emmet B Keeffe et al. Treatment of chronic viral hepatitis with nitazoxanide and second generation thiazolidines. *World J Gastroenterol* 2009;15:1805-8.
182. B.Sorrell MF (Chairperson). NIH consensus development statement on management of hepatitis. *NIH Consensus State Sci Statements* 2008 Oct 22-24;25:1-29.
183. Guidotti LG, et al. In vivo regulation of hepatitis B virus replication by peroxisome proliferators. *J Virol* 1999;73:10377-86.
184. Raney AK, et al. Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol* 1997;71:1058-71.
185. Li L, Oropeza CE, et al. Limited effects of fasting on hepatitis B virus (HBV) biosynthesis in HBV transgenic mice. *J Virol* 2009;83:1682-8.
186. Shlomai, A., et al. The “metabolovirus” model of hepatitis B virus suggests nutritional therapy as an effective anti-viral weapon. *Med Hypotheses* 2008;71:53-57.
187. Goodwin B, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell* 2000;6:517–26.
188. Lu TT, et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 2000;6:507–15.
189. Makishima M, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 1999; 284:1362-5.

190. Parks DJ, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 1999;284:1365-8.
191. Seol W, et al. An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* 1996;272:1336-9.
192. Li M, et al. Cloning and characterization of a novel human hepatocyte transcription factor, hB1F, which binds and activates enhancer II of hepatitis B virus. *J Biol Chem* 1998;273:29022-31.
193. Reese VC, et al. Limited effects of bile acids and small heterodimer partner on hepatitis B virus biosynthesis in vivo. *J Virol* 2012;86:2760-8.
194. Xu, X. C. Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor- β in cancer. *Cancer Lett* 2007 253:14-24.
195. Houle, B., et al. Tumor suppressive effect of the retinoic acid receptor β in human epidermoid lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:985-9.
196. Si, S. P., et al. RAR- β 2 mediated growth inhibition in HeLa cells. *Exp Cell Res* 1996;223:102–11
197. Seewaldt, V. L., et al. Expression of retinoic acid receptor mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 1995;6:1077–88
198. Lee, S., et al. Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* 2003;163:1371-8
199. Yang, B., et al. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2003;163:1101-7
200. Jin Kyu Jung, et al. Hepatitis B virus X protein overcomes the growth-inhibitory potential of retinoic acid by downregulating retinoic acid receptor- β 2 expression via DNA methylation. *J Gen Virol* 2010; 91:493-500

201. Stoop J. N. et al. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005;41:771-8.
202. Lin CY, et al. Liver injury is associated with enhanced regulatory T-cell activity in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2007;14:503–11.
203. Xu D, et al. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B *J Immunol* 2006;177:73-47.
204. Ge JWK, et al. Implication of Th17 and Th1 cells in patients with chronic active hepatitis B. *J Clin Immunol* 2010;30:60-7.
205. Zhang JY, et al. Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009;51:81-91.
206. Huang, Z., et al. Pivotal roles of the interleukin-23/T helper 17 cell axis in hepatitis B. *Liver International* 2012;32:894-901.
207. Li J, et al. HBcAg induces interleukin-10 production, inhibiting HBcAg-specific Th17 responses in chronic hepatitis B patients. *Immunol Cell Biol* 2010;88:834-41.
208. Lauer GM, et al. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41-52.
209. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S35-46.
210. Manns MP, et al. Autoimmunity and extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl. 1):39-42.
211. Cacoub P, et al. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. The GERMIVIC. Groupe d'Etude et de Recherche en Medecine Interne et Maladies Infectieuses sur le Virus de l'Hepatite C. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:47-56.

212. Lunel F, et al. Treatment of autoimmune and extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999;31 (Suppl. 1):210-6.
213. Dalekos GN, et al. The antiphospholipid syndrome and infection. *Curr Rheumatol Rep* 2001;3:277-85.
214. Gatselis NK, et al. Clinical significance of organ- and non-organ-specific autoantibodies on the response to anti-viral treatment of patients with chronic hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24:1563-73.
215. Lerat H, et al. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* 1996;97:845–51.
216. Lamelin JP, et al. Lymphotropism of hepatitis B and C viruses: an update and a newcomer. *Int J Clin Lab Res* 1995;25:1–6.
217. Bukh J, et al. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:8239-43.
218. Perrault M, et al. The hepatitis C virus and its hepatic environment: a toxic but finely tuned partnership. *Biochem J* 2009;423:303-14.
219. Dubuisson J, et al. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol* 2008;10:821-7.
220. Pileri P, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938–41.
221. Mosmann TR, et al. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.
222. Boes M, et al. T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. *Nature* 2002;418:983-8.
223. Farci P, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000;288:339-44.
224. Hultgren C, et al. Evidence for a relation between the viral load and genotype and hepatitis C virus-specific T cell responses. *J Hepatol* 2004;40:971-8.

225. Aberle JH, et al. Prospective study of viral clearance and CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C primary infection and reinfection. *J Clin Virol* 2006;36:24-31.
226. Neumann-Haefelin C, et al. T cell response in hepatitis C virus infection. *J Clin Virol* 2005;32:75-85.
227. Micallef JM, et al. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat* 2006;13:34-41.
228. Boulant S, et al. Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol* 2007;88:2204-13.
229. Ogawa K, et al. Review. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009;85:217-28.
230. Gastaminza P, et al. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* 2008;82:2120-9.
231. Tsutsumi T, et al. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity. *Hepatology* 2002;35:937-46.
232. Na SY, et al. Retinoids inhibit interleukin-12 production in macrophages through physical associations of retinoid X receptor and NFkB. *J Biol Chem* 1999;274:7674-80.
233. You LR, et al. Hepatitis C virus core protein enhances NF-kappaB signal pathway triggering by lymphotoxin-beta receptor ligand and tumor necrosis factor alpha. *J Virol* 1999;73:1672-81.
234. Dharancy S, et al. Impaired expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha during hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2005;128:334-42.
235. Cheng Y, et al. Hepatitis C virus infection down-regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and

- carnitine palmitoyl acyl-CoA transferase 1A. *World J Gastroenterol* 2005;11:7591–96.
236. Yasui K, et al. Steatosis and hepatic expression of genes regulating lipid metabolism in Japanese patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2010;45:95–104.
 237. Tanaka N, et al. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 2008;122:124–31.
 238. Tanaka et al. PPARalpha activation is essential for HCV core protein-induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *J Clin Invest* 2008;118:683–94.
 239. Lima-Cabello E, et al. Enhanced expression of pro-inflammatory mediators and liver X-receptor-regulated lipogenic genes in non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C. *Clin Sci (Lond)* 2010;120:239–50.
 240. Kim K, et al. Hepatitis C virus NS5A protein increases hepatic lipid accumulation via induction of activation and expression of PPARgamma. *FEBS Lett* 2009;583:2720–6.
 241. Kim KH, et al. HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355:883-8.
 242. Pazienza V, et al. The hepatitis C virus core protein of genotypes 3a and 1b downregulates insulin receptor substrate 1 through genotype-specific mechanisms. *Hepatology* 2007;45:1164–71.
 243. Pazienza V, et al. Hepatitis C virus core protein genotype 3a increases SOCS-7 expression through PPAR- γ in Huh-7 cells. *J Gen Virol* 2010;91:1678–86.
 244. Yang L, et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:902–11.

245. Yu J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors gamma reverses hepatic nutritional fibrosis in mice and suppresses activation of hepatic stellate cells in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:948–57.
246. Zhao C, et al. PPARgamma agonists prevent TGFbeta1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;350:385–91.
247. Marra F, et al. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;119:466–78.
248. Chang KO, et al. Bile acids promote the expression of hepatitis C virus in replicon-harboring cells. *J Virol* 2007;81:9633–40.
249. Chang KO, et al. Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8733–38.
250. Scholtes C, et al. Enhancement of genotype 1 hepatitis C virus replication by bile acids through FXR. *J Hepatol* 2008;48:192–99.
251. Zhang S, et al. Farnesoid X receptor agonist WAY-362450 attenuates liver inflammation and fibrosis in murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2009;51:380–88.
252. Fiorucci S, et al. The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004;127:1497–512.
253. Fiorucci S, et al. A farnesoid x receptor-small heterodimer partner regulatory cascade modulates tissue metalloproteinase inhibitor-1 and matrix metalloproteinase expression in hepatic stellate cells and promotes resolution of liver fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:584–95.
254. Moriishi K, et al. Critical role of PPARgamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1661–66.

