



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΜΗΜΑ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής Αναστάσιος Ε. ΓΕΡΜΕΝΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

"ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ Τ-ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ
ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ"

ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ Π. ΑΡΓΕΝΤΟΥ

Μοριακή Βιολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διδακτορικού Διπλώματος
Λάρισα, 2014

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

© 2014 Νικολέττα Αργέντου

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).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (1^η/29-01-2014 ΓΣΕΣ):

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Δρ. Ματθαίος Σπελέτας

*Αναπληρωτής Καθηγητής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

2^{ος} Εξεταστής

Δρ. Αναστάσιος Ε. Γερμενής

*Καθηγητής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας*

3^{ος} Εξεταστής

Δρ. Γεώργιος Κουκούλης

*Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

4^{ος} Εξεταστής

Δρ. Θεόφιλος Καραχάλιος

*Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας*

5^{ος} Εξεταστής

Δρ. Ανδρέας Καφωριτάκης

*Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας - Γαστρεντερολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

6^{ος} Εξεταστής

Δρ. Πασχάλης – Αδάμ Μολυβδάς

*Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας*

7^{ος} Εξεταστής

Δρ. Γεώργιος Νταλέκος

Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

*"Δεν μπορείς να ανακαλύψεις νέους ωκεανούς
αν δεν έχεις το κουράγιο να χάσεις την ακτή από τα μάτια σου"*

Πλάτωνας

*Στους γονείς μου,
για την απεριόριστη στοργή και αφοσίωσή τους*

Στον αγαπημένο μου

**"ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ Τ-ΚΥΤΤΑΡΑ
ΚΑΙ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ"**

ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ ΑΡΓΕΝΤΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Ματθαίος Σπελέτας, Αναπληρωτής Καθηγητής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- (Επιβλέπων)**
2. **Δρ. Αναστάσιος Ε. Γερμενής, Καθηγητής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**
3. **Δρ. Γεώργιος Κουκούλης, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	9
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	12
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
1. ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ Τ-ΚΥΤΤΑΡΑ	16
1.1 Προερχόμενα από το θύμο ρυθμιστικά Τ-κύτταρα.....	17
1.2 Περιφερικά επαγόμενα ρυθμιστικά Τ-κύτταρα	26
1.3 Πλαστικότητα των ρυθμιστικών Τ-κυττάρων	27
1.4 Ο ρόλος των ρυθμιστικών Τ-κυττάρων στη νοσολογία	28
2. ΑΠΟΠΤΩΣΗ	31
2.1 Ορισμός- Σημασία της απόπτωσης.....	31
2.2 Μοριακοί μηχανισμοί της απόπτωσης	31
2.3 Ο ρόλος της απόπτωσης στη νοσολογία	35
3. ΦΛΕΓΜΟΝΗ	38
3.1 Φλεγμονή και ιστική βλάβη	38
3.2 Φλεγμονή και ανοσορρύθμιση	40
3.3 Χρόνια φλεγμονή και ίνωση	41
3.4 Τα ηπατικά νοσήματα ως μοντέλο μελέτης της χρόνιας φλεγμονής	42
3.5 Η οστεοαρθρίτιδα ως μοντέλο μελέτης της χρόνιας φλεγμονής.....	49
4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	53
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	54
1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ	55
1.1 Ασθενείς με Χρόνια Ηπατικά Νοσήματα	55
1.2 Ασθενείς με Οστεοαρθρίτιδα.....	58
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ	59
2.1 Εκχύλιση RNA	59
2.2 Σύνθεση cDNA.....	60
2.3 Ανίχνευση μεταγράφων των υπό διερεύνηση γονιδίων με τη μεθοδολογία της PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR).....	63
2.4 Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	75
2.5 Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις.....	81
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	84
3.1 Η έκφραση του <i>FOXP3</i> στις ηπατοπάθειες.....	84

3.2 Γονιδιακή έκφραση στη Χρόνια Ηπατίτιδα Β σε μακροχρόνια ύφεση.....	92
3.3 Η ανοσορρύθμιση στον αρθρικό υμένα ασθενών με οστεοαρθρίτιδα ...	100
3.4 Μελέτη της TGFβ/SMAD - επαγόμενης ίνωσης.....	102
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	113
4.1 Συσχέτιση της ανοσορρύθμισης με τη φλεγμονή.....	113
4.2 Ανοσορρύθμιση και απάντηση σε θεραπεία	117
4.4 Ανοσορρύθμιση στον αρθρικό υμένα ασθενών με οστεοαρθρίτιδα	121
4.3 Ο προστατευτικός ρόλος του SMAD7 στην ηπατική ίνωση	123
4.5 Συμπεράσματα.....	126
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	128
ABSTRACT	130
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	132
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	151

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Νικολέττα Αργέντου του Παναγιώτη
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 19 Φεβρουαρίου 1985
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Αθήνα
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: Άγαμη
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: Εθν. Αντίστασης 62 – 41335 Λάρισα
Τηλ.: 6972-053875
E-mail: niki_argent@hotmail.com
ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ: Αγγλικά (άριστα), Ιταλικά (καλά)

ΣΠΟΥΔΕΣ – ΤΙΤΛΟΙ

2002-2007 Πτυχίο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Σχολή Θετικών Επιστημών - Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης (Λίαν καλώς)
Πτυχιακή Εργασία: Έκφραση των μεθυλοτρανσφερασών του DNA από τα λεμφοκύτταρα στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
1999-2002 Απολυτήριο 1ου Ενιαίου Λυκείου Άργους (Άριστα)

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

Η διδακτορική διατριβή με τίτλο «Ρυθμιστικά Τ-κύτταρα και επαγόμενη από απόπτωση φλεγμονή» έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **Argentou N**, Germanidis G, Apostolou A, Hytiroglou P, Vassiliadis T, Patsiaoura K, Sideras P, Germenis AE, Speletas M. Overexpression of SMAD7 protects liver from TGFB/SMAD-mediated fibrogenesis. *Mediators of Inflammation* [ready to submitted].
2. **Argentou N**, Germanidis G, Karachalios T, _____, Germenis AE, Speletas M. Immunoregulation in the synovium of osteoarthritic joints. _____ [ready to submitted].

3. **Argentou N**, Vassilopoulos G, Ioannou M, Germenis AE, Speletas M. Rapid detection of MYD88-L265P mutation by PCR-RFLP in B-cell lymphoproliferative disorders. *Leukemia*. 2013; 28:447-449.
4. Germanidis G, **Argentou N**, Hytioglou P, Vassiliadis T, Patsiaoura K, Germenis AE, Speletas M. Liver FOXP3 and PD1/PDL1 Expression is Down-Regulated in Chronic HBV Hepatitis on Maintained Remission Related to the Degree of Inflammation. *Front Immunol*. 2013;4:207.
5. Speletas M, **Argentou N**, Germanidis G, Vasiliadis T, Mantzoukis K, Patsiaoura K, Nikolaidis P, Karanikas V, Ritis K, Germenis AE. Foxp3 expression in liver correlates with the degree but not the cause of inflammation. *Mediators Inflamm*. 2011;2011:827565.
6. Speletas M, **Argentou N**, Karanikas V, Gramoustianou ES, Mandala E, Braimi M, Matsouka P, Ritis K, Germenis AE. Survivin isoform expression patterns in CML patients correlate with resistance to imatinib and progression, but do not trigger cytolytic responses. *Clin Immunol*. 2011 May;139:155-163.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ

1. **Argentou N**, Germanidis G, Apostolou E, Vasiliadis T, Sideras P, Germenis AE, Speletas M. Overexpression of SMAD7 protects liver from TGFb/Smad-mediated fibrogenesis. *Immunology*. 2012;137(Suppl.1):506.
2. Γερμανίδης Γ, **Αργέντου Ν**, Βασιλειάδης Θ, Πατσιαούρα Κ, Μαντζούκης Κ, Αναστασιάδης Σ, Χυτιρογλου Π, Γερμενής Α, Σπελέτας Μ. Η ηπατική έκφραση FOXP3 και PD1/PDL1 ελαττώνεται στη χρόνια ηπατίτιδα Β σε διατηρούμενη ύφεση, σχετιζόμενη με το βαθμό της φλεγμονής. *Ann Gastroenterol*. 2012;25(Suppl.1):31.
3. Sotiriadou F, Fotoulaki M, **Argentou N**, Nousia-Arvanitakis S, Chitiroglou P, Tsitouridis I, Speletas M. The role of TGF-b and Smad proteins in steatosis of liver disease in cystic fibrosis. *J Cystic Fibros*. 2012;11(Suppl.1):S113.
4. Sotiriadou F, Fotoulaki M, **Argentou N**, Nousia-Arvanitakis S, Chitiroglou P, Tsitouridis I, Speletas M. TGF-b and SMAD proteins participate in the fibrotic process of liver disease in cystic fibrosis. *J Cystic Fibros*. 2011;10(Suppl.1):S69.
5. **Argentou N**, Germanidis G, Vassiliadis T, Patsiaoura K, Mantzoukis K, Ritis K, Eleftheriadis D, Evgenidis N, Nikolaidis P, Germenis AE, Speletas M. Liver PD-1/PDL-1/PD-L2 mRNA expression quantitative analysis in patients with chronic HBV and HCV hepatitis. *J Hepatol*. 2010;52(Suppl.1):S241.
6. **Argentou N**, Germanidis G, Vassiliadis T, Mantzoukis K, Patsiaoura K, Metallidis S, Stylianidis S, Theocharidou A, Nikolaidis P, Germenis AE, Speletas M. Foxp3 expression in liver correlates with the degree but not the cause of inflammation. *The Liver Meeting AASLD, 2010, Boston, Massachusetts*

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1. **Αργέντου Ν.** Ανοσορρύθμιση και φλεγμονή. 5ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδας, Λάρισα 2013
2. Γερμανίδης Γ, **Αργέντου Ν**, Αποστόλου Ε, Βασιλειάδης Θ, Παναγιωτίδης Β, Σιδεράς Π, Γερμενής ΑΕ, Σπελέτας Μ. Η υπερέκφραση του SMAD7 προστατεύει το ήπαρ από την TGF- β /SMAD-μεσολαβούμενη ινογένεση. *32^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας*, Αθήνα 2012.
3. Γερμανίδης Γ, **Αργέντου Ν**, Βασιλειάδης Θ, Πατσιαούρα Κ, Μαντζούκης Κ, Θεοχαρίδου Ε, Νικολαΐδης Π, Καρανίκας Β, Γερμενής Α, Σπελέτας Μ. Η έκφραση του FOXP3 στο ήπαρ σχετίζεται με το βαθμό αλλά όχι με το αίτιο της φλεγμονής. *12^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο*, Χανιά 2011
4. Γερμανίδης Γ, **Αργέντου Ν**, Βασιλειάδης Θ, Πατσιαούρα Κ, Μαντζούκης Κ, Θεοχαρίδου Ε, Νικολαΐδης Π, Γερμενής Α, Σπελέτας Μ. Τα ηπατικά επίπεδα του FOXP3 mRNA στη χρόνια ηπατίτιδα Β εξαρτώνται από την έκφραση των οδών FAS/FASL και PD-1/PD-L1. *31ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας*, Θεσσαλονίκη 2011.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι τα ρυθμιστικά T-κύτταρα (regulatory T-cells, Tregs) κατέχουν κεντρικό ρόλο στο δίκτυο των μηχανισμών κεντρικής και περιφερικής ανοχής συμμετέχοντας στη διατήρηση της ομοιοστασίας του οργανισμού. Διακρίνονται σε θυμικής προέλευσης Tregs (tTregs), που χαρακτηρίζονται από τη συστατική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FOXP3 και ασκούν τη δράση τους μέσω κυτταρικής επαφής, και σε επαγόμενα στην περιφέρεια Tregs (iTregs) που δρουν μέσω της απελευθέρωσης κυτταροκινών, όπως η IL-10 (Tr1) και ο TGF-β1 (Th3). Έχει προταθεί πως η ενεργοποίηση και η συσσώρευσή τους ευθύνεται για ανεπαρκείς ανοσιακές απαντήσεις, όπως η αδυναμία εξάλειψης των παθογόνων, και τη συνακόλουθη χρονιότητα της φλεγμονής (λόγω εμμένουσας λοίμωξης). Ωστόσο, συρρέοντα στοιχεία υποστηρίζουν ότι τα Tregs, εκτός από την προστασία των «ιδίων» στοιχείων του οργανισμού από την αυτοάνοση βλάβη, διαδραματίζουν ανάλογο προστατευτικό ρόλο έναντι της βλάβης του οργανισμού που προκαλεί η ανεξέλεγκτη φλεγμονή. Σε αυτήν την άποψη συνηγορούν πρόσφατες μελέτες σε ζωικά μοντέλα που περιγράφουν πως η απουσία αυτών των ρυθμιστικών κυτταρικών πληθυσμών μπορεί να αποτελέσει την αιτία ανεξέλεγκτων ανοσιακών απαντήσεων και γενικευμένης καταστροφικής αυτοάνοσης φλεγμονώδους αντίδρασης των ιστών. Τόσο επιδημιολογικά όσο και πειραματικά ευρήματα των τελευταίων ετών αποδίδουν στη φλεγμονώδη βλάβη εμπλοκή σε παθογενετικές διεργασίες ιδιαίτερης σημασίας, με κυριότερη την αναδυόμενη σχέση μεταξύ φλεγμονής και καρκίνου.

Σε αυτό το πλαίσιο, μεγάλο μέρος της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας έχει εστιάσει το ενδιαφέρον του στην αποκάλυψη θεραπευτικών προσεγγίσεων με στόχο τα ρυθμιστικά κύτταρα (π.χ. μοριακή στόχευση του γονιδίου *FOXP3*). Συνεπώς, υπάρχει ανάγκη πληρέστερης κατανόησης της σχέσης των χρόνιων λοιμώξεων με την πρόκληση φλεγμονής διαφόρων οργάνων, καθώς και με τους ανοσορρυθμιστικούς μηχανισμούς. Αυτός ήταν και ο στόχος της παρούσας μελέτης, η διερεύνηση του ρόλου της ανοσορρύθμισης στην επαγόμενη από την απόπτωση φλεγμονή και, ειδικότερα, η συσχέτιση (σε πρωτεϊνικό και μοριακό επίπεδο) των οδών της απόπτωσης και της φλεγμονής με τις ανοσορρυθμιστικές οδούς που εμπλέκονται στη λειτουργία των Tregs. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι εξαιρετικής σημασίας για την αποσαφήνιση του ρόλου των ρυθμιστικών κυττάρων σε χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, καθώς και για την περαιτέρω κατανόηση της παθοφυσιολογίας της φλεγμονής και της ίνωσης, ενώ συμβάλλουν στη διαλεύκανση των συνεπειών της θεραπευτικής στόχευσης των Tregs.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και έχει χρηματοδοτηθεί από το Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου. Το υλικό μελέτης των χρόνιων ηπατοπαθειών αποτέλεσαν ασθενείς της Α΄ Παθολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Α.Χ.Ε.Π.Α. του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ), καθώς και της Παθολογικής Κλινικής και της Γαστρεντερολογικής και Ηπατολογικής Μονάδας, του Ιπποκράτειου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης. Τα άτομα που αποτέλεσαν το υλικό μελέτης της χρόνιας οστεοαρθρίτιδας προήλθαν από την Ορθοπαιδική Κλινική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (ΠΘ).

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής: τον κ. Ματθαίο Σπελέτα, Αναπληρωτή Καθηγητή Ανοσολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΠΘ, τον κ. Αναστάσιο Ε. Γερμενή Καθηγητή Ανοσολογίας και Διευθυντή του Τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του ΠΘ, καθώς και τον κ. Γεώργιο Κουκούλη Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του ΠΘ.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω από καρδιάς τον κ. Μ. Σπελέτα, επιβλέποντα της διατριβής μου, για το θέμα που μου εμπιστεύτηκε να εκπονήσω, καθώς και για την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας, τις χρήσιμες υποδείξεις και συμβουλές σε όλα τα στάδια της διατριβής, η οποία δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την πολύτιμη συμβολή του. Ακόμη περισσότερο τον ευχαριστώ που πίστεψε σε εμένα και με στήριξε σε κάθε μου προσπάθεια.

Ευγνωμοσύνη χρωστάω στον κ. Α. Γερμενή που με δέχτηκε στο εργαστήριο του, για την επιστημονική καθοδήγησή του και για τα μαθήματα ζωής που μου παρείχε κατά την οκταετή συνεργασία μας αυτός ο σπάνιος δάσκαλος και άνθρωπος.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Επικ. Καθηγητή Γαστρεντερολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΑΠΘ κ. Γ. Γερμανίδη για την αμέριστη συμπαράστασή του και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά την εκπόνηση της μελέτης. Η συμβολή του, τόσο σε συμβουλευτικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο, υπήρξε καθοριστική για την ολοκλήρωση της διατριβής.

Ευχαριστώ, επίσης, το Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του Ινστιτούτου Ιατροβιολογικών Επιστημών Ακαδημίας Αθηνών κ. Π. Σιδερά για τη δυνατότητα που μου έδωσε να διεξάγω τη μελέτη της έκφρασης των ακτιβινών στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Μεταμοσχεύσεων και για την καθοδήγησή του. Θα ήθελα επίσης να

ευχαριστήσω τη Δρ. Ε. Αποστόλου καθώς και το υπόλοιπο προσωπικό του Εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας και την εξαιρετική φιλοξενία που μου παρείχαν.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω στον κ. Κ. Ρίτη, Καθηγητή Παθολογίας του τμήματος Ιατρικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης (ΔΠΘ), για την ουσιαστική συμβολή του στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά *Western*, που μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω στο Εργαστήριο Μοριακής Αιματολογίας του ΔΠΘ. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην υποψήφια διδάκτορα κα. Α. Χρυσανθοπούλου και στον Δρ. Κ. Καμπά για την αρμονική συνεργασία μας και την πολύτιμη βοήθειά τους.

Ευχαριστώ τον κ. Π. Χυτίρογλου, Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής του ΑΠΘ, τόσο για τη συμβολή του στην αξιολόγηση και κατάταξη των βιοψιών της μελέτης όσο και για την πραγματοποίηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων των υπό διερεύνηση μορίων της μελέτης.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή Ορθοπαιδικής κ. Θ. Καραχάλιο για τη συλλογή του υλικού των αρθροπαθειών καθώς και για την ιδιαίτερη συνεργασία του στη διεξαγωγή της μελέτης.

Στην προσπάθεια αυτή, εκτός από τους καθηγητές μου, βρήκα συνοδοιπόρους και συμπαραστάτες νυν και παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας. Ευχαριστώ θερμά την κα. Ε. Κλέτσου, κα. Μ. Ζαμανάκου, κα. Φ. Σούκου, κα. Λ. Καραμούτη, κα. Α. Μπάρδα, κα. Γ. Καραϊσκού, τον κ. Γ. Λουλέ, κ. Γ. Ιορδανάκη και κ. Σ. Τσόχα, με τους οποίους πέρασα αμέτρητες ώρες στο εργαστήριο και μοιραστήκαμε στιγμές χαράς, λύπης, επιτυχίας και απογοήτευσης. Ξεχωριστή θέση στην καρδιά μου κατέχουν οι συνάδελφοί μου, κα. Κ. Λιαδάκη, κ. Γ. Χατσιδής, κα. Φ. Μπαρδάκα, και κ. Κ. Μπούκας, καθώς και η κα. Α. Μαμάρα με την οποία οποία «ταξιδέψαμε» παράλληλα τα τελευταία έξι χρόνια της ζωής μας. Τους ευχαριστώ όχι μόνο για τη συμπαράσταση σε κάθε στιγμή, επαγγελματική και προσωπική, που τους είχα ανάγκη, αλλά και για τη δυνατή φιλία που θα μας δένει στο μέλλον. Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω από καρδιάς τους δικούς μου ανθρώπους, το Δημήτρη, τη Χαρούλα, τη Γεωργία και τη Θάνια που με στήριξαν, με ενθάρρυναν αλλά και με «ανέχτηκαν» με ανεξάντλητη υπομονή όλα αυτά τα χρόνια.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ και το μεγαλύτερο μέρος της ευγνωμοσύνης μου το χρωστάω στους λατρεμένους μου γονείς Παναγιώτη και Μαρία, καθώς και στον αδελφό μου Δημήτρη, στους οποίους και αφιερώνω τη διατριβή αυτή, ως ελάχιστο δείγμα ευγνωμοσύνης. Τους οφείλω, λιτά κι απέρριπτα, τα πάντα...

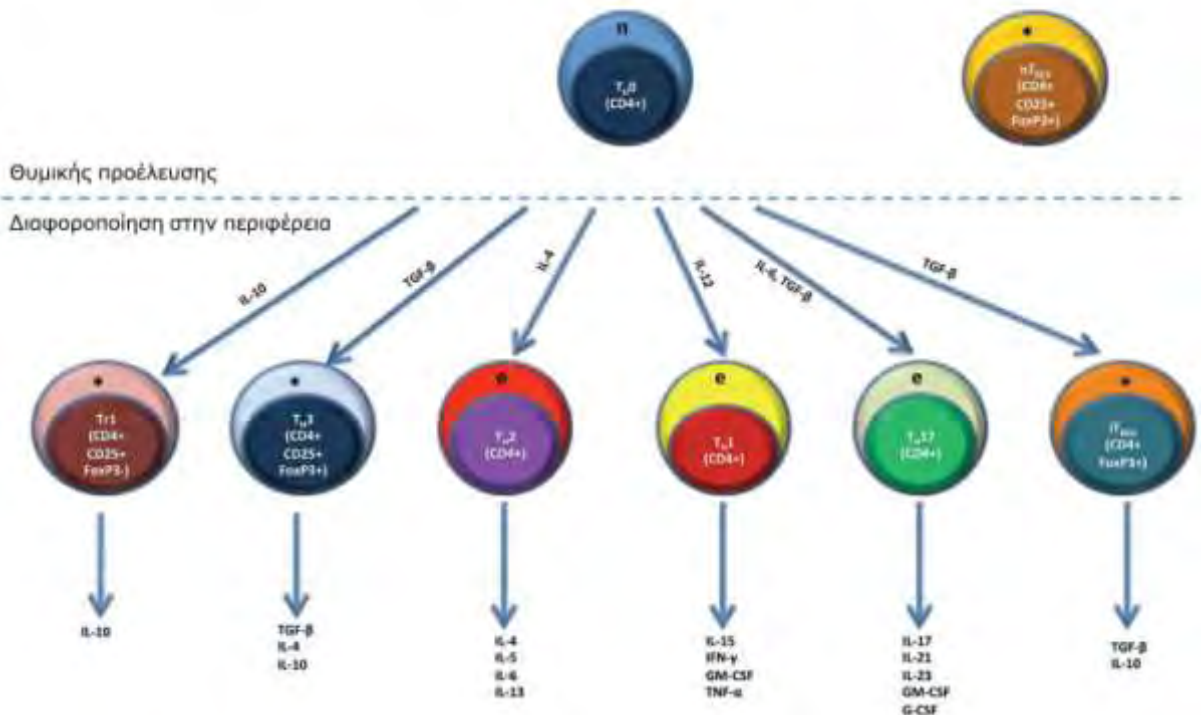
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ T-ΚΥΤΤΑΡΑ

Το ανοσιακό σύστημα βρίσκεται σε μια λεπτή ισορροπία μεταξύ της δημιουργίας ανοσιακών απαντήσεων έναντι παθογόνων και της ανοχής σε «ίδια» στοιχεία, με σκοπό να διατηρήσει την ομοιοστασία του. Διαταραχή αυτής της ισορροπίας όπως π.χ., η έλλειψη ανοσιακής απάντησης (ανοσοανεπάρκεια), ή η απάντηση έναντι «ιδίων» στοιχείων (αποτέλεσμα της ενεργοποίησης αυτοδραστικών T-κυττάρων ή παράπλευρη βλάβη των υγιών κυττάρων από τους ανοσιακούς μηχανισμούς, που κινητοποιούνται για τον περιορισμό ενός εξωγενούς παθογόνου ή κάποιου όγκου) οδηγούν σε παθολογικές καταστάσεις και συχνά έκδηλη ασθένεια. Η επιβολή και η ρύθμιση της αυτο-ανοχής εντός του ρεπερτορίου των T-κυττάρων ασκείται σε δύο επίπεδα: α) την **κεντρική ανοχή**, που συμβαίνει κατά την οντογένεση των T-κυττάρων στο θύμο (κλώνιοι που αναγνωρίζουν «ίδια» αντιγόνα, καταστρέφονται)^{1,2} και β) την **περιφερική ανοχή**. Στους μηχανισμούς της περιφερικής ανοχής περιλαμβάνεται αφενός μια σειρά διαδικασιών αρνητικής ανατροφοδότησης, που αποτελούν ενδογενές χαρακτηριστικό της ενεργοποίησης από το αντιγόνο και της διαφοροποίησης των T-κυττάρων (π.χ., απόπτωση επαγόμενη από την ενεργοποίηση, επαγωγή ανεργίας, διαφοροποίηση των υποπληθυσμών των βοηθητικών κυττάρων),^{3,4} και αφετέρου η λειτουργία των ρυθμιστικών T-κυττάρων (regulatory T-cells, Tregs).^{5,6}

Οι πρώτες αναφορές T-κυτταρικών πληθυσμών με την ικανότητα να καταστέλλουν ανοσιακές απαντήσεις σημειώθηκαν στις αρχές του 1970, ωστόσο το ενδιαφέρον γι' αυτά τα *κατασταλτικά T-κύτταρα* ατόνησε λόγω της αδυναμίας να διευκρινιστούν οι μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί της κατασταλτικής δράσης τους.^{7,8} Το ενδιαφέρον άρχισε να αναζωπυρώνεται το 1995 μετά από μελέτες των Sakaguchi και συν., που έδειξαν ότι η θυμεκτομή νεογνών ποντικών οδηγεί στην εμφάνιση οργανοειδικών αυτοάνοσων διαταραχών, οι οποίες προλαμβάνονται με τη χορήγηση CD4⁺CD25⁺ κυττάρων από μη ακτινοβολημένα πειραματόζωα.⁹ Οι ίδιοι ερευνητές χαρακτήρισαν αυτά τα CD4⁺ κύτταρα με κατασταλτική δράση ως *ρυθμιστικά T-κύτταρα* δίνοντας ισχυρή ώθηση στο σχετικό πεδίο έρευνας, ενώ παράλληλα πρόσθεσαν μια νέα διάσταση στο πολύπλοκο πρόβλημα της περιφερικής ανοχής. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί λεπτομερώς δύο πληθυσμοί Tregs: α) τα **θυμικής προέλευσης** Tregs (thymus-derived Treg cells, tTregs), τα οποία μέχρι πρότινος ονομάζονταν *φυσικά* Tregs (natural, constitutive, professional, nTregs) και β) τα **περιφερικά επαγόμενα** Tregs (peripherally-derived Treg cells, pTregs), τα οποία προηγούμενα ονομάζονταν *επαγώγιμα* Tregs (inducible/adaptive, iTregs) (**Εικ.1**). Οι δύο αυτοί πληθυσμοί έχουν διαφορετική προέλευση, αντιγονική ειδικότητα και μηχανισμούς δράσης αλλά, πιθανότατα, συμπληρωματική ή και αλληλεπικαλυπτόμενη δράση, αναφορικά με τον έλεγχο των ανοσιακών απαντήσεων.^{10,11}

* Ρυθμιστικά T-κύτταρα, n= παρθένα T-κύτταρα, e= δραστικά T-κύτταρα



Εικ.1 Πληθυσμοί T-κυττάρων. Τα Tregs είτε σχηματίζονται κατά τη διαφοροποίηση στο θύμο (thymus- derived Treg cells, tTregs) είτε επάγονται στην περιφέρεια (peripherally- derived Treg cells, pTregs) από παρθένα T-κύτταρα (Th0). Στις υπο-ομάδες των pTregs περιλαμβάνονται τα Th3 και Tr1 κύτταρα, τα οποία είναι $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ και $CD4^+CD25^-FOXP3^+$, αντίστοιχα. Οι κύριες υπο-ομάδες $CD4^+$ δραστικών κυττάρων (effector T-cells, Teffs) είναι τα Th1, Th2, και Th17 κύτταρα. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι κυτταροκίνες που παίζουν κομβικό ρόλο στην επαγωγή αυτών των κυττάρων από Th0 κύτταρα, καθώς και οι κυτταροκίνες που εκκρίνουν. [Τροποποίηση από: Peterson RA. Toxicol Pathol. 2012; 40: 186-204]

1.1 Προερχόμενα από το θύμο ρυθμιστικά T-κύτταρα

1.1.1 Παραγωγή - Ενεργοποίηση

Η επιλογή των tTregs στο θυμικό φλοιό μεσολαβείται από τη σύνδεση των υποδοχέων τους με «ίδια» πεπτίδια (που παρουσιάζονται από MHC μόρια τάξης II) με αρκετά υψηλή συγγένεια σύνδεσης, ωστόσο, μικρότερη από αυτή που θα μπορούσε να προκαλέσει την αρνητική επιλογή τους.¹² Τα tTregs διασφαλίζουν τη διαφυγή από την αρνητική επιλογή κατά την εκπαίδευση και την πορεία τους διά του μυελού του θύμου, όπου έρχονται σε επαφή με τα αντίστοιχα «ίδια» αντιγόνα μέσω αντιαποπτωτικών μηχανισμών, όπως η έκφραση του επαγόμενου από γλυκοκορτικοειδή υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκου (GITR).¹³ Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι η επιλογή των tTregs λαμβάνει χώρα στο μυελό του θύμου, όπου τα κύτταρα έρχονται σε επαφή με «ίδια» ιστικά αντιγόνα που εκφράζονται επιλεκτικά σε νησίδια μυελικών επιθηλιακών

κυττάρων.¹⁴ Για την παραγωγή των tTregs στο θύμο απαραίτητη είναι η παρουσία ιντερλευκίνης 2 (interleukin 2, IL-2) αλλά και CD28-μεσολαβούμενης συνδιέγερσης (**Εικ.1**).^{15,16}

Τα tTregs εκφράζουν ένα ευρύ ρεπερτόριο του α/β TCR με ειδικότητες τόσο για «ίδια» όσο και για μη-«ίδια» αντιγόνα. Παρά το γεγονός ότι παρουσιάζουν ομοιότητες με τα δραστικά T-κύτταρα (effector T-cells, Teffs) ως προς την ποικιλομορφία του TCR, το ρεπερτόριό τους είναι διαφορετικό. Ωστόσο, παρά την ποικιλία και την ιδιαιτερότητα που διαθέτει το TCR-ρεπερτόριο των tTregs, επικαλύπτεται σε κάποιο βαθμό με το TCR-ρεπερτόριο των συμβατικών T-κυττάρων (conventional T-cells, Tconv), (**Εικ.2**).¹⁷