255. Raglow Z, et al. The interaction between HCV and nuclear receptor-mediated pathways. *Pharmacol Ther* 2011;132:30-8.
256. Li Z, et al. Innate immunity in the liver. *Curr Opin Gastroenterol* 2003;19:565-71.
257. Durante-Mangoni E, et al. Hepatic steatosis and insulin resistance are associated with serum imbalance of adiponectin/tumour necrosis factor- α in chronic hepatitis C patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24:1349-57.
258. Negro F. Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2006;12:6756-65.
259. Ramalho F. Hepatitis C virus infection and liver steatosis. *Antiviral Res* 2003;60:125-7.
260. Zekry A, et al. Insulin resistance and steatosis in hepatitis C virus infection. *Gut* 2005;54:903-6.
261. Petta S, et al. Retinol-binding protein 4: a new marker of virus-induced steatosis in patients infected with hepatitis c virus genotype 1. *Hepatology* 2008;48:28-37.
262. Michael M C Lai Hepatitis C Virus Poteins: Direct link to hepatic oxidative stress, steatosis, carcinogenesis and more (editorial). *Gastroenterology* 2002; 122: 568-71.
263. Watashi K, et al. Modulation of retinoid signaling by a cytoplasmic viral protein via sequestration of Sp110b, a potent transcriptional corepressor of retinoic acid receptor, from the nucleus. *Mol Cell Biol* 2003;23:7498-509.
264. C.Zeuzem S, et al. Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis. *J Viral Hepat* 2009;16:75-90.
265. Weisberg IS, et al. Telaprevir: hope on the horizon, getting closer. *Clin Liver Dis* 2009;13:441-52.
266. Berman K, et al. Boceprevir, an NS3 protease inhibitor of HCV. *Clin Liver Dis* 2009;13:429-39.

267. Böcher WO, et al. All-trans retinoic acid for treatment of chronic hepatitis C. *Liver Int* 2008;28:347-54.
268. Morbitzer M, et al. Expression of gastrointestinal glutathione peroxidase is inversely correlated to the presence of hepatitis C virus subgenomic RNA in human liver cells. *J Biol Chem* 2005;280: 8831–41.
269. Kelner MJ, et al. Structural organization of the human gastrointestinal glutathione peroxidase (GPX2) promoter and 30-nontranscribed region: transcriptional response to exogenous redox agents. *Gene* 2000;248:109–16.
270. Hamamoto S, et al. 9-cis retinoic acid enhances the antiviral effect of interferon on hepatitis C virus replication through increased expression of type I interferon receptor. *J Lab Clin Med* 2003;141:58–66.
271. Fallon MB, et al. Hepatic toxicity of vitamin A and synthetic retinoids. *J Gastroenterol Hepatol* 1990;5:334–42.
272. Vahlquist A. Long-term safety of retinoid therapy. *J Am Acad Dermatol* 1992;27:29–33.
273. Geubel AP, et al. Liver damage caused by therapeutic vitamin A administration: estimate of dose-related toxicity in 41 cases. *Gastroenterology* 1991;100:1701–9.
274. Ellis CN, et al. Uses and complications of isotretinoin therapy. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:150–7.
275. Sjogren MH, et al. Interferon alfacon-1 and ribavirin versus interferon alpha-2b and ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2005;50:727–32.
276. Leevy C, et al. Comparison of African American and non African American patients end of treatment response for Peg-IFN alpha21weight-based ribavirin non-responders retreated with IFN Alfacon-11weight based ribavirin. *Hepatology* 2004;40(S1):240A.
277. Kaiser S, et al. Successful retreatment of chronic hepatitis C patients with a nonresponse to standard interferon/ribavirin using daily consensus interferon and ribavirin. *Hepatology* 2004;40(S1):240A.

278. Marcellin P, et al. Retreatment with Pegasys in patients not responding to prior peginterferon alfa2b/ribavirin combination therapy – efficacy analysis of the 12-week induction period of the REPEAT study. *Hepatology* 2005;42(S1):749A.
279. Papamichalis PA, et al. The revised international autoimmune hepatitis score in chronic liver diseases including autoimmune hepatitis/overlap syndromes and autoimmune hepatitis with concurrent other liver disorders. *J Autoimmune Dis* 2007;4:3.
280. Boberg KM. Clin Prevalence and epidemiology of autoimmune hepatitis. *Liver Dis* 2002;6:635–47.
281. Prince MI, et al. The epidemiology of primary biliary cirrhosis . *Clin Liver Dis* 2003;7:795–819.
282. Manns, M. P., et al, Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy. *Hepatology* 2006;43:132–44.
283. Alvarez F, et al. International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929-38.
284. Hennes EM, et al. Simplified Criteria for the Diagnosis of Autoimmune Hepatitis. *Hepatology* 2008;48:169-76.
285. Zachou K, et al. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. *J Autoimmune Dis* 2004;1:2.
286. Marceau G, et al. LKM1 autoantibodies in chronic hepatitis C infection: a case of molecular mimicry? *Hepatology* 2005;42:675–82.
287. Sugimura T, et al. A major CYP2D6 autoepitope in autoimmune hepatitis type 2 and chronic hepatitis C is a three-dimensional structure homologous to other cytochrome P450 autoantigens. *Autoimmunity* 2002;35:501–13.
288. Strassburg CP, et al. Autoantibodies against glucuronosyltransferases differ between viral hepatitis and autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1996;111:1582–92.

289. Philipp T, et al. LKM-3 autoantibodies in chronic hepatitis D recognize the UDP-glucuronosyl-transferases. *Lancet* 1994;344:578–81.
290. Ma Y, et al. Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease. *Hepatology* 2002;35:658–64.
291. Vitozzi S, et al. Anti-soluble liver antigen (SLA) antibodies in chronic HCV infection. *Autoimmunity* 2004;37:217–22.
292. Lapierre P, et al. Formininotransferase cyclodeaminase is organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;116:643–49.
293. Obermayer-Straub P, et al. Hepatic autoantigens in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *Gastroenterology* 2001;121:668–77.
294. Clemente MG, et al. Cytochrome P450 1A2 is a hepatic autoantigen in autoimmune polyglandular syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1353–61.
295. Fusconi M, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:951–55.
296. Montano-Loza A, et al. Frequency and significance of antibodies to cyclic citrullinated peptide in type 1 autoimmune hepatitis. *Autoimmunity* 2006;39:341–48.
297. Oo YH, et al. Autoimmune hepatitis: new paradigms in the pathogenesis, diagnosis, and management. *Hepatol Int* 2010;4:475-93.
298. Czaja AJ, et al. Diagnostic and therapeutic implications of bile duct injury in autoimmune hepatitis. *Liver Int* 2004;24:322–29.
299. Zachou K, et al. Mycophenolate for the treatment of autoimmune hepatitis: prospective assessment of its efficacy and safety for induction and maintenance of remission in a large cohort of treatment-naïve patients. *J Hepatol* 2011;55:636-46.