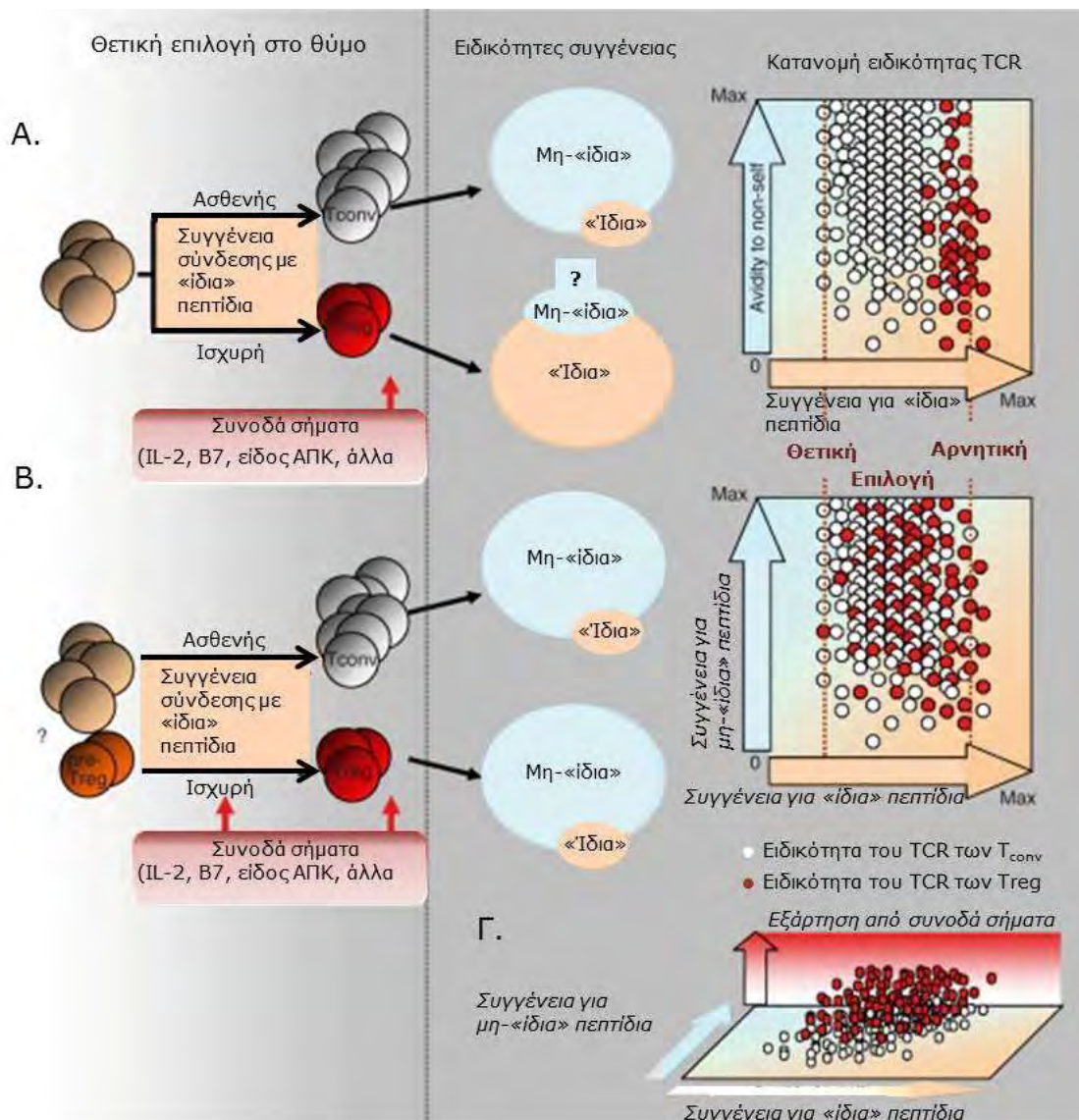
Τα tTregs εμφανίζουν *in vitro* μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού μετά από TCR-μεσολαβούμενη ενεργοποίηση,^{18,19,20} που μπορεί να ξεπεραστεί με την προσθήκη υψηλών δόσεων IL-2^{20,21} ή με ένα ισχυρό συνδιεγερτικό σήμα.^{20,21} Σε αντίθεση με τα Teffs, τα tTregs εκκρίνουν ελάχιστες ποσότητες της IL-2, καθώς και κυτταροκίνες χαρακτηριστικές για το υποσύνολο των βοηθητικών T-κυττάρων (T-helper cells, Th), όπως η ιντερφερόνη γ (interferon-γ, IFN-γ), η IL-4, η IL-5, η IL-13 και η IL-17. Σε συγκαλλιέργειες με CD4⁺CD25⁻ Teffs, τα tTregs καταστέλλουν αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό των πρώτων⁹ και την παραγωγή κυτταροκινών.²² Αυτή η ρυθμιστική λειτουργία είναι μια διαδικασία εξαρτώμενη από την ενεργοποίηση που απαιτεί διακυτταρική επαφή, όπως καταδεικνύεται από πειράματα όπου ο διαχωρισμός των tTregs από τα Teffs με τη χρήση ημιπερατής μεμβράνης ή και με τη μεταφορά υπερκείμενων προερχόμενων από τα tTregs δεν οδηγεί σε καταστολή των Teffs.¹⁸

1.1.2 Φαινοτυπικός καθορισμός των ρυθμιστικών T-κυττάρων

Η α-αλυσίδα του υποδοχέα της IL-2 (CD25) ήταν ο πρώτος δείκτης επιφανείας στα CD4⁺ T-κύτταρα που προτάθηκε ως δείκτης των tTregs.⁹ Το CD25 παρουσιάζει σταθερή έκφραση στα tTregs, ωστόσο, δεν είναι ειδικός δείκτης αφού αποτελεί χαρακτηριστικό ενεργοποίησης όλων των T-κυττάρων.²³ Αξιίζει να σημειωθεί, πάντως, ότι η έκφραση του CD25 στα ενεργοποιημένα T-κύτταρα είναι παροδική και χαμηλού βαθμού (CD25^{low}), ενώ στα tTregs είναι αμετάβλητη και ισχυρή (CD25^{high}). Ως εκ τούτου, τα tTregs αποτελούν μόνο το 1-2% των CD4⁺ T-κυττάρων του ανθρώπινου περιφερικού αίματος αφού αντιπροσωπεύονται μόνο από τα CD4⁺CD25^{high} κύτταρα.^{18,23}

Τα CD4⁺CD25⁺ T-κύτταρα του περιφερικού αίματος έχουν επίσης διακριθεί ανάλογα με την έκφραση του CD45RO και μόνο τα CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ φαίνεται ότι έχουν κατασταλτικές ιδιότητες. Άλλα μόρια που εκφράζονται στη μεμβράνη των Tregs, είναι τα CD38, CD103, CD134, καθώς και τα CD45RB και CD45RC, σε χαμηλή συγκέντρωση. Επιπλέον, τα tTregs χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκφραση των HLA-DR, CD5, CD62L και CD122 (γ-αλυσίδα του υποδοχέα της IL-2). Όλα αυτά τα μόρια,

εκτός από το CD103 (ιντεγκρίνη αΕβ7), εκφράζονται και στα άλλα ενεργοποιημένα T-κύτταρα, ενώ η συμβολή τους στην εκδήλωση της λειτουργικότητας των tTregs παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστη.²⁴



Εικ.2 Δημιουργία ειδικότητας του TCR ρεπερτορίου των Tregs. **A.** Η δέσμευση των Tregs οδηγείται από αλληλεπιδράσεις μεγαλύτερης συγγένειας μεταξύ του TCR και των συμπλεγμάτων MHC/«ιδίων» πεπτιδίων. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις επάγουν το φαινότυπο των Tregs και την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα forkhead box P3 (Foxp3) και οδηγούν την ειδικότητα του TCR-ρεπερτορίου έναντι «ιδίων» αντιγόνων. Κατά συνέπεια, τα συμβατικά T-κύτταρα (conventional T-cells, T_{conv}) εκφράζουν διαφορετικά σύνολα TCRs από τα Tregs που αναγνωρίζουν μη-«ίδια» ή «ίδια» αντιγόνα, αντίστοιχα. **B.** Προς το παρόν άγνωστοι μηχανισμοί δημιουργούν πρόδρομα Tregs, πριν από την επιλογή του TCR. Στα πρόδρομα αυτά κύτταρα επιδρούν TCR-εξαρτώμενα και ανεξάρτητα σήματα. Και οι δύο κυτταρικές σειρές (T_{conv} και Tregs) εμφανίζουν ειδικότητα συγγένειας, κυρίως, προς την αναγνώριση μη-«ιδίων» αντιγόνων, ενώ υπάρχουν μικρά κλάσματα με υψηλής συγγένειας αυτο-δραστικούς TCR. **Γ.** Η λειτουργική κατάσταση των προ-Tregs επιτρέπει ένα διαχωρισμό των TCRs των T_{conv} και των Tregs σε συνδυασμό με διαφορετικά συνοδά σήματα [π.χ. IL-2/IL-2R, CD28/B7, CD40/CD40L και ο τύπος των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (ΑΠΚ)]. [Τροποποίηση από: Pacholczyk R. Immunology. 2008; 125: 450–458]

Δύο ακόμα δείκτες επιφάνειας των tTregs είναι το CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) και το GITR.^{25,26} Το CTLA-4 είναι ένα δομικό ομόλογο του συνδιεγερτικού μορίου CD28 κι έχει προταθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των tTregs.²⁷ Το GITR ανήκει στην υπεροικογένεια των υποδοχέων TNF (TNF receptor superfamily, TNFR) και φαίνεται ότι μπορεί να δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της λειτουργίας των tTregs στα ποντίκια, κάτι όμως που δεν έχει επιβεβαιωθεί ότι ισχύει στον άνθρωπο.^{28,29} Αμφότερα τα CTLA-4 και GITR εκφράζονται σταθερά στα tTregs, ωστόσο, εκφράζονται και σε ενεργοποιημένα T-κύτταρα.^{28,29} Σε μια πρόσφατη μελέτη, ένα μέλος των TNFR, το TNFRSF25 (DR3) αναγνωρίστηκε ως ένας επιπλέον δείκτης των tTregs των ποντικών.³⁰ Συγκριτικά με τα CD4⁺ Teffs, τα οποία δείχνουν μόνο βασικά επίπεδα έκφρασης, τα tTregs εξέφραζαν DR3 σε υψηλά επίπεδα.³⁰ Ωστόσο, αν το DR3 αντιπροσωπεύει ένα κατάλληλο δείκτη για τα ανθρώπινα tTregs μένει να καθοριστεί. Σε αντίθεση με τα μόρια που περιγράφονται παραπάνω, η έκφραση της α-αλυσίδας του υποδοχέα της IL-7 (CD127) βρέθηκε να συσχετίζεται αρνητικά με τα tTregs. Ωστόσο, ούτε αυτός ο φαινότυπος είναι μοναδικός για τα tTregs, αφού η ενεργοποίηση των Teffs οδηγεί σε μείωση του CD127.³¹

Συνδιεγερτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μορίου του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου-1 (programmed cell death-1, PD-1, CD279) και των συνδετών του PD-L1 (B7-H1, CD274) και PD-L2 (B7-DC, CD273) είναι ζωτικής σημασίας στη ρύθμιση της ανοσιακής ανοχής.³² Η έκφραση του PD-1 αυξάνεται σε T-κύτταρα έπειτα από TCR-μεσολαβούμενη ενεργοποίηση και η έκφρασή του είναι ιδιαίτερα υψηλή σε μη λειτουργικά, εξαντλημένα T-κύτταρα (exhausted T-cells).³³ Οι φαινοτυπικές αναλύσεις CD4⁺CD25⁺ tTregs προερχόμενων από ποντικό και άνθρωπο αναφέρουν ότι το PD-1 εκφράζεται από τα ήρεμα (resting) tTregs αλλά όχι από τα Teffs πριν τη διέγερσή τους, ενώ παρουσιάζει ραγδαία αύξηση μετά την ενεργοποίηση και στους δύο πληθυσμούς.³² Ωστόσο, η έκφραση που παρατηρούνταν σε μεταγραφικό επίπεδο δε συνοδευόταν πάντα κι από επιφανειακή έκφραση του PD-1.³⁴ Σύμφωνα με αυτές τις ιδιότητες, οι Raimondi και συν., αναφέρουν ότι μη διεγερμένα tTregs ποντικού διατηρούν το PD-1 σε ενδοκυττάρια διαμερίσματα.³⁵ Αυτή η έλλειψη επιφανειακής έκφρασης του PD-1 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση των CD4⁺CD25⁺ tTregs από τα πρόσφατα ενεργοποιημένα Teffs, τα οποία επίσης εμφανίζουν φαινότυπο CD4⁺CD25⁺.³⁵

Τα μόρια επιφάνειας LAG-3 (lymphocyte activation antigen-3) και GARP (glycoprotein A repetitions predominant), έχει αναφερθεί ότι χαρακτηρίζουν τα ενεργοποιημένα tTregs. Το LAG-3 εκφράζεται επί των ενεργοποιημένων Teffs και tTregs, με τα ενεργοποιημένα tTregs να έχουν υψηλότερη και μεγαλύτερης διάρκειας έκφραση,³⁶ ενώ το GARP (LRRC32) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αυξάνεται ταχέως έπειτα από TCR-μεσολαβούμενη διέγερση.^{37,38}

Ένας ακόμη δείκτης των tTregs που παρουσιάζει ενδιαφέρον είναι το μόριο LAP (latency-associated peptide). Μελέτες σε T-κύτταρα ποντικών και σε μοντέλα πειραματικά επαγόμενης αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) έδειξαν ότι τα CD4⁺LAP⁺ T-κύτταρα εμφανίζουν κατασταλτικές ιδιότητες που εξαρτώνται από την έκκριση του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα-β (transforming growth factor- β, TGF-β), ανεξάρτητα από την έκφραση του δείκτη CD25.³⁹ Αξίζει να αναφερθεί ότι το LAP αποτελεί δείκτη των tTregs όχι μόνο στα ποντίκια αλλά και στον άνθρωπο.⁴⁰

Επιπρόσθετα, τα μόρια galectin-1⁴¹ και galectin-10⁴² έχουν περιγραφεί ως ειδικοί δείκτες των tTregs. Συγκεκριμένα η galectin-10 εκφράζεται ειδικά από tTregs και, σε αντίθεση με άλλους δείκτες που περιγράφονται παραπάνω, δεν αυξάνεται στα ενεργοποιημένα Teffs. Ωστόσο, η έκφρασή της περιορίζεται στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα, γεγονός το οποίο την καθιστά ακατάλληλη για τη μελέτη βιώσιμων πληθυσμών tTregs.²⁶

Ειδικό λειτουργικό δείκτη των tTregs φαίνεται ότι αποτελεί ο πυρηνικός παράγοντας Foxp3 (forkhead box P3) που εντοπίζεται μόνο ενδοκυττάρια. Πρόκειται για μόριο που διαδραματίζει κομβικό ρόλο, τόσο στη δέσμευση (commitment) των tTregs στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά και στην εξελικτική διαφοροποίησή τους, όσο και στην έκφραση της κατασταλτικής λειτουργίας τους.⁴³ Δύο πρόσφατες μελέτες μικροσυστοιχιών DNA έχουν εντοπίσει τον παράγοντα μεταγραφής Helios ως δείκτη των tTregs.^{44, 45} Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, πρόσφατες εργασίες έδειξαν ότι υπάρχει υψηλή έκφραση του Helios στα CD4⁺CD25⁺ tTregs του ποντικού⁴⁶ και του ανθρώπου⁴⁷ αλλά όχι σε ενεργοποιημένα ανθρώπινα Teffs ή TGF-β-επαγόμενα FOXP3⁺ T-κύτταρα. Επομένως, η πρόσδεση του Helios στον υποκινητή του Foxp3 φαίνεται να εμπλέκεται στη διατήρηση της έκφρασής του.⁴⁷ Ωστόσο, παρόμοια με το Foxp3 μόριο, η απουσία επιφανειακής έκφρασης περιορίζει τη χρήση του ως δείκτη διαλογής των tTregs.

1.1.3 Μεταγραφικός παράγοντας FOXP3

Ο μεταγραφικός παράγοντας Foxp3 εκφράζεται σταθερά στα tTregs και ενεργεί ως κύριος ρυθμιστής της ανάπτυξης και της κατασταλτικής λειτουργίας τους.^{48, 49} Ωστόσο, από τη στιγμή που δεσμεύονται στην κυτταρική σειρά τους, δεν εξαρτώνται από την έκφραση του Foxp3 για την επιβίωσή τους.^{50, 51}

Το Foxp3 περιέχει 3 διακριτές δομικά λειτουργικές περιοχές: α) ένα C2H2 μοτίβο δακτυλίου ψευδαργύρου, β) ένα μοτίβο ομοιάζον με φερμουάρ λευκίνης και γ) μια καρβοξυτελική περιοχή φουρκέτας, ασκώντας έτσι τη λειτουργία του ως μεταγραφικός παράγοντας. Μεταξύ των γονιδίων-στόχων του, το Foxp3 δρα ως μεταγραφικός

ενεργοποιητής για τα γονίδια που εκφράζονται από τα tTregs (όπως για παράδειγμα το CD25 και το CTLA-4), ενώ καταστέλλει την μεταγραφή κυτταροκινών που είναι χαρακτηριστικές για τα Th-κύτταρα.⁵²

Αναλύσεις των tTregs ποντικών σε επίπεδο του γονιδιώματος (genome-wide analyses) επιβεβαιώνουν την άποψη ότι το Foxp3 μπορεί να ενεργεί είτε ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή ως καταστολέας περίπου 700 γονιδίων.⁵³ Εκτός από αυτή την άμεση δράση ως μεταγραφικός ρυθμιστής, το Foxp3 μπορεί επίσης να ασκήσει τη ρυθμιστική του λειτουργία μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι το Foxp3 αλληλεπιδρά με τον παράγοντα NFAT (nuclear factor of activated T-cells) στον υποκινητή της IL-2 εκτοπίζοντας την AP-1 (activator protein-1) από το σύμπλοκο, καταστέλλοντας έτσι την επαγωγή της μεταγραφής της IL-2. Παρόμοιοι μηχανισμοί μπορεί επίσης να συμβάλουν στην καταστολή άλλων κυτταροκινών.⁵⁴

Η σημασία του FOXP3 για την ανάπτυξη των tTregs τονίζεται από το γεγονός ότι μεταλλάξεις του *FOXP3* έχουν ως αποτέλεσμα την εκδήλωση της φυλοσύνδετης ανοσοανεπάρκειας που φέρεται ως *σύνδρομο* IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome) και η οποία χαρακτηρίζεται από αυτοάνοση πολυενδοκρινοπάθεια (διαβήτης τύπου I, θυρεοειδίτιδα κ.ά.), φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, αλλεργία (ατοπική δερματίτιδα, τροφική αλλεργία) και σοβαρές λοιμώξεις.^{55,56}

Πρόσφατα διευκρινίστηκε ο μοριακός μηχανισμός που διατηρεί σταθερή την έκφραση του Foxp3 στα Tregs μέσω της ταυτοποίησης μιας εξελικτικά συντηρημένης περιοχής με νησίδες CpG εντός της μη-κωδικοποιούσας γονιδιακής περιοχής. Αυτή η περιοχή είναι μη-μεθυλιωμένη στα Tregs και μεθυλιωμένη στα παρθένα και δραστικά T-κύτταρα κι έχει χαρακτηριστεί ως «μη-μεθυλιωμένη περιοχή ειδικά στα Tregs» (Treg-specific demethylated region, TSDR).^{57,58,59,60} Η επαγωγή του Foxp3 από τον TGF-β φαίνεται να συνδέεται με μερική μόνο απομεθυλίωση της TSDR, γεγονός που αποτελεί μία ασταθή κατάσταση που αντιστρέφεται κατά την επαναδιέγερση.⁶¹ Έτσι, τα pTregs περιέχουν μεθυλιωμένες νησίδες CpGs. Οι αρχικές αναφορές για την TSDR αναφέρονταν σε ενισχυτική δράση της περιοχής.⁶² Ωστόσο, δεδομένης της παρόμοιας ποσοτικής έκφρασης του Foxp3 στα tTregs και τα pTregs, παρά τις μεγάλες διαφορές στην κατάσταση μεθυλίωσης της TSDR, ενισχύουν την άποψη ότι η TSDR είναι κρίσιμη κυρίως για τη σταθερή έκφραση του Foxp3.^{57,63,64}

1.1.4 Κατασταλτικοί μηχανισμοί

Η κατασταλτική δράση των tTregs ασκείται έπειτα από αντιγονική διέγερσή τους μέσω του υποδοχέα TCR, ενώ είναι ανεξάρτητη από την αντιγονική ειδικότητα των

κυττάρων-στόχων (bystander suppression).^{65,66} Τα tTregs αποτελούν μια ξεχωριστή σειρά δεσμευμένων T-κυττάρων που προέρχεται από το θύμο με την ικανότητα να καταστέλλουν την ενεργοποίηση και τη λειτουργία μιας πληθώρας ανοσοδραστικών κυττάρων, τόσο της φυσικής (μη ειδικής), όσο και της επίκτητης (ειδικής) ανοσίας. Ειδικότερα, τα tTregs καταστέλλουν την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την εκκριτική δραστηριότητα των CD4⁺ (βοηθητικών) και CD8⁺ (κυτταροτοξικών) T-κυττάρων.^{67,68,69} Επιπρόσθετα, καταστέλλουν αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό, την ισοτυπική μεταστροφή⁷⁰ και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών των B-κυττάρων,⁷¹ ενώ είναι ικανά να παρεμποδίζουν την κυτταροτοξική δράση των φυσικών κυτταροκτόνων (natural killer cells, NK)⁷² και των NKT-κυττάρων,⁷³ καθώς και την ωρίμανση και λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων.⁵⁶ Οι μηχανισμοί της κατασταλτικής δράσης των tTregs απεικονίζονται στην **Εικόνα 3**.

Διακυτταρική επαφή

Μελέτες σε τρωκτικά και ανθρώπους δείχνουν ότι η κατασταλτική λειτουργία των tTregs ασκείται μέσω άμεσης διακυτταρικής επαφής (**Εικ.3**).^{21,74} Διάφορα βοηθητικά μόρια των T-κυττάρων τα οποία εκφράζονται από τα tTregs, όπως τα CTLA4 και LAG3, καθώς και τα συνδιεγερτικά μόρια CD80 και CD86 που εκφράζονται από APCs συμβάλουν σε αυτόν τον εξαρτώμενο από επαφή κατασταλτικό μηχανισμό.^{6,36} Ειδικότερα το CTLA4 ασκεί πολλαπλές επιδράσεις στην tTreg-μεσολαβούμενη καταστολή. Για παράδειγμα, μπορεί να αλληλεπιδρά με τα μόρια CD80 και CD86 των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων μεταγόντας συνδιεγερτικό σήμα στα tTregs^{21,74} ή να επάγει την έκφραση του μορίου IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase), το οποίο ασκεί πιθανή ανοσοκατασταλτική δράση στο τοπικό περιβάλλον των δενδριτικών κυττάρων, είτε μέσω κυτταροτοξικότητας είτε επάγοντας την *de novo* δημιουργία Tregs από παρθένα T-κύτταρα.⁷⁵ Από την άλλη μεριά, ο αποκλεισμός του μορίου LAG3 άρει την κατασταλτική δράση των tTregs *in vivo* και *in vitro*.³⁶ Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος του LAG3 στην καταστολή μέσω των tTregs *in vivo* παραμένει ασαφής, αφού διαγονιδιακά ποντίκια με απουσία έκφρασης του LAG3 δεν παρουσιάζουν καμία αυτοάνοση εκδήλωση.³⁶ Αντίθετα, ποντίκια που χαρακτηρίζονται από απουσία έκφρασης CTLA-4 αναπτύσσουν σοβαρή αυτοάνοση ή φλεγμονή.⁴³

Ο ρόλος των κυτταροκινών

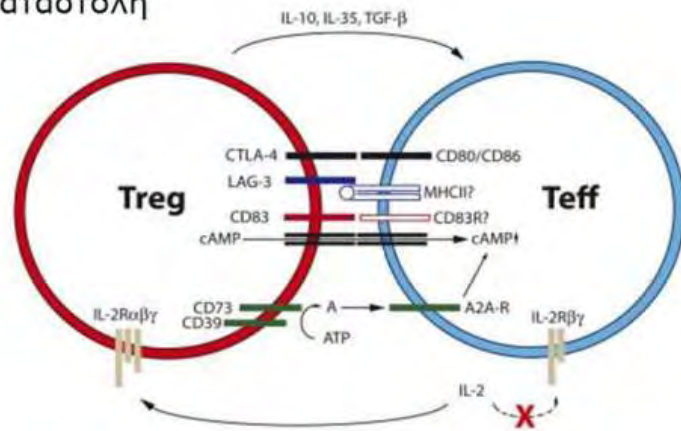
Ενώ τα δεδομένα από τις περισσότερες *in vitro* μελέτες δείχνουν ότι η ρυθμιστική ικανότητα των tTregs εξαρτάται από τη διακυτταρική επαφή, πολλοί διαλυτοί παράγοντες έχουν σχετιστεί με την κατασταλτική δράση αυτών των κυττάρων (**Εικ.3**). Μία από τις πιο κοινές κυτταροκίνες είναι η IL-10, η οποία αποτελεί ισχυρό ανοσορρυθμιστικό παράγοντα με αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες.^{76, 77} Διάφορα ανοσοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων, των δενδριτικών, των B-

και των ενεργοποιημένων T-κυττάρων παράγουν IL-10, αλλά ο ρόλος της στα tTregs δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Πράγματι, σε πολλές λειτουργικές μελέτες των ανθρώπινων tTregs δεν ανιχνεύθηκε έκκριση της IL-10 έπειτα από διέγερση,^{18,20} καθιστώντας τη ρυθμιστική ικανότητα των tTregs ανεξάρτητη της IL-10.^{78,79} Ωστόσο, έχουν προταθεί σημαντικοί ρόλοι που πιθανά ασκεί η IL-10 στη ρυθμιστική λειτουργία των tTregs, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.⁸⁰ Όλα τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι η IL-10 κατέχει σημαντικό ρόλο σε συγκεκριμένες υποομάδες των tTregs ή σε ένα ξεχωριστό ιστο-ειδικό περιβάλλον, χωρίς όμως είναι απαραίτητη για την tTreg-μεσολαβούμενη καταστολή.

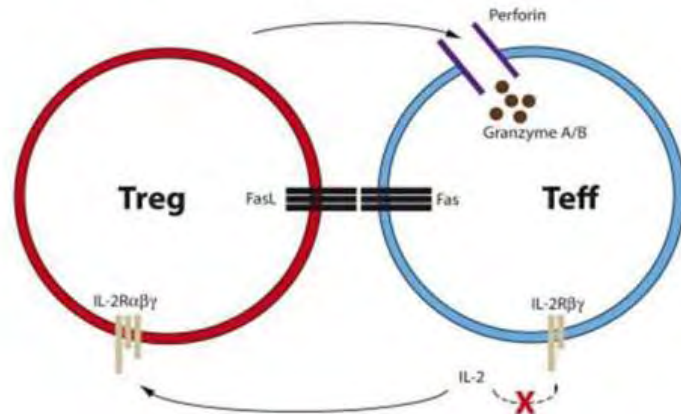
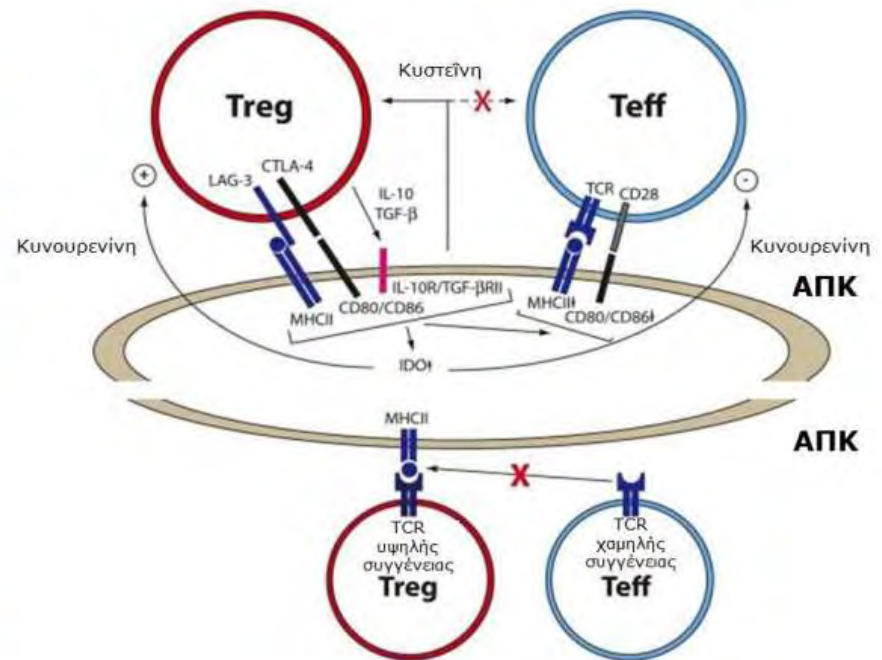
Ένας δεύτερος διαλυτός παράγοντας που σχετίζεται με τη λειτουργία των tTregs κι εμφανίζει ρυθμιστικές λειτουργίες είναι ο TGF-β. TGF-β-knockout ποντίκια αναπτύσσουν από νωρίς θανατηφόρα αυτοφλεγμονώδη διαταραχή, παρόμοια με αυτή των Foxp3-knockout ποντικίων, η οποία χαρακτηρίζεται από υπερ-ενεργοποίηση των T-κυττάρων και συστηματική φλεγμονή.⁸¹ Ο TGF-β που εκκρίνεται από τα tTregs φαίνεται να εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό στη ρύθμιση των αυτοδραστικών Teffs **(Εικ.3)**.⁸² Παρά το γεγονός ότι αυτή η εξάρτηση της λειτουργίας των tTregs από τον TGF-β έχει περιγραφεί με πειράματα σε ποντίκια, οι απόψεις είναι αντικρουόμενες στον άνθρωπο.^{78,79,83} Επιπρόσθετα, μελέτες σε ποντίκια δείχνουν ότι ο TGF-β μπορεί να συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη και να συμβάλει με αυτόν τον τρόπο στους διακυτταρικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς.⁸⁴ Ωστόσο, έχει καταστεί σαφές ότι ο TGF-β διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της έκφρασης και της ρυθμιστικής ικανότητας του FOXP3 σε περιφερικά T-κύτταρα, τα οποία κατά συνέπεια ονομάζονται pTregs. Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει την κυτταροκίνη IL-35 ως σημαντικό παράγοντα για τη διατήρηση της ομοιόστασης και τη λειτουργία των tTregs.^{85,86,87} Η απουσία του μορίου οδηγεί σε διαταραχή της ρυθμιστικής ικανότητας των tTregs *in vitro* και *in vivo*, ενώ η υπερέκφρασή του προσδίδει ρυθμιστική δράση σε παρθένα CD4⁺ T-κύτταρα.⁸⁶ Η IL-35 εκφράζεται σταθερά από τα tTregs ποντικών αλλά όχι από τα Teffs τους, ωστόσο αμφισβητείται η καταλληλότητά της για τα tTregs στον άνθρωπο.⁸⁸

A.