300. Iwata M, et al. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int Immunol* 2003;15:1017.
301. S Xiao, et al. Retinoic acid increases Foxp3⁺ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF- β -driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression *J Immunol* 2008;181:2277–84.
302. Longhi MS, et al. Functional study of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006;176:4484–91.
303. Longhi MS, et al. Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol* 2004;41:31–7.
304. Longhi MS, et al. Expansion and de novo generation of potentially therapeutic regulatory T cells in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008;47:581–91.
305. Lan RYZ, et al. Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2009;32:43–51.
306. Elias KM, et al.: Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood* 2008;111:1013-20.
307. Schambach F, et al. Activation of retinoic acid receptor- α favours regulatory T cell induction at the expense of IL-17-secreting T helper cell differentiation, *Eur J Immunol* 2007;37:2396-99.
308. C Klemann, et al. Retinoid signals and Th17-mediated pathology. *Japanese Journal of Clinical Immunology* 2009;32:20-8.
309. J J. Heller, et al. Nuclear receptors take center stage in Th17 cell-mediated autoimmunity *J Clin Invest* 2011;121:519–21.
310. Cui G, et al. Liver X receptor (LXR) mediates negative regulation of mouse and human Th17 differentiation. *J Clin Invest* 2011;121:658-70.
311. Yang XXO, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* 2008;28:29–39.

312. Solt LA, et al. Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature* 2011;472:491-4.
313. Xu J, et al. Liver X receptor agonist regulation of Th17 lymphocyte function in autoimmunity. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 401-9.
314. Solt LA, et al. LXR-Mediated Inhibition of CD4(+) T Helper Cells. *PLoS One* 2012;7:e46615.
315. Calkin AC, et al. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:213–24.
316. Joseph SB, et al. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* 2002; 277:11019–25.
317. Chisholm JW, et al. The LXR ligand T0901317 induces severe lipogenesis in the db/db diabetic mouse. *J Lipid Res* 2003;44:2039–48.
318. Kaplan MM, et al. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005;353:1261–73.
319. N K. Gatselis, et al. Early Primary Biliary Cirrhosis: A New Association with Erythema Nodosum of Unknown Origin. *Gastroenterol Res Pract* 2010;2010.pii 121620.
320. T A Zografos, et al. Primary biliary cirrhosis-specific autoantibodies in first degree relatives of Greek primary biliary cirrhosis patients *World J Gastroenterol* 2012;18:4721–28.
321. Prince M, et al. Survival and symptom progression in a geographically based cohort of patients with primary biliary cirrhosis: follow-up for up to 28 years. *Gastroenterology* 2002;123:1044-51.
322. Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines. *Hepatology* 2000;31:1005-13.
323. Sorokin A, et al. Primary biliary cirrhosis, hyperlipidemia, and atherosclerotic risk: a systematic review. *Atherosclerosis* 2007;194:293-9.

324. Poupon RE, et al. Cholesterol-lowering effect of ursodeoxycholic acid in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1993;17:577-82.
325. Bogdanos DP, et al. Antimitochondrial and other autoantibodies. *Clin Liver Dis* 2003;7:759–77.
326. Metcalf JV, et al. Natural history of early primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1996;348:1399-402.
327. Talwalkar JA, et al. Primary biliary cirrhosis. *Lancet* 2003;362:53-61.
328. Rigopoulou EI, et al. Antimitochondrial antibodies of immunoglobulin G3 subclass are associated with a more severe disease course in primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2007;27:1226-31.
329. Rigopoulou EI, et al. Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gut* 2005;54:528-32.
330. Roll J, et al. The prognostic importance of clinical and histologic features in asymptomatic and symptomatic primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 1983;308:1-7.
331. Hohenester S, et al. Primary biliary cirrhosis. *Semin Immunopathol* 2009;31:283-307.
332. Jones DE Pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Gut*. 2007;56:1615-24.
333. Beuers U, et al. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: potential mechanisms of action and therapeutic applications. *Hepatology* 1998;28:1449-53.
334. Beuers U, et al. New light on anion exchangers in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2008;49:881-3.
335. Poupon R, et al. Genetic factors of susceptibility and of severity in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2008;49:1038-45.
336. Migliaccio C, et al. Monoclonal antibodies to mitochondrial E2 components define autoepitopes in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1998;161:5157-63.

337. Gershwin ME, et al. Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunol Rev* 2000;174:210-25.
338. Parés A, et al. Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a double-blind controlled multicentric trial. UDCA-Cooperative Group from the Spanish Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2000;32:561-6.
339. Leuschner U, et al. Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a controlled double-blind trial. *Gastroenterology* 1989;97:1268-74.
340. Combes B, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1995;22:759-66.
341. Corpechot C, et al. The effect of ursodeoxycholic acid therapy on liver fibrosis progression in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2000;32:1196-9.
342. Poupon RE, et al. Combined analysis of randomized controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1997;113:884-90.
343. Parés A, et al. Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology* 2006;130:715-20.
344. Corpechot C, et al. Biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2008;48:871-7.
345. J M Erickson, et al. Possible role of endogenous retinoid (vitamin A) toxicity in the pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *J Theor Biol* 2000;206:47-54.
346. Harada K, et al. Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 2009;157:261–70.

347. K Harada, et al. Biliary Innate Immunity: Function and Modulation. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: pii 373878.
348. Rong G, et al. Imbalance between T helper type 17 and T regulatory cells in patients with primary biliary cirrhosis: the serum cytokine profile and peripheral cell population. *Clin Exp Immunol* 2009;156:217–25.
349. Lan RY, et al. Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:729–37.
350. Liu B, et al. Antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis: a subset of primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2008;28:233–9.
351. Aoki CA, et al. IL-2 receptor alpha deficiency and features of primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2006;27:50–3.
352. Wakabayashi K, et al. IL-2 receptor alpha(-/-) mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006;44:1240–9.
353. El A. Wohlfert, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) and Immunoregulation: Enhancement of Regulatory T Cells through PPAR γ Dependent and Independent Mechanisms. *Journ Immunol* 2007;178:4129-35.
354. Chapman R, et al. Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2008;14:3350–59.
355. Aoki CA, et al. The immunobiology of primary sclerosing cholangitis. *Autoimmun Rev* 2005;4:137–43.
356. Saich R, et al. Primary sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis and overlap syndromes in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:331–37.
357. Karlsen TH, et al. Genetic epidemiology of primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2007;13:5421–31.
358. Aron JH, et al. The immunobiology of primary sclerosing cholangitis. *Semin Immunopathol* 2009;31:383-97.
359. Abdalian R, et al. Sclerosing cholangitis: a focus on secondary causes. *Hepatology* 2006;44:1063–74.

360. Webster GJ, et al. Autoimmune pancreatitis/IgG4-associated cholangitis and primary sclerosing cholangitis—overlapping or separate diseases? *J Hepatol* 2009;51:398–402.
361. Bambha K, et al. Incidence, clinical spectrum, and outcomes of primary sclerosing cholangitis in a United States community. *Gastroenterology* 2003;125:1364–69.
362. Burak KW, et al. Is there a role for liver biopsy in primary sclerosing cholangitis? *Am J Gastroenterol* 2003;98:1155–58.
363. Kamisawa T, et al. Primary sclerosing cholangitis may be overestimated in Japan. *J Gastroenterol* 2005;40:318–9.
364. Bjornsson E, et al. Immunoglobulin G4 associated cholangitis: description of an emerging clinical entity based on review of the literature. *Hepatology* 2007;45:1547–54.
365. Mendes FD, et al. Elevated serum IgG4 concentration in patients with primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2070–5.
366. Seki E, et al. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 2008;48:322–35.
367. Karrar A, et al. Biliary epithelial cell antibodies link adaptive and innate immune responses in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2007;132:1504–14.
368. Buckles DC, et al. In primary sclerosing cholangitis, gallbladder polyps are frequently malignant. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1138–42.
369. Bergquist A, et al. Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2002;36:321–7.
370. Steinberg W. The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol* 1990;85:350–5.
371. Charatcharoenwitthaya P, et al. Utility of serum tumor markers, imaging, and biliary cytology for detecting cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2008;48:1106–17.