Καταστολή



Κυτταρικός Θάνατος

**B.**

Εικ.3 Σχηματική αναπαράσταση των κατασταλτικών μηχανισμών των Tregs. **A.** Άμεση καταστολή και επαγωγή της απόπτωσης του κυττάρου-στόχου, **B.** Ρύθμιση των απαντήσεων των Teffs μέσω των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (ΑΠΚ). [Τροποποίηση από: Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WF. FASEB J. 2012;26:2253-2576]

Θανάτωση κυττάρων-στόχων

Με βάση την παρατήρηση ότι τα tTregs εκφράζουν τα κοκκιοένζυμα (granzymes) A και B, καθώς και περφορίνη (perforin),⁸⁹ προτάθηκε ότι ένας πρόσθετος πιθανός μηχανισμός δράσης τους είναι η επαγωγή του κυτταρικού θανάτου στα κύτταρα-στόχους **(Εικ.3)**. Πράγματι, αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα tTregs, τόσο του ποντικού^{90,91} όσο και του ανθρώπου,⁸⁹ ρυθμίζουν τις απαντήσεις των Teffs μέσω της επαγωγής της απόπτωσης, τουλάχιστον εν μέρει. Ωστόσο, η ακριβής συνεισφορά του κάθε μορίου στην επαγωγή της απόπτωσης είναι εν πολλοίς άγνωστη. Τα tTregs προκαλούν απόπτωση των CD4⁺ Teffs κυρίως μέσω του granzyme B στον ποντικό^{90,91} και μέσω του συστήματος granzyme/perforin αλλά όχι του μορίου FasL στον άνθρωπο.⁸⁹ Σε αντίθεση, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα tTregs μπορούν να σκοτώνουν CD8⁺ T-κύτταρα μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού FasL/Fas **(Εικ.3)**.⁹² Η επαγωγή της απόπτωσης δεν περιορίζεται στα Teffs αλλά αφορά και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Έτσι, τα ανθρώπινα Tregs παρουσιάζονται ικανά να επάγουν την απόπτωση των B-κυττάρων, των μονοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων, μεσολαβώντας έμμεσα στη ρύθμιση των T-κυτταρικών απαντήσεων.⁸⁹

1.2 Περιφερικά επαγόμενα ρυθμιστικά T-κύτταρα

Οι δύο πιο κοινοί τύποι pTregs είναι τα ρυθμιστικά T-κύτταρα τύπου 1 (Tr1) και τα Th3 κύτταρα **(Εικ.1)**. Τα Tr1 εκκρίνουν IL-10 και εξαρτώνται από αυτή για να επαχθούν,^{93,94,95} ενώ είναι ικανά να εκκρίνουν υψηλά επίπεδα IL-10, TGF-β και χαμηλά επίπεδα IL-2, IL-5 και IFN-γ.^{93,95} Σημαντικός παράγοντας ανάπτυξης για τα Tr1 κύτταρα είναι η IL-15, η οποία μπορεί να υποστηρίξει τον πολλαπλασιασμό τους ακόμη και χωρίς TCR-μεσολαβούμενη ενεργοποίηση.^{93,95} Επίσης τα Tr1 είναι CD4⁺, ανεργικά και πολλαπλασιάζονται ελάχιστα μετά αντιγονο-ειδική ενεργοποίηση, κάτι που είναι πιθανό να οφείλεται στην αυτοκρινή παραγωγή της IL-10 που οδηγεί σε καταστολή του πολλαπλασιασμού τους.^{93,95} Ο μηχανισμός της κατασταλτικής δράσης των Tr1 βασίζεται σε διαλυτούς παράγοντες, ενώ η κατασταλτική επίδρασή τους μπορεί να αρθεί από αντισώματα έναντι της IL-10 *in vitro*.^{93,95} Δεν υπάρχει ειδικός δείκτης για αυτά τα κύτταρα, αν και ο καταστολέας του μορίου GATA-3 (ROG) παρουσιάζει πιθανή χρησιμότητα για τη διάκρισή τους, χωρίς όμως να είναι ειδικός για αυτόν τον κυτταρικό πληθυσμό.^{93,95}

Παρόμοια, τα κύτταρα Th3 εκκρίνουν IL-10 και είναι FOXP3⁺.⁹⁴ Επάγονται από παρθένα CD4⁺ T-κύτταρα με τη δράση του TGF-β και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοχή που επάγεται σε αντιγόνα της γαστρεντερικής οδού αναιρώντας αυτοάνοσες αντιδράσεις.⁹⁶ Τα Th3 κύτταρα εκκρίνουν TGF-β, που έχει γνωστή ανοσοκατασταλτική δράση, μέσω της δράσης ενός μηχανισμού διαλυτών παραγόντων. Δεν υπάρχει ειδικός

επιφανειακός δείκτης που να προσδιορίζει τα Th3 κύτταρα, παρά την επαγωγή της έκφρασης του FOXP3 σε αυτά.

1.3 Πλαστικότητα των ρυθμιστικών T-κυττάρων

Μολονότι είναι γνωστός ο σημαντικός ρόλος των Tregs στον έλεγχο των απαντήσεων άλλων κυτταρικών τύπων, τα κύτταρα αυτά υπό ορισμένες πειραματικές συνθήκες, μπορεί να γίνουν ασταθή. Συγκεκριμένα, τα Foxp3⁺ μπορεί να χάσουν την ανασταλτική λειτουργία τους και να γίνουν παθογόνα δραστικά κύτταρα σε αυτοάνοσες καταστάσεις.⁹⁷ Η ικανότητα των Tregs να μετατρέπονται σε άλλους κυτταρικούς τύπους ή να παράγουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες προκαλεί ανησυχία, καθώς μπορεί να επιδεινώσουν καταστάσεις που προορίζονταν να «θεραπεύσουν».

1.3.1 Ασταθής έκφραση του Foxp3 στα ρυθμιστικά T-κύτταρα

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ανάπτυξη και η λειτουργία των Tregs είναι εξαρτώμενη από την έκφραση του Foxp3.⁹⁸ Η κατασταλτική δράση των Tregs σχεδόν καταργείται όταν υπάρχει εξασθενημένη έκφραση του Foxp3 και αυτά τα κύτταρα μετατρέπονται, κατά προτίμηση, σε Th2 δραστικά κύτταρα.⁹⁹ Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η μειωμένη έκφραση του FOXP3 συνδέεται με ανοσιακές διαταραχές στον άνθρωπο.^{100,101} Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η μειωμένη έκφραση του Foxp3 μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αστάθεια και τη μετατροπή των κυττάρων αυτών σε Tregs. Τα μοριακά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που προσδίδονται στα Tregs από το Foxp3 έχουν ερευνηθεί εκτενώς.⁵⁰ Αυτές οι μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η πρωτεΐνη Foxp3 ενισχύει και σταθεροποιεί γονίδια που κωδικοποιούν τόσο μόρια κυτταρικής επιφάνειας όσο και εκκρινόμενα, συμπεριλαμβανομένων των CD73, CD39, ή CTLA-4, τα οποία συνήθως αυξάνονται στα συμβατικά CD4⁺ T-κύτταρα κατά τη διέγερση του TCR και είναι ικανά να ρυθμίζουν αρνητικά την ενεργοποίηση των T-κυττάρων.

Επιπρόσθετα, έχει αρχίσει να αμφισβητείται η άποψη ότι τα Foxp3⁺ Tregs είναι σταθερά *in vivo* (δηλαδή δε μεταπίπτουν σε άλλον κυτταρικό τύπο) κι ελέγχονται από το ίδιο το Foxp3 μέσω μιας αγκύλης θετικής ανάδρασης.^{50, 102,103} Επειδή τα επίπεδα της έκφρασης του Foxp3 είναι ζωτικής σημασίας για τη σταθεροποίηση των Tregs, πολλές μελέτες έχουν διερευνήσει τους παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφρασή (ανεξάρτητα από το θύμο). Ειδικότερα, η IL-6 δρα σε συνεργασία με την IL-1 για τη μείωση της έκφρασης του Foxp3 μέσω μιας σηματοδοτικής οδού που εξαρτάται από το μεταγραφικό παράγοντα Stat3.¹⁰⁴ Μια ένδειξη της ενεργού ρύθμισης της σταθερότητας του Foxp3 παρέχεται κατά την παρατήρηση ότι η απώλεια του Dicer- ρυθμιστή της έκφρασης των microRNA- οδηγεί σε κανονική ανάπτυξη των tTregs αλλά μειώνει την έκφραση του Foxp3 και οδηγεί σε δυσλειτουργία τους στην περιφέρεια.¹⁰⁵

Σήμερα είναι ευρέως αποδεκτό από την επιστημονική κοινότητα ότι η αυτοανοσία προκαλείται από ανισορροπία των παθολογικών T-κυττάρων και των Foxp3⁺ Tregs.^{106, 107} Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε κάποιο ελάττωμα των Tregs που επιτρέπει στα παθολογικά κύτταρα να ξεφύγουν από τη ρύθμιση και να προκαλέσουν νόσο.¹⁰⁸ Βάσει των ευρημάτων που προκύπτουν, εναλλακτικά, η αστάθεια του Foxp3 πιθανόν να οδηγεί στην παραγωγή των παθολογικών effector- ή memory- like T-κυττάρων, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν αυτοανοσία.⁹⁷

1.3.2 Foxp3⁺ ρυθμιστικά T-κύτταρα που εκκρίνουν IL-17

Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν έως τώρα περιγράψει τη μετατροπή των Foxp3⁺ Tregs σε κύτταρα με φαινότυπο Th17 (που εκκρίνουν IL-17) που επάγεται με κατάλληλα φλεγμονώδη ερεθίσματα.^{13,40,77,78,79} Η αμοιβαία σχέση μεταξύ των Tregs και των κυττάρων Th17 καθιερώθηκε από τη στιγμή που ανακαλύφθηκαν τα Th17 κύτταρα.⁷³ Ένα κλάσμα των Foxp3⁺ Tregs είναι σε θέση να παράγει IL-17, παρουσία της IL-6 ή άλλου φλεγμονώδους διεγέρτη, αποκτώντας ένα φαινότυπο παρόμοιο με τα Th17 κύτταρα (αυτό μπορεί να σχετίζεται με την αστάθεια της έκφρασης του Foxp3).⁸⁰ Ωστόσο, έχει περιγραφεί ότι τα Tregs μπορούν να μετατραπούν σε IL-17⁺ Tregs, υπό φυσιολογικές συνθήκες, εν απουσία εξωγενούς πόλωσης από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες αλλά παρουσία APCs και συμβατικών CD4⁺ κυττάρων.⁸¹ Σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των Tregs σε IL-17⁺ κύτταρα φαίνεται να διαδραματίζει η IL-1β.⁸¹ Τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν ξεκάθαρα ότι τα Foxp3⁺ Tregs υπόκεινται σε διαφοροποίηση που επιβάλλεται από άλλα ανοσοκύτταρα κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης. Αυτό το υποσύνολο των διαφοροποιημένων κυττάρων Tregs μπορεί να έχει την ικανότητα να ρυθμίζει ανοσιακές απαντήσεις που επάγονται από συγκεκριμένους πληθυσμούς των T effs.

1.4 Ο ρόλος των ρυθμιστικών T-κυττάρων στη νοσολογία

Από την παραπάνω περιγραφή των Tregs είναι προφανές ότι διαταραχές της λειτουργίας τους ενδέχεται να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε νοσήματα και καταστάσεις, η παθογένεια των οποίων εξαρτάται από τον έλεγχο της ανοσιακής απάντησης, τόσο έναντι «ίδιων», όσο και έναντι ξένων αντιγόνων. Οι κύριες λειτουργίες του ανοσιακού συστήματος είναι η καταστολή των αυτοδραστικών απαντήσεων με σκοπό την πρόληψη της εκδήλωσης των αυτοάνοσων νοσημάτων, καθώς και η αποτελεσματική αντιμετώπιση των λοιμώξεων, ελαχιστοποιώντας παράπλευρες απώλειες στους ιστούς. Για τη διατήρηση της λεπτής ισορροπίας μεταξύ των δραστικών και των κατασταλτικών απαντήσεων είναι υπεύθυνα αφενός τα δραστικά Th1, Th2 και κυτταρολυτικά κύτταρα και αφετέρου τα Tregs. Η ανεπαρκής λειτουργία των Tregs ή η επίταση της δράσης τους έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση

αυτοανοσίας¹⁰⁸ ή καρκίνου¹⁰⁹ και χρόνιων λοιμώξεων,¹¹⁰ αντίστοιχα. Για όλους αυτούς τους λόγους, τα τελευταία χρόνια, τα Tregs έχουν αποτελέσει στόχο θεραπευτικών παρεμβάσεων που στοχεύουν στην ενίσχυση ή την καταστολή της λειτουργίας τους.

1.4.1 Αυτοανοσία

Η μειωμένη λειτουργική δραστηριότητα των Tregs μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση αυτοανοσίας. Νοσήματα όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας (multiple sclerosis, MS),¹¹¹ η ρευματοειδής αρθρίτιδα (rheumatoid arthritis, RA),¹¹² ο διαβήτης τύπου-1¹¹³ και η ψωριασική αρθρίτιδα,¹¹⁴ φαίνεται ότι σχετίζονται με σημαντικά ελαττωμένη κατασταλτική ικανότητα των CD4⁺CD25⁺ Tregs σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα από υγιείς δότες. Επειδή το ποσοστό των CD4⁺CD25⁺ Tregs στο περιφερικό αίμα των ασθενών αυτών είναι αμετάβλητο συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες, έχει προταθεί ότι κυρίως η ελαττωματική λειτουργία των Tregs, και όχι ο αριθμός τους, συμβάλλει στην ανάπτυξη αυτών των νοσημάτων. Αν και σε ορισμένα αυτοάνοσα νοσήματα έχουν παρατηρηθεί μειωμένα επίπεδα των CD4⁺CD25⁺ Tregs στο περιφερικό αίμα των ασθενών,^{115,116} ωστόσο, αυτή η μείωση πιθανά οφείλεται στη μετανάστευση των Tregs από το αίμα στη θέση της φλεγμονής. Πράγματι, μελέτες σε ασθενείς με RA ή νεανική ιδιοπαθή αρθρίτιδα (juvenile idiopathic arthritis, JIA) έδειξαν ότι το ποσοστό των CD4⁺CD25⁺ Tregs στο σημείο της φλεγμονής (π.χ., στο αρθρικό υγρό) ήταν σημαντικά αυξημένο σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό στο περιφερικό αίμα.¹¹⁷

Εκτός από τις περιπτώσεις αυτοανοσίας που περιγράφονται παραπάνω, σε αλλεργικούς ασθενείς υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για δυσλειτουργία των CD4⁺CD25⁺ Tregs στην καταστολή των Th2 κυττάρων, που αποτελούν τον κύριο μεσολαβητή της αλλεργικής αντίδρασης.^{118,119} Τα άτομα που πάσχουν από άσθμα ή αλλεργικά νοσήματα, έχει παρατηρηθεί πως εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα ή και δυσλειτουργία των Tr1 κυττάρων (των ρυθμιστικών κυττάρων που εκκρίνουν IL-10) σε σύγκριση με υγιή άτομα.^{120,121,122,123}

1.4.2 Καρκίνος

Αν και η φυσιολογική λειτουργία των Tregs είναι κομβικής σημασίας για τη διατήρηση της ανοχής έναντι «ίδιων» στοιχείων, αυτή η αρνητική ρυθμιστική δραστηριότητά τους θα μπορούσε να οδηγήσει σε καταστολή ανοσιακών απαντήσεων έναντι των όγκων, δεδομένου του γεγονότος ότι πολλά από τα αντιγόνα των όγκων (tumor-associated antigens, TAA) που αναγνωρίζονται από τα αυτόλογα T-κύτταρα των ασθενών με καρκίνο, είναι αντιγονικώς ταυτόσημα με «ίδια» συστατικά του οργανισμού. Συνάθροιση CD4⁺CD25⁺ Tregs παρατηρείται είτε στο περιφερικό αίμα είτε στο ανατομικό περιβάλλον του όγκου.^{124,125,126,127,128} Επιπλέον, Tregs απομονωμένα από όγκους εμφανίζουν ισχυρή κατασταλτική δράση έναντι διεγερμένων αυτόλογων T-κυττάρων του περιφερικού αίματος *in vitro*.¹²⁹ Εκτός από τα CD4⁺CD25⁺ Tregs, έχει

αποδειχθεί ότι και τα Tr1 ευθύνονται για τις αναποτελεσματικές ανοσιακές απαντήσεις έναντι των όγκων.^{130,131} Η αυξημένη συχνότητα μάλιστα των Tregs που διηθούν τους όγκους συσχετίζεται με υψηλή θνησιμότητα και μειωμένη επιβίωση των ασθενών.^{109,132,133}

1.4.3 Λοιμώξεις

Αρκετές μελέτες έχουν αναφερθεί στο ρόλο των Tregs στις λοιμώξεις, αφού είναι ικανά αφενός να συμβάλλουν στον περιορισμό της παράπλευρης βλάβης των «ιδίων» στοιχείων του ξενιστή και αφετέρου να διευκολύνουν την ανάπτυξη της ανοσιακής μνήμης. Ωστόσο, είναι δυνατό να χρησιμοποιούνται από τα παθογόνα ως μηχανισμός καταστολής της έναντι αυτών ανοσιακής απάντησης και διαφυγής από αυτή, με αποτέλεσμα την παράταση της επιβίωσής τους στον οργανισμό του ξενιστή.¹¹⁰ Μελέτες σε διάφορα μοντέλα πειραματοζώων έχουν δείξει ότι η εξάλειψη των Tregs οδηγεί σε αυξημένες CD4⁺ και CD8⁺ T κυτταρικές απαντήσεις, καθώς και σε αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων με αποτέλεσμα τη γρηγορότερη κάθαρση από το παθογόνο.^{134,135,136}