372. Graziadei IW, et al. Long-term results of patients undergoing liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 1999;30:1121–7.
373. Mayo Primary Sclerosing Cholangitis-Ursodeoxycholic Acid Study Group. Lindor KD. Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. *N Engl J Med* 1997;336:691–5.
374. Lindor KD, et al. Randomized, double-blind controlled trial of high-dose ursodeoxycholic acid for primary sclerosing cholangitis [Abstract]. *Hepatology* 2008;48:378A.
375. Ghazale A, et al. Immunoglobulin G4-associated cholangitis: clinical profile and response to therapy. *Gastroenterology* 2008;134:706–15.
376. Mizuno S, et al. Bezafibrate for the treatment of primary sclerosing cholangitis. *J Gastroenterol* 2010;45:758-62.
377. Mora JR, et al. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* 2006;314:1157–60.
378. Eksteen B, et al. Gut homing receptors on CD8 T cells are retinoic acid dependent and not maintained by liver dendritic or stellate cells. *Gastroenterology* 2009;137:320-9.
379. Adams DH, et al. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2006;6:244–51.
380. Neumann, K., et al. Connecting liver and gut: Murine liver sinusoidal endothelium induces gut tropism of CD4+ T cells via retinoic acid. *Hepatology* 2012;55:1976–84.
381. C Clemente et al. Serum retinol and risk of hepatocellular carcinoma in patients with Child-Pugh class cirrhosis . *Cancer Letters* 2002;178:123-9.
382. Pemberton PW, et al. Oxidant stress in type I autoimmune hepatitis: the link between necroinflammation and fibrogenesis? *Biochim Biophys Acta* 2004;1689:182-9.

383. C.D Yadav et al. Serum and liver micronutrient antioxidants and serum oxidative stress in patients with chronic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2634-9.
384. S K Jain et al. Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. *Journ Hepatology* 2002;36:805-11.
385. Ara C, et al. Retinoic acid modulates gap junctional intercellular communication in hepatocytes and hepatoma cells. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1758-65.
386. Lee KA, et al. Retinoic acid alleviates Con A-induced hepatitis and differentially regulates effector production in NKT cells. *Eur Journ Immunol* 2012;42:1685-94.
387. F Maillot. Alcohol et Nutrition. *Pathol Biol* 2001;49 :683-8.
388. Mehta K, et al. Inhibition by all-trans-retinoic acid of tumor necrosis factor and nitric oxide production by peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 1994;55:336-42.
389. Kang SG, et al. Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2007;179:3724-33.
390. Balmer ML, et al. Significance of serum adiponectin levels in patients with chronic liver disease. *Clin Sci (Lond)* 2010;119:431-6.
391. Bahr MJ, et al. Decreased hepatic RBP4 secretion is correlated with reduced hepatic glucose production but is not associated with insulin resistance in patients with liver cirrhosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;70:60-5.
392. Odegaard JI, et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 2008;7:496–507.
393. Reiman RM, et al. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect Immun* 2006;74:1471-9.
394. Curtis J L. Plasma Vitamin A levels-a diagnostic indicator of Hepatitis in an institutionalized Mentally retarded population. *Am J Ment Defic* 1976;81:12-7.

395. P N Newsome et al Low serum retinol levels are associated with hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease . *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1295-1301.
396. Ray MB, et al. Serum vitamin A deficiency and increased intrahepatic expression of cytokeratin antigen in alcoholic liver disease. *Hepatology* 1988;8:1019-26.
397. Esteller M, et al. Hypermethylation-associated Inactivation of the Cellular Retinol-Binding-Protein 1 Gene in Human Cancer. *Cancer Res* 2002;62:5902-5.
398. Rochi E et al Hepatic tocopherol content in primary hepatocellular carcinoma and liver metastases. *Hepatology* 1997;26:67-72.
399. Ikezaki et al. Cellular vitamin A binding proteins in liver tumors and adjacent tissues. *Cancer* 1985;55:2405-10.
400. Masataka Okuno et al. Retinoids in liver fibrosis and cancer. *Front Biosc* 2001;6:53-64.
401. Jorgensen RA, et al. Serum lipid and fat-soluble vitamin levels in primary sclerosing cholangitis. *J Clin Gastroenterol* 1995;20:215-9.
402. Kurlandsky SB, et al. Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *J Biol Chem* 1995;270:17850–7.
403. EASL Jury. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002: Geneva, Switzerland. Consensus statement (short version). *J Hepatol* 2003;38:533-40.
404. EASL Jury. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, 26-28, February 1999. Clinical Practice Guidelines for HCV. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 1999;30:956-61.
405. Neuschwander-Tetri BA, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37:1202-19.
406. Dalekos GN, et al. Autoantibodies and defined target autoantigens in autoimmune hepatitis: an overview. *Eur J Intern Med* 2002;13:293-303.

407. Czaja AJ. Autoimmune liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2009;25:215-22.
408. Tsikrikoni A, et al. Markers of cell activation and apoptosis in bone marrow mononuclear cells of patients with autoimmune hepatitis type 1 and primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2005;42:393-9.
409. Zachou K, et al. Presence of high avidity anticardiolipin antibodies in patients with autoimmune cholestatic liver diseases. *Clin Immunol* 2006;119:203-12.
410. Poupon R, et al. Chronic cholestatic diseases. *J Hepatol* 2000;32(1 Suppl):129-40.
411. Lindor KD, et al. American Association for Study of Liver Diseases. Primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2009;50:291-308.
412. Knodell RG, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-5.
413. Zachou K, et al. Anti-cardiolipin antibodies in patients with chronic viral hepatitis are independent of beta2-glycoprotein I cofactor or features of antiphospholipid syndrome. *Eur J Clin Invest* 2003;33:161-8.
414. Georgiadou SP, et al. Occult hepatitis B virus infection in Greek patients with chronic hepatitis C and in patients with diverse nonviral hepatic diseases. *J Viral Hepat* 2004;11:358-65.
415. Kromidas S. HPLC Made to measure. A practical handbook for optimization. 2000:3-48.
416. McMaster MC. HPLC: A practical User's Guide. 2nd edition, John Wiley & Sons Inc 2006.
417. Dong MW. Modern HPLC for Practicing Scientists. John Wiley & Sons, Inc Canada 2006.
418. Li S, et al. Quantification of retinoyl-beta-glucuronides in rat urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996;683:155-62.

419. Chatzimichalakis PF, et al. Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;805:289-96.
420. Barua AB, et al. Reversed-phase gradient high-performance liquid chromatographic procedure for simultaneous analysis of very polar to nonpolar retinoids, carotenoids and tocopherols in animal and plant samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;707:69-79.
421. Hartmann S, et al. Determination of retinol and retinyl esters in human plasma by high-performance liquid chromatography with automated column switching and ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;751:265-75.
422. Moulas AN, et al. Serum retinoic acid, retinol and retinyl palmitate levels in patients with lung cancer. *Respirology* 2006;11:169-74.
423. Rowbotham SE, et al. Role of UDP-glucuronosyltransferase isoforms in 13-cis retinoic acid metabolism in humans. *Drug Metab Dispos* 2010;38:1211-7.
424. Kida Y, et al. Interleukin-1 as an injury signal mobilizes retinyl esters in hepatic stellate cells through down regulation of lecithin retinol acyltransferase. *PLoS One* 2011;6:e26644.
425. Phillips JR, et al. Fat-soluble vitamin levels in patients with primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2745-50.
426. Lepage G, et al. Ursodeoxycholic acid improves the hepatic metabolism of essential fatty acids and retinol in children with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1997;130:52-8.
427. López-Velázquez JA, et al. Nuclear receptors in nonalcoholic Fatty liver disease. *J Lipids* 2012;2012:139875.
428. Mobasher A. Study on Cytochrome P-450 Dependent Retinoic Acid Metabolism and its Inhibitors as Potential Agents for Cancer Therapy. *Sci Pharm* 2011;79:921–35.

- 429. Purushottamachar P, et al. First chemical feature-based pharmacophore modeling of potent retinoidal retinoic acid metabolism blocking agents (RAMBAs): Identification of novel RAMBA scaffolds. *Eur J Med Chem* 2012;47:412-23.
- 430. Sun SY, et al. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;41:41-55.
- 431. Njar VC, et al. Retinoic acid metabolism blocking agents (RAMBAs) for treatment of cancer and dermatological diseases. *Bioorg Med Chem* 2006;14:4323-40.
- 432. Patel JB, et al. Novel retinoic acid metabolism blocking agents have potent inhibitory activities on human breast cancer cells and tumour growth. *Br J Cancer* 2007;96:1204-15.
- 433. Huynh CK, et al. Inhibitory effects of retinoic acid metabolism blocking agents (RAMBAs) on the growth of human prostate cancer cells and LNCaP prostate tumour xenografts in SCID mice. *Br J Cancer* 2006;94:513-23.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα καροτενοειδή, όταν απορροφηθούν από το γαστρεντερικό σωλήνα, μεταβολίζονται σε ρετινόλη με τη βοήθεια της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας και των εντεροκυττάρων. Η ρετινόλη αποθηκεύεται με τη μορφή εστέρων σε λιποσταγονίδια, κυρίως στα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος, αλλά και στα παρεγχυματικά, μετατοπιζόμενη μεταξύ τους, ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού, τη διαθεσιμότητα από την τροφή και συνθήκες που αφορούν την κατάσταση του ήπατος. Από εκεί, συζευγμένη με την πρωτεΐνη σύνδεσης της ρετινόλης, μεταφέρεται στα διάφορα κύτταρα στόχους σε όλο το σώμα, όπου οξειδώνεται στα ισομερή του ρετινοϊκού οξέος (9-cis,13-cis,all-trans). Οι δράσεις των ρετινοϊκών οξέων στον άνθρωπο χωρίζονται σε άμεσες και έμμεσες. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην όραση, την εμβρυογένεση, την ανάπτυξη, το μεταβολισμό και την ανοσία. Δρουν επίσης ως μόρια πρόσδεσης σε κυτταρικούς πυρηνικούς υποδοχείς. Οι τελευταίοι ανήκουν σε δύο οικογένειες : οι Retinoic acid Receptors (RAR) α, -β και -γ δείχνουν υψηλή συνάφεια με το all-trans ρετινοϊκό οξύ. Οι Retinoid-X-receptors (RXR) α, -β και -γ, απαντούν σε υψηλές συγκεντρώσεις all-trans ρετινοϊκού οξέος, αλλά έχουν 40 φορές μεγαλύτερη συνάφεια προς το 9-cis ρετινοϊκό οξύ. Οι RXR σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με τους άλλους πυρηνικούς υποδοχείς, οι οποίοι δεν μπορούν να δράσουν παρά μόνο σε μορφή ετεροδιμερούς με τον RXR. Ο ρόλος τους συνιστάται στην πρόσδεση σε συγκεκριμένες περιοχές γονιδίων στόχων και ο έλεγχος της έκφρασης τους, μέσω καταστολής ή επάυξυνσης της δράσης τους. Η προσβολή του ήπατος από παράγοντες όπως οι ηπατοτρόποι

ιοί, η αιθανόλη, το λίπος ή η αυτοάνοση φλεγμονώδης αντίδραση, επιφέρει την ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων και την έναρξη των βιοχημικών και ιστολογικών διεργασιών που οδηγούν στην ίνωση και την κίρρωση. Ενεργοποίηση ονομάζεται η μετατροπή του ηρεμούντος και πλούσιου σε βιταμίνη Α αστεροειδούς κυττάρου σε μυοϊνοβλάστη που έχει απολέσει τη ρετινόλη, πολλαπλασιάζεται, παράγει προϊόντα ινικής και συστέλλεται. Ασφαλώς, και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία. Για παράδειγμα, ο μεταβολισμός της ρετινόλης κατά την ενεργοποίηση επηρεάζει τη δραστηριότητα των NK κυττάρων είτε θετικά μέσω της επαγωγής του RAE1, είτε αρνητικά μέσω του TGF-β και του SOCS1 που εμποδίζει τη σηματοδότηση της IFN-γ. Τα πλήρως ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα καθίστανται ανθεκτικά στη φόνευση από τα κύτταρα NK, καθώς το RAE1 σταματά να εκφράζεται, γεγονός που οδηγεί στην ίνωση. Νέοι τομείς όπου ο ρόλος των ρετινοειδών ερευνάται είναι η αυτοανοσία και γενικότερα η ανοσοαπόκριση. Η ενεργοποίηση, ο πολλαπλασιασμός και ο αποικισμός των ιστών από τα λεμφοκύτταρα, η διαφοροποίηση των Τ-βοηθητικών κυττάρων η παραγωγή ειδικών αντισωμάτων και η ανοσορρύθμιση αποτελούν διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν τα ρετινοειδή. Το all-trans ρετινοϊκό οξύ όχι μόνο προάγει τη δημιουργία Treg κυττάρων, αλλά αναστέλλει τη διαφοροποίηση των Th17. Επιπλέον, καταστέλλει τους υποδοχείς RORα και RORγt που φαίνεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην προώθηση της Th-17 αντίδρασης, διαδικασία που ελέγχεται από τον LXR.

Στόχος αυτής της μελέτης είναι ο προσδιορισμός των επιπέδων των ρετινοειδών στον ορό ασθενών με χρόνιες ηπατοπάθειες, η σύγκριση μεταξύ πασχόντων από διαφορετικές ασθένειες και ο συσχετισμός με κλινικά χαρακτηριστικά, ιστολογικά ευρήματα, τις συνήθως χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές εξετάσεις και τον προγνωστικό δείκτη Child-Pugh.

Η ταυτόχρονη μέτρηση για πρώτη φορά των επιπέδων ρετινόλης και ρετινοϊκών οξέων σε ηπατοπαθείς και υγιείς και οι συγκρίσεις μεταξύ τους οδήγησε σε χρήσιμα συμπεράσματα. Σε όλους τους ασθενείς οι συγκεντρώσεις των ρετινοϊκών οξέων βρέθηκαν χαμηλότερες συγκριτικά με τους υγιείς, ακόμη και εκεί (PBC και NAFLD) όπου οι συγκεντρώσεις της ρετινόλης ήταν σημαντικά υψηλότερες από αυτές των υγιών, γεγονός που καταδεικνύει πως οι συγκεντρώσεις των ρετινοϊκών οξέων δεν εξαρτώνται από τις συγκεντρώσεις της ρετινόλης. Παρατηρήθηκε επίσης ότι οι κίρρωτικοί ασθενείς είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις ρετινόλης και 13-cis ρετινοϊκού οξέος, συγκριτικά με τους μη κίρρωτικούς, ενώ ασθενείς με μεγαλύτερη βαθμολογία κατά Child-Pugh είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις ρετινόλης. Οι διαφορές στις συγκεντρώσεις σε σχέση με την ιστολογική ίνωση και ενεργότητα είναι σχετικά μικρές, αλλά υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των ρετινοειδών και της ηπατικής βιοσυνθετικής ικανότητας. Τα επίπεδα της αλβουμίνης και της χοληστερόλης συσχετίζονται θετικά, ενώ οι τιμές των AST, χολερυθρίνης και INR αρνητικά με τις συγκεντρώσεις της ρετινόλης. Οι συγκεντρώσεις του 13-cisRA συσχετίζονται θετικά με τη χοληστερόλη και αρνητικά με τη χολερυθρίνη, ενώ τα επίπεδα του ATRA συσχετίζονται αρνητικά με τις τιμές της αλκαλικής

φωσφατάσης. Τέλος, στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις ρετινόλης μεταξύ ανενεργών φορέων του HBV και πασχόντων από χρόνια ενεργό νόσο, χωρίς σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των οξέων.

Είναι δύσκολο να αποδειχθεί *in vivo* πως τα επίπεδα των ρετινοειδών στον ορό σχετίζονται με τις έμμεσες δράσεις τους στους πυρηνικούς υποδοχείς. Αυτό καταδεικνύεται και από το γεγονός πως το 9-*cis* ρετινοϊκό οξύ, το ισομερές με τη μεγαλύτερη επίδραση στους πυρηνικούς υποδοχείς, δεν ανιχνεύτηκε στον ορό, αν και η μέθοδος παρείχε αυτή τη δυνατότητα.