Στον άνθρωπο έχει παρατηρηθεί όχι μόνο η συνάθροιση CD4⁺CD25⁺ Tregs στο περιφερικό αίμα ασθενών με λοιμώξεις αλλά και η ικανότητά τους να καταστέλλουν ειδικές αντι-ιϊκές κυτταρολυτικές απαντήσεις.^{137,138,139,140} Επίσης, έμμεσες ενδείξεις υποστηρίζουν ότι τα Tregs ενδέχεται να καταστέλλουν την παραγωγή των μνημονικών CD8⁺ κυττάρων.^{135,136} Επιπρόσθετα, η απομόνωση Tr1 κυττάρων ήταν δυνατή μόνο σε περιπτώσεις ασθενών με χρόνιες λοιμώξεις κι όχι στις περιπτώσεις που υπήρξε κάθαρση από το παθογόνο.¹⁴¹ Ορισμένα παθογόνα παράγουν μόρια ομόλογα των ανθρώπινων κυτταροκινών, όπως η ιϊκή IL-10, ενώ άλλα επάγουν την παραγωγή κυτταροκινών με ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες (IL-10, TGF-β) στον ξενιστή, είτε άμεσα μέσω της έκκρισης προϊόντων που διεγείρουν τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας, είτε έμμεσα μέσω της δημιουργίας Tregs.^{142,143}

2. ΑΠΟΠΤΩΣΗ

2.1 Ορισμός- Σημασία της απόπτωσης

Ως απόπτωση ορίζεται η διαδικασία της αποσύνθεσης (θανάτου) του κυττάρου μέσω ενός γενετικά προκαθορισμένου εσωτερικού μηχανισμού αυτοκαταστροφής.¹⁴⁴ Με τη διαδικασία αυτή το κύτταρο συρρικνώνεται χωρίς διάσπαση της κυτταρικής του μεμβράνης και τελικά εξαφανίζεται με φαγοκυττάρωση, χωρίς να αφήσει κατάλοιπα. Το πρόγραμμα αυτό περιλαμβάνει μια ενεργή διαδικασία συγκεκριμένων βημάτων και εκλύεται ως απάντηση όταν το κύτταρο λάβει ορισμένα ερεθίσματα, όπως η στέρηση των αυξητικών παραγόντων, η έκθεση σε κυτταροτοξικά φάρμακα ή παράγοντες που βλάπτουν το DNA, η ενεργοποίηση των κυτταρικών υποδοχέων θανάτου και η δράση των ΝΚΤ-κυττάρων του ανοσιακού συστήματος.¹⁴⁵ Από την άλλη μεριά, ο παθολογικός κυτταρικός θάνατος ή αλλιώς νέκρωση προκύπτει απρόβλεπτα, ως «ατύχημα», μετά από την έκθεση του κυττάρου σε βλαπτικά ερεθίσματα στα οποία δεν μπορεί να ανταπεξέλθει. Το αποτέλεσμα τέτοιων ερεθισμάτων είναι η βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης, η αθρόα εισροή ύδατος και εξωκυττάρων ιόντων στον ενδοκυττάριο χώρο, η εξοίδηση και η καταστροφή του κυττάρου, του οποίου τα περιεχόμενα εκλύονται στον εξωκυττάριο χώρο προκαλώντας πλειάδα αντιδράσεων.

Η απόπτωση είναι ένας από τους μηχανισμούς που συμμετέχουν στη διατήρηση της ομοιοστασίας του οργανισμού. Ως ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού, όπως η διαδικασία της εμβρυογένεσης-οργανογένεσης, η ανάπτυξη ιστών με την επιλογή των καταλληλότερων κυττάρων^{146, 147} και η προστασία από βλαπτικά κύτταρα, όπως συμβαίνει κατά την απενεργοποίηση ανοσοκυττάρων μετά την ολοκλήρωση της ανοσιακής απάντησης,¹⁴⁸ καθώς και κατά την προστασία έναντι ιογενών λοιμώξεων και της ανάπτυξης όγκων.¹⁴⁹

2.2 Μοριακοί μηχανισμοί της απόπτωσης

Η διαδικασία της απόπτωσης μπορεί να διακριθεί στις εξής φάσεις: *φάση έναρξης* (initiation phase), *φάση παγίωσης* (commitment phase) και *φάση εκτέλεσης* (execution phase). Η φάση έναρξης πυροδοτείται είτε μέσω της **ενδογενούς/μιτοχονδριακής οδού** (intrinsic or mitochondrial pathway), είτε μέσω της **εξωγενούς οδού των**

υποδοχέων θανάτου (extrinsic or death receptor pathway). Τα τελευταία χρόνια γίνεται ολοένα και πιο σαφές ότι οι οδοί αυτοί είναι αλληλοσυνδεόμενες.

Αφού δοθεί το έναυσμα της απόπτωσης, είτε μέσω της ενδογενούς είτε μέσω της εξωγενούς οδού, κινητοποιείται ενδοκυττάριος μηχανισμός στον οποίο κεντρικό ρόλο παίζει μια οικογένεια πρωτεασών που ονομάζονται κασπάσες^{145,150} και αποτελούν τον «κεντρικό εκτελεστή» στην αποπτωτική διαδικασία, καθώς και την κοινή οδό ενσωμάτωσης όλων των αποπτωτικών ερεθισμάτων.¹⁵¹

Οι κασπάσες που ενεργοποιούνται κατά την έναρξη της απόπτωσης ονομάζονται *εναρκτήριες κασπάσες* (initiator caspases) και είναι οι κασπάσες 2, 8 και 10 για την εξωγενή οδό και η κασπάση 9 για την ενδογενή οδό. Οι *εναρκτήριες κασπάσες* έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιούν αφενός άλλες *εναρκτήριες κασπάσες*, προκαλώντας την αυτο-ενίσχυση του αποπτωτικού σήματος, και αφετέρου τις *κασπάσες-εκτελεστές* (effector caspases). Οι *κασπάσες-εκτελεστές*, που είναι οι κασπάσες 3, 6 και 7 και για τις δύο οδούς, μπορούν να αποσυνθέτουν πρωτεολυτικά διάφορες κυτταροπλασματικές και πυρηνικές κυτταρικές δομές, οδηγώντας στην κατάρρευση του κυττάρου με τις χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται στην απόπτωση.^{145,152} Έπειτα η απόπτωση εισέρχεται στη φάση της παγίωσης, όπου το κύτταρο «δεσμεύεται» ότι θα πεθάνει και κατόπιν ακολουθεί η φάση της εκτέλεσης όπου επέρχονται οι χαρακτηριστικές μορφολογικές και βιοχημικές αλλοιώσεις στο κύτταρο, ως αποτέλεσμα της δράσης των *κασπασών-εκτελεστών*.^{153,154}

2.2.1 Ενδογενής οδός της απόπτωσης

Η ενδογενής οδός της απόπτωσης μπορεί να προκληθεί από μια ποικιλία σημάτων θανάτου που προέρχονται από το εσωτερικό του κυττάρου. Αυτοί οι ενδοκυττάριοι στρεσογόνοι παραγόντες επιδρούν στα μιτοχόνδρια αλλάζοντας τη μεμβρανική τους διαπερατότητα. Αυτό οδηγεί στην απελευθέρωση αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως το κυτόχρωμα *c* (cytochrome *c*), από το διαμεμβρανικό χώρο στο κυτταρόπλασμα. Το κυτόχρωμα *c* τότε συσσωρεύει και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Apaf-1, παρουσία ATP/dATP (apoptotic protease-activating factor-1), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την κασπάση 9 σχηματίζοντας έτσι ένα σύμπλεγμα που ονομάζεται «αποπτώσωμα» (apoptosome).^{152,155} Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη κασπάση 9 του αποπτώσωματος ενεργοποιεί τις *κασπάσες-εκτελεστές* 3 και 7 που προκαλούν την απόπτωση. Άλλες πρωτεΐνες που εκλύονται από τα μιτοχόνδρια ως απάντηση σε αποπτωτικά ερεθίσματα είναι η πρωτεΐνη Smac/DIABLO (second mitochondrial activator of caspases/direct IAP-binding protein of low isoelectric point) και ο επάγων την απόπτωση παράγοντας (apoptosis-inducing factor, AIF). Η πρώτη προσδένεται στις *πρωτεΐνες-αναστολείς της απόπτωσης* (inhibitor of apoptosis proteins-IAPs), τροποποιώντας την ανασταλτική

τους δράση στις κασπάσες,^{152, 156, 157, 158} ενώ η δεύτερη μεταναστεύει στον πυρήνα προκαλώντας μερική κατάτμηση του DNA και συμπύκνωση της χρωματίνης.^{159, 160} Η ενδογενής αποπτωτική οδός με τη δράση των πρωτεϊνών που εκλύονται από τα μιτοχόνδρια φαίνεται στην **Εικόνα 4**.

Οι μηχανισμοί που ενοχοποιούνται για την έκλυση αποπτωτικών πρωτεϊνών από τα μιτοχόνδρια ως απάντηση σε ενδοκυττάρια βλαπτικά ερεθίσματα είναι δύο: α) η διάνοιξη της διαπερατότητας του μιτοχονδριακού πόρου που προκαλεί ρήξη της έξω-μιτοχονδριακής μεμβράνης^{161, 162, 163, 164} και β) η δράση της οικογένειας των πρωτεϊνών Bcl-2.^{165, 166, 167, 168} Τα αποπτωτικά μέλη Bax της οικογένειας φαίνεται ότι είναι ικανά να διανοίγουν πόρους,^{169, 170} ενώ τα αντι-αποπτωτικά μέλη Bcl-2 ανταγωνίζονται τη δράση των πρώτων αναστέλλοντας την απόπτωση.¹⁷¹

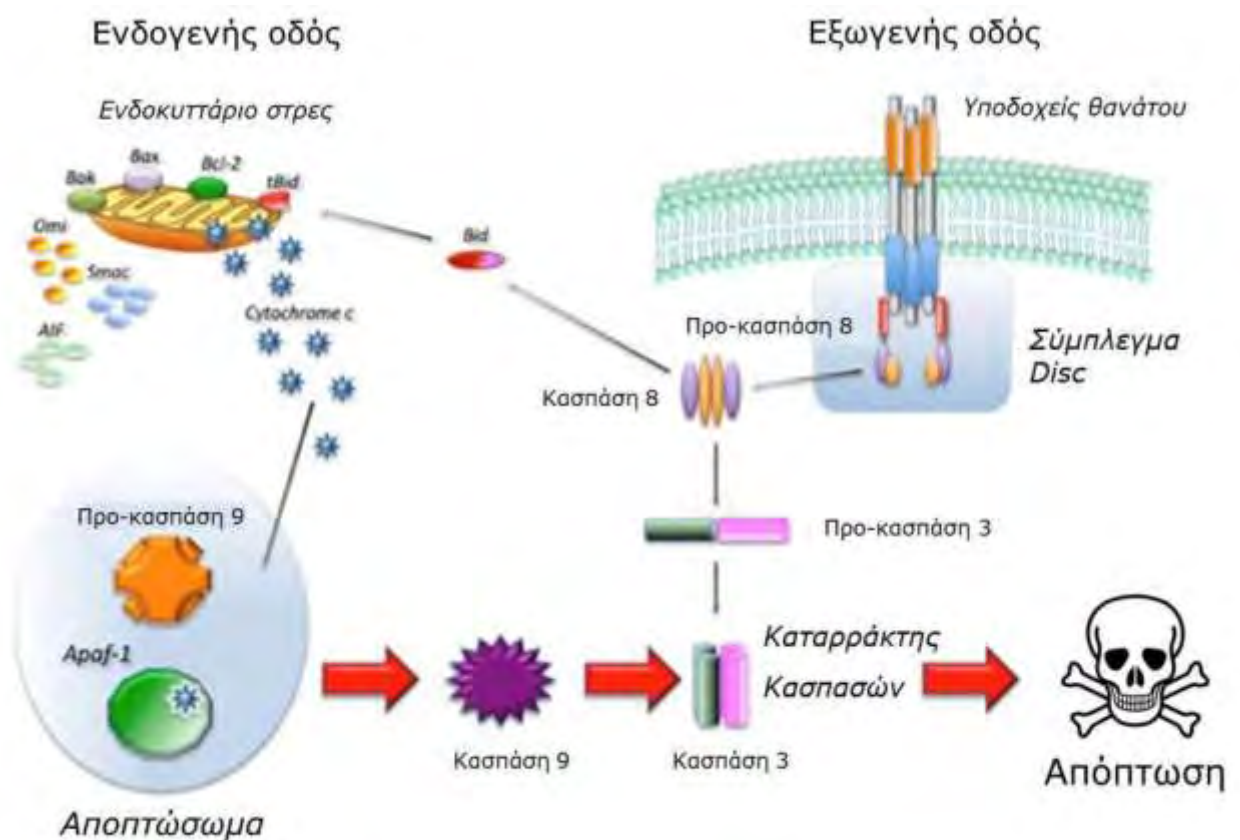
2.2.2 Εξωγενής οδός της απόπτωσης

Το έναυσμα για τη διαδικασία της εξωγενούς οδού της απόπτωσης προέρχεται από το εξωτερικό του κυττάρου και την ενεργοποίηση των μεμβρανικών υποδοχέων θανάτου (death receptors, DRs) από τα αντίστοιχα μόρια-συνδέτες (ligands) τους.

Οι υποδοχείς θανάτου είναι μια ομάδα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών τύπου-1 της ευρύτερης οικογένειας των TNFRSF. Ωστόσο, διαφέρουν από τα άλλα μέλη της οικογένειας αφού φέρουν ένα ειδικό ενδοκυττάριο τμήμα που ονομάζεται «περιοχή θανάτου» (death domain, DD). Η «περιοχή θανάτου» είναι υπεύθυνη για την ικανότητά τους να επάγουν την απόπτωση. Τα αντίστοιχα μόρια-συνδέτες, από την άλλη πλευρά, ανήκουν στην ευρύτερη υπεροικογένεια του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF superfamily, TNFSF)¹⁷² και είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου-2. Οι ενεργοί συνδέτες δημιουργούνται από την αναδίπλωση του εξωκυττάριου καρβοξυτελικού άκρου σε δομές β-πτυχωτών αλυσίδων και τον ομοτριμερισμό τους, ενώ είναι δυνατή και η δημιουργία διαλυτών τριμερών έπειτα από πρωτεολυτική διάσπαση. Τόσο τα μεμβρανικά όσο και τα διαλυτά τριμερή μπορούν να συνδεθούν με τριάδα αντίστοιχων υποδοχέων TNFR, προκαλώντας μέσω αυτής της συσσώρευσης την ενεργοποίησή τους.¹⁷³

Έως σήμερα έχουν απομονωθεί οι ακόλουθοι έξι υποδοχείς θανάτου στην οικογένεια των TNFR με τους αντίστοιχους συνδέτες τους: α) TNF-R1/TNFα, β) Fas/FasL, γ) DR3/TL1A, δ) TRAIL-R1 [tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) receptor 1]/TRAIL, ε) TRAIL-R2/TRAIL, στ) DR6/άγνωστος.^{172, 174, 175} Όταν ενεργοποιηθούν οι DRs από τους αντίστοιχους συνδέτες τους, προσελκύνουν τις «προσαρμοστικές» πρωτεΐνες FADD (Fas-associating protein with death domain) για τους υποδοχείς Fas, TRAILR1 και TRAILR2 και τις πρωτεΐνες TRADD (TNFR1-associated death domain protein) για τους υποδοχείς TNFR1, DR3 και DR6. Αυτές οι πρωτεΐνες

συσσωρεύουν και ενεργοποιούν τις εναρκτηρίες κασπάσες είτε απευθείας, είτε με τη μεσολάβηση και άλλων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η FADD ενεργοποιεί τις κασπάσες 8 και 10, ενώ η TRADD μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση τόσο μέσω της FADD, όσο και μέσω της RIP (receptor-interacting protein), που ενεργοποιεί κατά σειράν τις RAIDD/CRADD (RIP-associated Ich1-homologous protein with death domain/Caspase and RIP adaptor with death domain) και κασπάση 2. Εναλλακτικά, η TRADD μπορεί να ενεργοποιήσει οδούς διάσωσης του κυττάρου που σχετίζονται με την πρωτεΐνη TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2), που οδηγεί σε ενεργοποίηση του NF-κΒ ή της οδού της κινάσης JNK (Jun NH₂-terminal kinase).¹⁵² Η εξωγενής αποπτωτική οδός με τη δράση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν φαίνεται στην **Εικόνα 4**.