Η απώλεια των ρετινοειδών και η μετατροπή των αστεροειδών κυττάρων σε μυοϊνοβλάστες αποτελούν καθοριστικά σημεία στις ινωτικές διαδικασίες. Καθώς τα ρετινοειδή είναι δυνητικά βλαπτικά αλλά και αναγκαία στα κύτταρα, απαιτείται ένα σύστημα που να διασφαλίζει ότι φθάνουν σε αυτά, επαρκείς αλλά όχι τοξικές ποσότητες. Τουλάχιστον στο υγιές ήπαρ, όταν τα επίπεδα των οξέων ανεβαίνουν, τα κυττοχρώματα ενεργοποιούνται με σκοπό οι συγκεντρώσεις να επανέλθουν στο φυσιολογικό, ενώ η παραγωγή τους από τη ρετινόλη ελέγχεται από τις αφυδρογονάσεις. Έχει αποδειχθεί πως το ρετινοϊκό οξύ έχει τη δυνατότητα να αυτορυθμίζει τα επίπεδα του ελέγχοντας την επαγωγή των CYP και LRAT ακόμη και σε συνθήκες μειωμένης πρόσληψης ρετινόλης από τις τροφές.

Κατά την ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων παρατηρείται μείωση του ρυθμού μεταγραφής της LRAT, με παράλληλη αύξηση των επιπέδων της Ιντερλευκίνης-1 που δρα ως σήμα τραυματισμού. Σε ένα περιβάλλον που

κυριαρχείται από το οξειδωτικό stress, με μειωμένη δυνατότητα εστεροποίησης, η οξείδωση της ρετινόλης σε οξύ φαντάζει αναπόφευκτη. Τα αυξημένα ενδοκυττάρια επίπεδα οξέων αυξάνουν τη δραστηριότητα των κυττοχρωμάτων με στόχο να επιτευχθούν πάλι φυσιολογικές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, στη μελέτη μας τα επίπεδα των οξέων ήταν χαμηλότερα από αυτά των υγιών. Αν και θα μπορούσε να υποτεθεί πως εφόσον κατά την ίνωση μειώνεται η ρετινόλη, τα οξέα μειώνονται αναλόγως, οι συγκεντρώσεις των οξέων στη μελέτη μας ήταν χαμηλές ακόμα και σε ασθενείς με αυξημένες συγκεντρώσεις ρετινόλης. Το εύρημα αυτό αποδεικνύει πως ο υπερκαταβολισμός των οξέων και η υπερδραστηριότητα των κυττοχρωμάτων ευθύνεται για τα παρατηρούμενα χαμηλά επίπεδα. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι οι φλεγμονώδεις κυττοκίνες συνεχίζουν και επάγουν τη δραστηριότητα των κυττοχρωμάτων χωρίς να αναγνωρίζουν φυσιολογικά επίπεδα. Δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που να στηρίζουν αυτή την υπόθεση, σε αναλογία με την Ιντερλευκίνη-1 και την εστεροποίηση της ρετινόλης. Όμως, παρά το γεγονός ότι οι μελέτες για το μεταβολισμό των ρετινοειδών στις χρόνιες ηπατοπάθειες είναι ελάχιστες, υπάρχουν στοιχεία που αφορούν τη δράση της αιθανόλης. Η αλκοολική ηπατική νόσος είναι η μόνη χρόνια ηπατοπάθεια όπου ο υπερκαταβολισμός του ρετινοϊκού οξέος έχει αποδειχθεί. Η μελέτη μας είναι συμβατή με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα, καθώς οι αλκοολικοί ασθενείς έχουν τα χαμηλότερα επίπεδα ρετινόλης, ενώ οι συγκεντρώσεις των οξέων είναι σημαντικά χαμηλότερες από αυτές των υγιών. Οι ασθενείς με NAFLD είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις οξέων συγκριτικά με

τους υγιείς, αν και είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις οξέων από όλους τους άλλους ασθενείς, εύρημα χωρίς στατιστική σημασία. Είναι επίσης αξιοσημείωτο πως τα επίπεδα της ρετινόλης ήταν υψηλότερα σε αυτή την ομάδα ασθενών συγκριτικά με τους υγιείς. Ωστόσο, σε αυτούς τους ασθενείς, η υπερλιπιδαιμία αποτελεί χαρακτηριστικό της νόσου και η θετική συσχέτιση μεταξύ ρετινόλης και χοληστερόλης που παρατηρήθηκε στη μελέτη μας, θα μπορούσε να εξηγήσει το εύρημα. Γενικά οι ασθενείς αυτής της ομάδας είχαν ελάχιστα ευρήματα ηπατικής δυσλειτουργίας και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις οξέων συγκριτικά με τις άλλες ομάδες ασθενών.

Ο ιός της Ηπατίτιδας C χρησιμοποιεί τα λιποσταγονίδια όπου αποθηκεύονται τα ρετινοειδή για να πετύχει τον πολλαπλασιασμό του και κυκλοφορεί στο αίμα σε συμπλέγματα λιποπρωτεϊνών. Η επίδραση των ρετινοειδών στην παραγωγή κυττοκινών και στο οξειδωτικό stress φαίνεται πως αλλοιώνεται στη νόσο, η οποία συχνά συνυπάρχει με στεάτωση. Ο συνδυασμός λοίμωξης, υπερλιπιδαιμίας και στεάτωσης θα μπορούσε να εξηγήσει τις στατιστικά ασήμαντες διαφορές στις συγκεντρώσεις ρετινόλης, ενώ τα χαμηλά επίπεδα των οξέων θα μπορούσαν να αποδοθούν σε υπερκαταβολισμό. Τα ρετινοειδή επηρεάζουν και τους μηχανισμούς της χρόνιας HBV λοίμωξης με δράσεις που συνδέουν τους πυρηνικούς υποδοχείς με τον πολλαπλασιασμό του ιού, την ογκογενετικότητα του αλλά και την ανοσοαπόκριση του ξενιστή. Η ομάδα αυτή απαρτίστηκε από ανενεργούς φορείς και ασθενείς με χρόνια ενεργό νόσο. Οι δεύτεροι είχαν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις ρετινόλης από τους πρώτους, χωρίς σημαντικές διαφορές στα οξέα, στα οποία ωστόσο οι

υγιείς είχαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις και από τις δύο υποομάδες. Η ισορροπία Treg/Th-17 διαταράσσεται στα αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα και τα ρετινοειδή φαίνεται πως εμπλέκονται σ' αυτό. Το ρετινοϊκό οξύ είναι ρυθμιστής των εξαρτώμενων από τον TGF- β ανοσοαντιδράσεων, ικανός να εμποδίσει την οδηγούμενη από την Ιντερλευκίνη-6 επαγωγή των προφλεγμονωδών Th17 κυττάρων και να προάγει την Treg κυτταρική διαφοροποίηση, γεγονός που υποδηλώνει πως η απώλεια των ρετινοειδών μπορεί να επιδεινώσει αυτοάνοσες αντιδράσεις σε ορισμένους ασθενείς. Αντίθετα, η προσθήκη all-trans ρετινοϊκού οξέος σε αυτοάνοσα πειραματικά μοντέλα βελτιώνει την κλινική πορεία της νόσου. Επομένως, το γεγονός πως στα οξέα μετρήθηκαν χαμηλές συγκεντρώσεις δεν αποτελεί έκπληξη. Η ανισορροπία Treg/Th-17 σχετίζεται και με την παθοφυσιολογία της PBC. Κύτταρα, όπως τα δενδριτικά και τα κολποειδικά ενδοθηλιακά, που εκφράζουν ισοένζυμα της αφυδρογονάσης της ρετινάλης, είναι ικανά να παράγουν οξέα οξειδώνοντας τη ρετινόλη. Το γεγονός αυτό επιδρά στον τροπισμό των λεμφοκυττάρων και σχετίζεται με τους μηχανισμούς έλευσης των PSC και IBD. Στη μελέτη μας τα επίπεδα της ρετινόλης ήταν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με PBC/PSC, εύρημα που με την πρώτη ματιά αντίκειται στις υπάρχουσες μελέτες. Ωστόσο, οι ασθενείς μας σε αντίθεση με αυτούς των προηγούμενων μελετών, ελάμβαναν θεραπεία με UDCA, η χρήση του οποίου στην κυστική ίνωση έχει δείχθει πως βελτιώνει το μεταβολισμό της ρετινόλης. Με τον τρόπο αυτό εξηγούνται τα παρατηρηθέντα υψηλά επίπεδα ρετινόλης σε σύγκριση με τους υγιείς.