Εικ.4 Σχηματική αναπαράσταση της ενδογενούς και εξωγενούς αποπτωτικής οδού, των μορίων που συμμετέχουν σε αυτές καθώς και η αλληλεπίδρασή τους. [Τροποποίηση από:Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Aging (Albany NY). 2012; 4: 330-349]

2.2.3 Αλληλεπίδραση ενδογενούς- εξωγενούς οδού απόπτωσης

Είναι πλέον ξεκάθαρο ότι οι δύο οδοί ενεργοποίησης της απόπτωσης δε δρουν μόνο ανεξάρτητα η μια από την άλλη αλλά μπορούν να αλληλεπιδρούν (**Εικ.4**). Η εξωγενής οδός μπορεί να ενισχύσει τα σήματα θανάτου μέσω της ενεργοποίησης της

ενδογενούς οδού, ενώ υπάρχουν περιπτώσεις όπου η ενδιάμεση ενεργοποίηση των μιτοχονδρίων είναι απαραίτητη για την ολοκλήρωση της απόπτωσης μέσω των DRs. Αυτό φαίνεται να ισχύει ειδικά στο σύστημα Fas/FasL όπου, ανάλογα με την αναγκαιότητα της ενδιάμεσης μιτοχονδριακής ενεργοποίησης, τα κύτταρα χωρίζονται σε τύπου I και τύπου II κύτταρα.¹⁷⁶ Στα κύτταρα τύπου I η κασπάση 8 οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης 3, ανεξαρτήτως των μιτοχονδρίων, ενώ τα τύπου II κύτταρα χρησιμοποιούν πιο περίπλοκη διαδικασία με περισσότερα στάδια ελέγχου μέχρι την ολοκλήρωση της απόπτωσης. Συγκεκριμένα, οι κασπάσες 8 και 10 διασπούν την αποπτωτική πρωτεΐνη Bid η οποία μεταναστεύει στα μιτοχόνδρια και επάγει την έκλυση του κυτοχρώματος c από αυτά. Ακολουθώντας, δημιουργείται το αποπτώσωμα και ενεργοποιούνται οι κασπάσες εκτελεστές.^{177, 178} Γνωστά τύπου I κύτταρα είναι τα περιφερικά T-κύτταρα, ενώ τα ηπατοκύτταρα είναι τυπικά κύτταρα τύπου II.¹⁷⁹

2.3 Ο ρόλος της απόπτωσης στη νοσολογία

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι διαταραχές της απόπτωσης με την έννοια είτε της έκπτωσης είτε της επίτασης της εμπλέκονται στην ανάπτυξη πολλών διαφορετικών νοσημάτων. Νοσήματα των οποίων η παθογένεια σχετίζεται με έκπτωση της απόπτωσης είναι χαρακτηριστικά ο καρκίνος¹⁸⁰ και τα αυτοάνοσα νοσήματα (λόγω ελαττωματικής απομάκρυνσης αυτο-δραστικών κλώνων),^{181,182} ενώ με την επίταση της απόπτωσης είναι το AIDS,¹⁸³ νευροεκφυλιστικά νοσήματα,^{184, 185} νόσοι του αιμοποιητικού ιστού,¹⁸⁰ καθώς και νοσήματα του ήπατος τόσο οξεία (π.χ., η οξεία ηπατική ανεπάρκεια), όσο και χρόνια (π.χ., η αλκοολική και η μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, καθώς και οι χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες).^{186,187,188}

2.3.1 Νεοπλασίες

Είναι αποδεδειγμένο τόσο στους συμπαγείς όγκους όσο και στις αιματολογικές νεοπλασίες ότι τα κακοήθη κύτταρα παρουσιάζουν διαταραχές στην επαγωγή της απόπτωσης.^{180,189,190,191,192,193,194} Με κακοήθη εκφυλισμό έχουν συνδεθεί μεταλλάξεις, απενεργοποίηση και ελαττωματική ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, όπως το p53,^{190,191,194} το ras¹⁹⁵ και το c-myc,^{196,197,198} ή και με τη ρύθμιση της απόπτωσης. Επιπρόσθετα, γονίδια, όπως το bcl-2, έχουν διαφοροποιημένη έκφραση σε καρκινικά κύτταρα που αποτελεί προγνωστικό παράγοντα δυσμενούς πρόγνωσης σε διάφορες νεοπλασίες, όπως το νευροβλάστωμα¹⁸⁰ και ο καρκίνος του προστάτη¹⁸⁰ και του παχέος εντέρου.^{189,190} Η σημασία της απορρύθμισης της απόπτωσης στις νεοπλασίες φαίνεται από το γεγονός ότι πολλές αντινεοπλασματικές θεραπείες επάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων.¹⁸⁰

2.3.2 Αυτοανοσία

Ένα κοινό χαρακτηριστικό των αυτοάνοσων νοσημάτων είναι η ελαττωματική ανοχή σε αυτοαντιγόνα και η ακόλουθη παραγωγή αυτο-αντισωμάτων. Η ομοίωση και η διατήρηση της ανοχής εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την απόπτωση. Έχει προταθεί ότι κατά την απόπτωση ή και τη νέκρωση, τα αυτοαντιγόνα διασπώνται και τροποποιούνται εκθέτοντας νέους επιτόπους που αναγνωρίζονται από το ανοσιακό σύστημα. Ως εκ τούτου, η ελαττωματική ή καθυστερημένη κάθαρση, καθώς και η παρατεταμένη έκθεση σε αποπτωτικά ερεθίσματα μπορεί να οδηγήσει σε αυτοάνοσες απαντήσεις.

Σωρεία δεδομένων υποστηρίζουν ότι η ελαττωματική απόπτωση των ανοσοκυττάρων οδηγεί σε αυτοανοσία. Αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο συστηματικός ερυθρελαιώδης λύκος, συνδέονται με μεταλλάξεις σε γονίδια που καθιστούν τα λεμφοκύτταρα ανθεκτικά στην απόπτωση (όπως το *lpr* που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Fas στον ποντικό).¹⁹⁹ Βλάβες στο σηματοδοτικό μονοπάτι του Fas, όπως μεταλλάξεις των μορίων Fas, FasL και των κασπασών 8 και 10, οδηγούν σε αυτοάνοσο λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο στον άνθρωπο (autoimmune lymphoproliferative syndrome, ALPS) που χαρακτηρίζεται από καλοήγη λεμφοϋπερπλασία, αυτοανοσία και υψηλή συχνότητα εμφάνισης κακοήθειας.²⁰⁰

2.3.3 Νευροεκφυλιστικά νοσήματα

Μια μεγάλη ομάδα νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, μεταξύ των οποίων η νόσος του Alzheimer,²⁰¹ η νόσος του Πάρκινσον²⁰² και η μελαγχρωματική αμφιβληστροειδοπάθεια,²⁰³ συνδέονται με επιλεκτική απόπτωση των νευρώνων. Ο θάνατος των νευρώνων φαίνεται να σχετίζεται με την αυξημένη ευπάθεια αυτών των κυττάρων στην απόπτωση, ενώ ως επαγωγείς του φαινομένου έχουν ενοχοποιηθεί παράγοντες όπως το οξειδωτικό στρες, μιτοχονδριακές βλάβες, καθώς και νευροτοξικοί παράγοντες.^{201,202,203,204,205}

2.3.4 Ιογενείς λοιμώξεις

Οι ιοί μπορούν να αναπαραχθούν μόνο μέσα σε κύτταρα-ξενιστές τα οποία διαθέτουν διάφορους μηχανισμούς άμυνας για τον περιορισμό της ιογενούς λοίμωξης, όπως η δράση των μεσολαβητών της κυτταρικής ανοσίας, η φλεγμονή και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Ως εκ τούτου, οι ιοί έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές, είτε για να καθυστερούν και να αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο, είτε για να επάγουν απόπτωση διευκολύνοντας την ιϊκή εξάπλωση ή και το θάνατο μη μολυσμένων ανοσοκυττάρων.²⁰⁶

Οι μελέτες στον τομέα του κυτταρικού θανάτου έχουν διευκρινίσει πολλές πτυχές αυτής της θεμελιώδους διαδικασίας συμπεριλαμβανομένου του ρόλου της σε μια πλειάδα διαφορετικών νοσημάτων. Αναμένεται ότι τα επόμενα χρόνια θα εισέλθουν στην κλινική πρακτική περισσότερες προσεγγίσεις που βασίζονται στον έλεγχο των διαφόρων μορφών του κυτταρικού θανάτου. Ωστόσο, θα πρέπει να επιλυθούν πολλά προβλήματα, όπως η ενεργοποίηση εναλλακτικών οδών θανάτου, όταν η θεραπευτική προσέγγιση απαιτεί τον αποκλεισμό συγκεκριμένων αποπτωτικών οδών, καθώς και ο παράπλευρος κυτταρικός θάνατος, σε θεραπείες που προσπαθούν να εξαλείψουν παθολογικά κύτταρα, όπως στην περίπτωση των νεοπλασμάτων.

3. ΦΛΕΓΜΟΝΗ

3.1 Φλεγμονή και ιστική βλάβη

Η φλεγμονή είναι μια προσαρμοστική απάντηση του οργανισμού που αποσκοπεί στη διατήρηση της ομοιοστασίας του όταν αυτή διαταράσσεται από ποικίλου τύπου αίτια, όπως η λοίμωξη και η ιστική βλάβη.²⁰⁷ Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος σχετικά με την κατανόηση των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην οξεία φλεγμονώδη απάντηση στη λοίμωξη και, σε μικρότερο βαθμό, στην ιστική βλάβη. Από την άλλη μεριά, πολύ λιγότερα είναι γνωστά για τα αίτια και τους μηχανισμούς που οδηγούν σε εντοπισμένη χρόνια φλεγμονή (ειδικά σε χρόνιες λοιμώξεις και αυτοάνοσα νοσήματα), καθώς και σε συστηματική χρόνια φλεγμονή (αναφερόμενη τα τελευταία χρόνια στη βιβλιογραφία ως «παρα-φλεγμονή» ή «μεταφλεγμονή»), η οποία εμφανίζεται σε μια ευρεία ποικιλία νοσημάτων (όπως, ο διαβήτης τύπου 2 και οι καρδιαγγειακές παθήσεις). Επιπλέον, η χρόνια συστηματική φλεγμονή δε φαίνεται να προκαλείται από τους κλασικούς υποκινητές της φλεγμονής (π.χ., λοίμωξη και τραυματισμός) αλλά φαίνεται να συνδέεται με διαταραχές των ομοιοστατικών μηχανισμών που οδηγούν σε δυσλειτουργία του ιστού (**Εικ. 5**).^{207,208}



Εικ.5 Αίτια, φυσιολογικός ρόλος και παθολογικές καταστάσεις σχετιζόμενες με τη φλεγμονή. [Τροποποίηση από: Medzhitov R, Nature. 2008; 454: 428-435]

Η οξεία φλεγμονή χαρακτηρίζεται από την απελευθέρωση πλάσματος και κυτταρικών στοιχείων του αίματος μέσα στον εξωκυττάριο ιστό. Με την εξαγγείωση του πλάσματος επιτυγχάνεται η αραιώση των τοξικών ουσιών και η αύξηση της λεμφικής ροής. Αυτή η αντίδραση πυροδοτείται αρχικά, ειδικά στις περιπτώσεις μικροβιακών λοιμώξεων, από την ενεργοποίηση υποδοχέων της φυσικής ανοσίας, όπως οι TLRs (Toll-like receptors) και NLRs [nucleotide-binding oligomerization-domain protein (NOD)-like receptors].²⁰⁹

Η «αναγνώριση» της λοίμωξης από ιστικά μακροφάγα και σιτευτικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση κυτταροκινών, χημειοκινών, αγγειοενεργητικών αμινών και πρωτεολυτικών προϊόντων διάσπασης που δρουν ως μεσολαβητές της φλεγμονής. Η δράση των παραπάνω μορίων οδηγεί στην τοπική εξαγγείωση πρωτεϊνών του πλάσματος και κυρίως ουδετεροφίλων. Ακολούθως, τα ουδετερόφιλα ενεργοποιούνται και απελευθερώνουν τα τοξικά συστατικά των κοκκίων τους, όπως ενεργείς ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και αζώτου, πρωτεϊνάση 3, καθεψίνη G και ελαστάση, με σκοπό να εξαλείψουν τα παθογόνα. Η δράση των στοιχείων της φλεγμονώδους αντίδρασης συνεπάγεται την καταστροφή των λοιμογόνων παραγόντων, την κάθαρση των ιστών από τα νεκρωτικά υπολείμματα και την απελευθέρωση κυτταροκινών με κινητοποίηση των μηχανισμών της επούλωσης. Ωστόσο, αδυνατούν να διακρίνουν μεταξύ παθογόνων και «ίδιων» κυττάρων προκαλώντας παράπλευρη βλάβη φυσιολογικού ιστού.^{207,209}

Μια φλεγμονώδης αντίδραση εξυπηρετεί τρεις σημαντικούς σκοπούς: α) *την εξάλειψη των παθογόνων*, β) *την επιδιόρθωση* και γ) *την αποκατάσταση του προσβεβλημένου ιστού*. Οι στόχοι αυτοί επιτυγχάνονται μέσω της συμμετοχής μορίων που παράγονται από τα μακροφάγα και ξεκινούν τη διαδικασία επιδιόρθωσης του ιστού, όπως οι λιποξίνες (lipoxins), οι resolvins και οι protectins (λιπίδια με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες), αλλά και κυτταροκίνες όπως ο TGF-β. Στην περίπτωση που η οξεία φλεγμονώδης αντίδραση δεν επιτύχει την κάθαρση των ιστών ή αποτύχει να αποκαταστήσει την ιστική βλάβη, παρατηρείται παγίωσή της, που μπορεί να οδηγήσει σε δημιουργία κοκκιωμάτων (από μακροφάγα που περιχαρακώνουν τα παθογόνα), ή σε δημιουργία τριτογενών λεμφικών σχηματισμών (με παρουσία διήθησης από λεμφοκύτταρα, που μπορεί να περιλαμβάνει ακόμη και αντιδράσεις βλαστικών κέντρων), ανάλογα με το αίτιο που την προκαλεί.^{207,208, 210} Μολονότι, λοιπόν, η φλεγμονή αποτελεί έναν προστατευτικό μηχανισμό με ευεργετικές δράσεις βοηθώντας στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων και άλλων βλαπτικών ερεθισμάτων, η απορρύθμισή της μπορεί να αποβεί ιδιαίτερα επιβλαβής (όπως στις περιπτώσεις σηπτικού shock).

Θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι κάθε παθολογική φλεγμονώδης κατάσταση έχει έναν αρχικό φυσιολογικό σκοπό. Ωστόσο, κάτι τέτοιο είναι εμφανές

μόνο στην περίπτωση των λοιμώξεων κι αυτό γιατί σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις και νοσήματα που χαρακτηρίζονται από χρόνια εντοπισμένη ή συστηματική φλεγμονή, δεν είναι γνωστό αν συμβαίνει πάντα μετάβαση από οξεία μη-αντιρροπούμενη σε χρόνια φλεγμονή, μιας και οι υποκείμενοι παθογενετικοί μηχανισμοί είναι εν πολλοίς άγνωστοι. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα χαρακτηριστικά της χρόνιας φλεγμονής ποικίλουν ανάλογα με το αίτιο και το είδος των T-κυττάρων που διηθούν την περιοχή (ιστό ή όργανο).^{207,208}

Η κατανόηση, λοιπόν, εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μηχανισμών και οδών που εμπλέκονται στην χρόνια φλεγμονή θα μπορούσε να βοηθήσει στην κατανόηση της παθογένειας ποικίλων νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από αυτήν και να αναδείξει μόρια και μηχανισμούς υποκείμενους σε θεραπευτικές παρεμβάσεις.