Μελέτες σε καλλιέργειες αστεροειδών κυττάρων έδειξαν πως σε συνθήκες υγείας, η επάρκεια ρετινοϊκού οξέος διατηρεί ανέπαφο τον άξονα STAT, παρέχοντας ένα ευνοϊκό αποτέλεσμα στην Th ανοσοαπόκριση και καθιστά τα NK κύτταρα ικανά να φονεύσουν τα (πρώιμα) ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα, πριν αυτά σταματήσουν να εκφράζουν το γονίδιο RAE-1. Επομένως, ο μεταβολισμός της ρετινόλης μπορεί να προάγει την ενεργοποίηση των NK κυττάρων μέσω της επαγωγής του γονιδίου, αλλά ενδέχεται και να καταστείλει τη δράση τους με την επαγωγή του TGF-β ή του SOCS1 που εμποδίζει τη σηματοδότηση της IFN-γ. Στη μελέτη μας τα επίπεδα των οξέων στον ορό των κίρρωτικών ασθενών ήταν χαμηλά. Αν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ακολουθούν τα επίπεδα του ορού, ίσως εμποδίζεται η ενεργοποίηση των NK κυττάρων. Με βάση τα ευρήματά μας, προτείνεται ο παρακάτω μηχανισμός σχετικά με την απώλεια των ρετινοειδών και την ίνωση: Η ηπατοκυτταρική βλάβη προκαλεί την ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων, η οποία οδηγεί σε υδρόλυση των ρετινυλικών εστέρων, οξείδωση της ρετινόλης σε ρετινοϊκό οξύ. Η αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων του επάγει υπέρμετρα τη λειτουργία του κυτοχρώματος προκαλώντας υπερκαταβολισμό και στη συνέχεια μείωση των συγκεντρώσεων του. Έτσι προκαλούνται διαταραχές στην ισορροπία Treg/Th-17, καταστολή του STAT και αλλοιώσεις στην ανοσοαπόκριση έναντι των ιών. Επιπλέον, τα κύτταρα NK γίνονται ανίκανα να φονεύσουν τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα, περισσότερα από αυτά μεταπίπτουν σε πλήρη ενεργοποίηση και η ίνωση προχωρεί. Ο βαθμός στον οποίο η αυξημένη οξείδωση των ρετινοϊκών οξέων συμβάλει

στους ινωτικούς μηχανισμούς δεν είναι ξεκάθαρος, καθώς δεν είναι γνωστό αν πρώτα μειώνονται οι συγκεντρώσεις των οξέων και έπειτα ξεκινούν οι παθοφυσιολογικές διαδικασίες ή το αντίστροφο. Ωστόσο, μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες δείχνουν πως τα οξέα αναστέλλουν την ανάπτυξη της Th17 ανοσοαπόκρισης και ευαισθητοποιούν τα NK κύτταρα ώστε να φονεύσουν τα πρώιμα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα, μια διαδικασία που θεωρητικά σταματά την ίνωση στη γέννηση της. Επιπλέον, εφ' όσον οι ιοί χρησιμοποιούν τις επηρεαζόμενες από τα ρετινοειδή ανοσοαντιδράσεις για να επιβιώσουν και να αναπαραχθούν, αλλοίωση των επιπέδων τους θα μπορούσε να τροποποιήσει την ανοσοαπόκριση και την έκβαση μιας ιογενούς λοίμωξης. Φαίνεται λοιπόν χρήσιμη η προσπάθεια ελέγχου του καταβολισμού τους, με στόχο την ανάσχεση της ίνωσης.

Το all-trans ρετινοϊκό οξύ χρησιμοποιήθηκε σε αιματολογικές και άλλες κακοήθειες αλλά ο καταβολισμός του μειώνει την αποτελεσματικότητά του. Οι αναστολείς του μεταβολισμού των ρετινοϊκών οξέων αποτελούν αντικείμενο μελέτης, στην προσπάθεια να επιτευχθούν τα βέλτιστα επίπεδα all-trans ρετινοϊκού οξέος, χωρίς σημαντική ηπατοτοξικότητα. Φαίνεται πως αυτοί οι παράγοντες θα μπορούσαν να δοκιμασθούν και σε ασθενείς που είναι επιρρεπείς στην κίρρωση.

SUMMARY – CONCLUSIONS

Provitamin A carotenoids, once absorbed from gastrointestinal tract, are metabolized to retinol with the aid of local microbial flora and enterocytes. Retinol is stored as retinyl esters in lipid droplets, mainly in stellate cells but also in parenchymal cells. Depending on total body retinol needs, availability from food and conditions regarding liver health it is shifted from parenchymal to hepatic stellate cells and vice versa. From the liver, retinol is delivered, conjugated to Retinol Binding Protein 4 (RBP4), to various target cells in the body. There, it is oxidized to the isomers of retinoic acid (9-cis, 13-cis, and all-trans).

Retinoic acids' actions in human can be classified as immediate and intermediate. They play important roles in vision, embryogenesis, development, metabolism and immunity. They also act as ligands in cellular nuclear receptors. The latter are divided in two families: Retinoic acid Receptors (RAR) α , $-\beta$ and $-\gamma$ show high affinity to all-trans retinoic acid. Retinoid-X-receptors (RXR) α , $-\beta$ and $-\gamma$, respond to high concentrations of all-trans retinoic acid, but have 40 times higher affinity to 9-cisRA. RXRs form homodimers or heterodimers with other class II nuclear receptors. It has to be noted that all the other class II nuclear receptors can't act, unless they form heterodimers with RXR. Their role consists in binding to certain areas of target genes and controlling their expression mainly by acting as enhancers or suppressors.

The attack of liver by factors such as hepatotropic viruses, alcohol, fat accumulation or autoimmune inflammatory reactions results in the activation of Hepatic stellate cells (HSCs) and in the beginning of biochemical and histological processes that lead to fibrosis and cirrhosis. HSCs "activation" refers to the conversion of a resting vitamin A-rich cell to a retinoid depleted myofibroblast that is proliferating, fibrogenic, and contractile. Of course, many other immune cells participate in this process. For example, retinol metabolism during HSC activation can promote NK cell activation via induction of RAE1, but can also downregulate NK cell activity via induction of TGF- β that inhibits NK cell activity, or induction of SOCS1 that inhibits IFN- γ signaling. Fully activated HSCs become resistant to NK cell killing because of lack of RAE1 expression, leading to chronic liver fibrosis and disease.

Autoimmunity and Inflammatory response in general are newer fields where the role of retinoic acids is under research. Lymphocyte activation and proliferation, T-helper-cell differentiation, tissue-specific lymphocyte homing, the production of specific antibody isotypes and regulation of the immune response are procedures where retinoic acids participate. All-trans retinoic acid (RA) not only enforces the generation of Treg cells but also inhibits the differentiation of Th17 cells. Moreover, RA is a suppressor of ROR α and ROR γ t (orphan nuclear receptors), who seem to play a key promoting role in Th-17 immune reaction a procedure is controlled by LXR.

The purpose of this study is to measure retinoids' serum levels in patients with chronic liver diseases, compare concentrations between disease groups,

correlate them with certain clinical features and see if their concentrations change according to histology, existing laboratory tests of liver evaluation and the Child-Pugh prognostic score.

The simultaneous measurement for the first time of retinol and retinoic acids serum levels in patients with chronic liver diseases and healthy controls, and comparisons between patients of different diseases has led to useful conclusions. In all patients, concentrations of retinoic acids were significantly lower compared to controls, even in patients and diseases (PBC and NAFLD) whose retinol concentrations were significantly higher, compared to controls. This finding suggests that retinoic acids' levels are not related to retinol's levels. It has also been observed that cirrhotic patients had lower retinol and 13-cis RA levels compared to non-cirrhotic, while patients with bigger Child-Pugh score had lower serum retinol levels. Differences in concentrations correlated to histological activity and fibrosis are relatively small. There is positive correlation between retinoids' levels and hepatic biosynthetic ability. Albumin and cholesterol levels correlate positively and bilirubin, AST and INR values correlate negatively with retinol concentrations. 13-cisRA's levels correlate positively with cholesterol levels and negatively with bilirubin levels, while ATRA levels correlate negatively with alkaline phosphatase levels. Finally, a statistically significant difference has been observed in retinol levels between inactive HBV carriers and chronically infected patients, without significant differences in acids' concentrations.

Indirect actions of retinoids are related to nuclear receptors, and it's difficult to

demonstrate in vivo, that serum levels of retinoids are correlated to them. This is furtherly proven by the fact that 9-cisRA, the isomer with the most profound effect on nuclear receptors, wasn't detected in sera in our study, in patients or in controls, even though our method was capable of measuring it. Retinoid loss and transformation of HSCs in myofibroblasts are key points in the procedures leading to cirrhosis. Since retinoids are potentially harmful but also necessary to cells, a system is needed to ensure that adequate but not toxic quantities reach target cells. At least in health, when levels of retinoic acids rise, cytochromes are activated to achieve back normal levels. It has been proved that RA is capable of self-regulating its levels by controlling the induction of CYP and LRAT even in states of limited retinol uptake from food. During HSCs' activation, rapid reduction of LRAT transcription is observed. Interleucin-1 acts as an injury signal, since after hepatocellular damage, its levels rise, while LRAT transcription is diminished. In an environment dominated by oxidative stress, with a reduced capability for esterification, retinol's oxidation to RA seems inevitable. Increased levels of endocellular RA enhance CYP's activity, in order to achieve back normal levels. However, patients in our study had reduced RA levels compared to controls. It could be presumed, that since during fibrosis retinol is reduced, ATRA and 13 cis-RA follow this reduction. However, in our study, the levels of acids are low, even in patient groups like NAFLD and PBC/PSC, where retinol levels are elevated. This finding proves that hypercatabolisation of RA and hyperactivity of CYP 450 are responsible for the observed low serum levels of ATRA and 13 cis-RA. A possible explanation

for our findings is that inflammatory cytokines induce CYP's activity, and this action continues without 'recognising' normal RA levels. There is no experimental data to support this hypothesis, since a cytokine that causes dysregulation of RA catabolism hasn't been found, in analogy with interleucin-1 and retinol esterification. However, even though studies regarding retinol's metabolism in chronic liver diseases are very few, there is data concerning ethanol's action.

Alcoholic liver disease is the only chronic hepatopathy where hypercatabolisation of RA has been documented. Our study is consistent with the aforementioned literature, since alcoholic patients seem to have the lowest retinol levels compared to all the other groups, while the concentrations of ATRA and 13 cis-RA are significantly lower compared to controls. NAFLD patients had lower serum concentrations of acids compared to controls, even though they had higher retinol concentrations compared to all the other patient groups, a difference without statistical significance. It is also remarkable that retinol levels were higher in this disease group, compared to controls. However, hyperlipidaemia is an important feature of this disease, and the positive correlation between retinol and cholesterol that has been observed in our study could explain this finding. In general, patients belonging to this group had minimal findings of hepatic dysfunction and the highest concentrations of ATRA and 13 cis-RA, in comparison to all the other patient groups. Hepatitis C virus utilizes '-retinoids' storing- lipid droplets to achieve multiplication and circulates in the blood in lipoprotein complexes. The influence

of retinoids in oxidative stress and cytokine production seems to be altered in hepatitis C, a disease so commonly associated with steatosis; some papers suggest that it is provoked by the virus. In our study, the frequently seen coexistence of HCV infection, steatosis and hyperlipidaemia could explain the statistically insignificant difference in retinol levels. On the other hand, ATRA's and 13 cis-RA's low concentrations could be attributed to RA's hypercatabolisation.

Retinoids also influence the pathological mechanisms of chronic HBV infection, with actions related to nuclear receptors and viral replication, HBV's oncogenic properties and the host's immune response. The HBV group of patients included inactive carriers and patients with chronic infection. Retinol concentrations were significantly lower in patients with chronic infection, compared to inactive carriers, while no significant differences have been observed in acids' concentrations, in both groups though, ATRA and 13 cis-RA levels were lower compared to controls.

Maintenance of Treg/Th-17 balance is disrupted in autoimmune liver diseases, a state where retinoids seem to be involved. Retinoic acid is a key regulator of TGF-beta-dependent immune responses, capable of inhibiting the IL-6-driven induction of proinflammatory Th17 cells and promoting anti-inflammatory Treg cell differentiation. This implies that retinoid loss can aggravate autoimmune reactions in some patients. The addition of ATRA to autoimmune experimental models, improves the clinical outcome of the disease. Therefore, the fact that ATRA and 13 cis-RA are present in low concentrations, in these patients, should

not surprise us.

Treg/Th-17 imbalance is connected to the pathophysiology of PBC. Cells, like dendritic cells and liver sinusoidal endothelial cells that express isoenzymes of retinal dehydrogenase are capable of producing RA by oxidizing retinol. This event affects the tropism of lymphocytes and is related to the disease mechanisms of PSC and IBD. Retinol levels, in our study, are statistically significantly elevated in PBC/PSC patients. At first sight, this finding contradicts the existing knowledge. However, all our cholestatic patients were not treatment-naïve and, unlike those in the previous studies, received UDCA at the time of measurement. It has been observed that the use of UDCA in Cystic Fibrosis, ameliorates retinol metabolism and this could explain our finding that patients on UDCA have higher retinol levels than healthy controls and patients who are not on UDCA.

Studies in HSC cultures showed that in health, RA abundance keeps the STAT axis intact, provides a favorable outcome in Th immune response and enables NK cells to kill (early) activated HSCs before they stop expressing the RAE-1 inducible gene. Therefore, retinol metabolism during HSC activation can promote NK cell activation through induction of RAE1, but can also down-regulate NK cell activity through induction of TGF- β that inhibits NK cell activity, or induction of SOCS1 that inhibits IFN- γ signaling. In our study, RA serum levels were found low in cirrhotic patients. If RA's endocellular levels follow serum levels, this could prevent NK cells from activating. Based on our findings, we propose the following mechanism regarding retinoid

loss and fibrosis. Hepatocellular damage causes HSC activation, leading to retinyl esters hydrolysis, retinol oxidation to RA, increased amounts of endocellular RA and CYP26 action enhancement. This causes RA hypercatabolisation, and reduced RA levels, resulting in impairment of Th polarization, Treg/Th-17 imbalance, STAT suppression and alterations in immune response against viruses. Moreover, NK cells are unable to kill early activated HSCs and lead them to apoptosis, more HSCs become fully activated and fibrosis proceeds.

The extent to which the increase in retinoic acids' oxidation contributes to pathways leading to fibrosis and cirrhosis is unclear. It is even uncertain if retinoic acids' concentrations are firstly reduced and then fibrotic procedures occur or vice versa. However, studies in cell cultures show that RA inhibits the development of Th17 immune response and sensitizes NK cells in killing early activated HSC cells, a procedure that, hypothetically, could stop fibrosis at birth. Moreover, if viruses utilize retinoid dependent immunological reactions to survive and multiply, alteration of the retinoid status could influence immune response and the outcome of a viral infection. If data from these experiments have in vivo applications and retinoic acids have anti-fibrotic properties, it would be useful to try to regulate retinoic acids' catabolism in an attempt to stop progression to fibrosis.

ATRA has been used in hematologic and other malignancies, but its catabolisation limits its efficacy. The Retinoic Acids Metabolism Blocking Agents (RAMBAs) have been the subject of investigation in an effort to preserve optimal

ATRA concentrations without severe hepatotoxicity. It appears that these agents could also be tried in patients susceptible to fibrosis.