3.2 Φλεγμονή και ανοσορρύθμιση

Σε καταστάσεις αδυναμίας της ιστικής κάθαρσης ή της αποκατάστασης της ιστικής βλάβης και συνακόλουθης χρόνιας φλεγμονής ενεργοποιούνται **ανοσορρυθμιστικοί μηχανισμοί** με στόχο τον περιορισμό της μη-ελεγχόμενης φλεγμονώδους αντίδρασης. Μεταξύ αυτών των μηχανισμών περιλαμβάνεται η **έκκριση κυτταροκινών** με αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες (όπως, η IL-10 και ο TGF-β) που εκκρίνονται τόσο από λεμφοκύτταρα, όσο και από κύτταρα του στρώματος (στην περιοχή της ιστικής βλάβης), καθώς και η **ενεργοποίηση ρυθμιστικών κυττάρων** ικανών να καταστέλλουν δραστικά λεμφοκύτταρα.^{211, 212} Ωστόσο, η δράση αυτών των μηχανισμών μπορεί να είναι επιζήμια για τον οργανισμό αφού μπορεί να αποτελέσει αίτιο διαταραχής της ιστικής ομοιόστασης και των μηχανισμών επιδιόρθωσης (με συνακόλουθη παθολογική ανάπτυξη ινώδους ιστού), ή ακόμα και ιστικής μεταπλασίας, που αποτελεί το αρχικό στάδιο της καρκινογένεσης.

Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να μελετάται ο ρόλος των ρυθμιστικών κυττάρων, ιδιαίτερος των Tregs, στη διαδικασία της χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης.^{211,212, 213} Η συσσώρευσή τους έχει ενοχοποιηθεί για την αδυναμία εξάλειψης των παθογόνων και τη συνακόλουθη χρονιότητα των λοιμώξεων.^{138, 214, 215, 216} Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες σε μοντέλα πειραματόζων υποστηρίζουν πως η απουσία αυτών των κυτταρικών πληθυσμών μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτες ανοσιακές απαντήσεις και καταστροφική αυτοάνοση φλεγμονώδη αντίδραση των ιστών.²¹⁷ Ως εκ τούτου, τα Tregs φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στον περιορισμό της μεσολαβούμενης από τις ανοσιακές απαντήσεις παθολογίας και στη διευκόλυνση της αποκατάστασης της φυσιολογικής λειτουργίας των οργάνων μετά από μια φλεγμονώδη αντίδραση.

3.3 Χρόνια φλεγμονή και ίνωση

Η επούλωση τραύματος είναι μια φυσιολογική διεργασία του οργανισμού, που απαιτεί τη σύνθεση και την αναδόμηση καλά οργανωμένου συνδετικού ιστού-κολλαγόνου. Η ίνωση αποτελεί τη «σκοτεινή πλευρά» της φυσιολογικής επιδιόρθωσης των ιστών η οποία, κάτω από ορισμένες συνθήκες, μπορεί να είναι μη-ελεγχόμενη, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ινώδους ιστού. Γενικά, η ίνωση επισυμβαίνει σε απάντηση χρόνιας φλεγμονής (εκτεταμένης ή επαναλαμβανόμενης ιστικής καταστροφής) και θεωρείται ως ανάρμοστη απάντηση στην ιστική βλάβη ή και ακατάλληλη επούλωση. Η συνεχιζόμενη χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση χαρακτηρίζεται από την αυξημένη παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (extracellular matrix, ECM), καθώς και από πολλαπλασιασμό, μετανάστευση και συσσώρευση μεσεγχυματικών κυττάρων και ινοβλαστών.²¹⁸ Παρά τις διαφορές που παρατηρούνται στις χρόνιες φλεγμονώδεις αντιδράσεις σε διαφορετικά όργανα (π.χ. αιτιολογία), υπάρχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά, όπως οι σοβαρές περιοδικές κρίσεις επιδείνωσης και ύφεσης της φλεγμονώδους αντίδρασης, η μετανάστευση στην περιοχή φλεγμονωδών κυττάρων (μακροφάγων, κοκκιοκυττάρων και T-κυττάρων) και η αυξημένη παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών. Συνέπεια των παραπάνω διαδικασιών είναι ο πολλαπλασιασμός ινοβλαστών στην περιοχή της χρόνιας φλεγμονής και η ακόλουθη διαφοροποίησή τους σε μυοϊνοβλάστες (μέσω της αλληλεπίδρασης με επιθηλιακά κύτταρα) με αποτέλεσμα την «άστοχη» αντίδραση επούλωσης τραύματος.²¹⁸ Με το χρόνο, οι μεταβολές αυτές επιφέρουν εκτεταμένη ιστική αναδιοργάνωση και αντικατάσταση του φυσιολογικού παρεγχύματος από ινώδη ιστό. Παρά την ικανότητα ύφεσης της φλεγμονώδους αντίδρασης, η ανάπτυξη ινώδους ιστού με την επακόλουθη παραμόρφωση της αρχιτεκτονικής του έχει ως συνέπεια την εμφάνιση διαταραχών της λειτουργικότητας του προσβεβληθέντος οργάνου, που μπορεί να προκαλέσει έως και την ολοκληρωτική ανεπάρκειά του.²¹⁸

Οι μυοϊνοβλάστες αποτελούν κύτταρα-κλειδιά στη διαδικασία της ίνωσης αφού όταν ενεργοποιηθούν παράγουν κολλαγόνο και είναι υπεύθυνοι για την υπέρμετρη εναπόθεση συστατικών της ECM, που οδηγεί σε μείωση ή απώλεια της λειτουργίας του οργάνου στην περιοχή της φλεγμονής. Η αντικατάσταση των ινοβλαστών από τους μυοϊνοβλάστες συμβαίνει επειδή ο ρυθμός παραγωγής κολλαγόνου από τους ινοβλάστες είναι πολύ αργός και δε θα μπορούσε να καλύψει τις ανάγκες μιας διαδικασίας όπως η επούλωση τραύματος.²¹⁹ Ο μηχανισμός μετατροπής των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί αλλά πιθανούς βασικούς μεσολαβητές αυτής της διαδικασίας φαίνεται να αποτελούν ο TGF-β1 και ο αυξητικός παράγοντας του συνδετικού ιστού (connective tissue growth factor,

CTGF).²¹⁸ Η έκφραση του CTGF, που οφείλεται στη δράση του TGF-β1, φαίνεται να επάγεται μέσω των Smads και κυρίως του Smad3. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα ενοχοποιούν την ενεργοποίηση του μονοπατιού Rho/ROCK για την επαγόμενη από τον TGF-β1 ινωτική διαδικασία.^{218,220,221} Επιπροσθέτως, η αυξημένη έκφραση του κολλαγόνου α1 (ή τύπου IV) και της φιβρονεκτίνης, λόγω της δράσης των μορίων TGF-β1 και CTGF, επάγει την ινωτική διαδικασία.²²²

Παράλληλα, ο TGF-β1 είναι η κύρια κυτταροκίνη που συμμετέχει στην *in vivo* και *in vitro* μετατροπή των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (epithelial-mesenchymal transition, EMT) κατά τη διάρκεια μιας χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης.^{223,224} Η μετατροπή αυτή προκαλεί αντικατάσταση του φαινοτύπου των επιθηλιακών κυττάρων από φαινότυπο μεσεγχυματικών κυττάρων, με χαρακτηριστική μείωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων, εμφάνιση μορφολογίας ινοβλαστών και μειωμένη κινητικότητα.

Στην ινωτική διαδικασία, εκτός του TGF-β1, φαίνεται να συμμετέχουν και άλλες κυτταροκίνες, όπως η IL-1,²²⁵ ο TNF-α²²⁶ και οι PDGFs.²²⁷ Ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις το τελικό αποτέλεσμα της ινωτικής διαδικασίας είναι η αυξημένη έκφραση γονιδίων του κολλαγόνου (I-IV) και φιβρονεκτίνης.

3.4 Τα ηπατικά νοσήματα ως μοντέλο μελέτης της χρόνιας φλεγμονής

3.4.1. Γενικές αρχές

Ιογενείς λοιμώξεις

Οι χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες Β (χρόνια ηπατίτιδα Β, ΧΗΒ) και C (χρόνια ηπατίτιδα C, ΧΗC), η μη αλκοολική ηπατίτιδα και στεατοηπατίτιδα, καθώς και οι ηπατίτιδες αυτοάνοσης αιτιολογίας, η φυσική πορεία των οποίων περιλαμβάνει και την εξέλιξη προς κίρρωση του ήπατος και ηπατοκυτταρικό καρκίνο, αποτελούν σημαντικά προβλήματα της δημόσιας υγείας με πολλές κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις.^{228,229}

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτιμά ότι 2 περίπου δισ. άτομα έχουν προσβληθεί από τον ιό της ηπατίτιδας Β (hepatitis B virus, HBV) και ότι υπάρχουν περίπου 350 εκατομμύρια χρόνιαι φορείς του ιού Β, το 1/3 των οποίων θα οδηγηθεί σε χρόνια ηπατική νόσο (χρόνια ηπατίτιδα και κίρρωση) και σπανίως σε πρωτοπαθή ηπατοκυτταρικό καρκίνο.²²⁸ Όσον αφορά τη λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C (hepatitis C virus, HCV), αποτελεί την αιτία του 70% των περιπτώσεων χρόνιας ηπατίτιδας, του 40% των περιπτώσεων κίρρωσης τελικού σταδίου, του 60% των

περιπτώσεων ηπατοκυτταρικού καρκίνου και του 30% των περιπτώσεων μεταμοσχεύσεων ήπατος. Υπολογίζεται ότι ο επιπολασμός της είναι σημαντικός (0,5-4%) στο γενικό πληθυσμό, ενώ η νοσηρότητα και η θνητότητα από τη λοίμωξη αναμένεται να αυξηθεί σημαντικά τις δύο επόμενες δεκαετίες.^{229,230}

Η **XHB** εκτός από ποικίλες εκδηλώσεις και ευρήματα παρουσιάζει και σημαντικές διαφορές στην εξέλιξη και στην πρόγνωση. Η πορεία της νόσου φαίνεται να καθορίζεται από αλληλεπιδράσεις παραγόντων του ξενιστή με παράγοντες του ιού. Η φυσική πορεία της λοίμωξης καθορίζεται από τη βιοχημική, ιστολογική, ορολογική και ιολογική εικόνα του ασθενούς και χωρίζεται σε 4 φάσεις: α) *ανοχής*, β) *ορομετατροπής*, γ) *ενσωμάτωσης* και δ) *ενεργοποίησης*, ενώ η εξέλιξή της, που διαρκεί από λίγα έτη έως και αρκετές δεκαετίες, έχει τροποποιηθεί λόγω αποτελεσματικών αντι-ϊικών θεραπευτικών παρεμβάσεων.²³¹ Η θεραπεία της ΧΗΒ έχει ως βάση την χρήση της ιντερφερόνης-α (IFN-α) που τα τελευταία χρόνια έχει αντικατασταθεί από τη μακράς διάρκειας δράσης πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη-α (pegylated IFN-α, Peg-IFN-α).²²⁸ Επιπρόσθετα, η έρευνα για νέες αποτελεσματικότερες μορφές θεραπευτικής αντιμετώπισης της χρόνιας ΗΒV λοίμωξης προσανατολίσθηκε στη χρησιμοποίηση νουκλεοσιδικών αναλόγων (lamivudine, adefovir, entecavir, telbivudine, και tenofovir), τα οποία παρουσιάζουν λιγότερες παρενέργειες και αποτελούν ισχυρότερους αναστολείς του ιικού πολλαπλασιασμού από την IFN-α.²²⁸ Σύγχρονα επιστημονικά δεδομένα υποδεικνύουν την χρήση σε μελλοντικές μελέτες θεραπευτικού συνδυασμού αντι-ϊικών φαρμάκων επί μακρό χρονικό διάστημα, με αθροιστικές ή συνεργικές ιδιότητες όσον αφορά την αύξηση της αποτελεσματικότητας της αναστολής του ιικού πολλαπλασιασμού.²³² Η πιθανή αθροιστική ή και συνεργική αντι-ϊική δράση οδήγησε στο σχεδιασμό κλινικών μελετών του συνδυασμού σε διαφορετικές κατηγορίες ασθενών. Τα αποτελέσματα, παρά το γεγονός της παρόμοιας βιοχημικής και ιολογικής ανταπόκρισης σε θεραπείες καθορισμένου χρόνου (1 έτους), δεν είναι διαφορετικά και δεν είναι γνωστό αν είναι διακριτά όσον αφορά τη μοριακή βιολογία των διαβιβαστών της χρόνιας ηπατικής φλεγμονής και ίνωσης.^{228,233}

Από την άλλη, η **XHC** είναι μια σύνθετη ιογενής ηπατοπάθεια με μηχανισμούς παθογένεσης και εξέλιξης της χρόνιας φλεγμονής που χρήζουν περαιτέρω κατανόησης.^{230, 234} Ωστόσο, κύριο ρόλο στην καταστροφή των ηπατοκυττάρων φαίνεται ότι διαδραματίζει η ανοσιακή αντίδραση του ξενιστή. Παράλληλα, το ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται στη μελέτη ενδοκυτταρικών φαινομένων μοριακής αλληλεπίδρασης του HCV με τα ηπατοκύτταρα, φαινομένων αυξημένης απόπτωσης/νέκρωσης, καθώς και στη συμμετοχή κυτταροκινών (όπως ο TGF-β1).^{230,234} Επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταδείξει διαφορές στην εξέλιξη του

σταδίου της χρόνιας φλεγμονής των ασθενών με ΧΗC που κυμαίνεται από βραδέως εξελισσόμενη έως ταχέως εξελισσόμενη ίνωση.^{230,234} Η σύγχρονη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C βασίζεται στη συνδυασμένη χορήγηση IFN-α και ριμπαβιρίνης.^{230,235} Η μακροχρόνια ιολογική ανταπόκριση στη θεραπεία ορίζεται ως η απουσία ανίχνευσης του HCV-RNA στον ορό 6 μήνες μετά τη διακοπή της θεραπείας, που στο 90% των περιπτώσεων είναι διαρκούσα. Είναι το μόνο θεραπευτικό αποτέλεσμα που κατά γενική παραδοχή επιφέρει θετική για τους ασθενείς τροποποίηση της φυσικής ιστορίας και βελτίωση της πρόγνωσης της χρόνιας ηπατίτιδας C. Αν και οι παραπάνω θεραπευτικές παρεμβάσεις έχουν αλλάξει σημαντικά τη φυσική πορεία των χρόνιων λοιμώξεων από τους ιούς HBV και HCV, ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών δεν παρουσιάζει κανένα όφελος από τις παραπάνω θεραπείες με αποτέλεσμα την περαιτέρω εξέλιξη της νόσου.

Μη αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος

Η μη αλκοολική λιπώδης διήθηση ήπατος (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) ή απλή στεάτωση ή λιπώδες ήπαρ αποτελεί τη συχνότερη αιτία διαταραχής της ηπατικής λειτουργίας επηρεάζοντας μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού.²³⁶ Η NAFLD ορίζεται ως η συσσώρευση λίπους υπό μορφή μεγάλων φυσαλίδων μέσα στο κυτταρόπλασμα των ηπατικών κυττάρων, σε αναλογία πάνω από το 5%-10% του βάρους του ήπατος. Πρόκειται για ένα σύνδρομο με ευρύ φάσμα κλινικών και ιστολογικών εκδηλώσεων που παρουσιάζεται σε άτομα με παράγοντες του μεταβολικού συνδρόμου (κεντρική παχυσαρκία, σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, υπερλιπιδαιμία και αρτηριακή υπέρταση).²³⁶ Στα αρχικά στάδια της NAFLD, στα οποία αρχίζει και η συσσώρευση λιπώδους ιστού στο ήπαρ, δεν υπάρχουν κλινικά συμπτώματα και ιστολογικά έχουμε την απλή μακροφυσαλιδώδη ηπατική στεάτωση. Επιβεβαίωση της διάγνωσης γίνεται με απεικονιστικές τεχνικές (υπερηχογράφημα, αξονική τομογραφία), ωστόσο, η σταδιοποίηση της νόσου απαιτεί βιοψία ήπατος.²³⁷ Στα προχωρημένα όμως στάδια κυριαρχεί ιστολογικά η παρουσία της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) που χαρακτηρίζεται, εκτός από την μεγαλοφυσαλιδώδη ηπατική στεάτωση και τη λοβιδιακή φλεγμονή, από: α) *κυστική εκφύλιση* (ballooning degeneration) των ηπατοκυττάρων της ζώνης III του ηπατικού λοβίου, β) *παρουσία σωματίων υαλίνης Mallory* και γ) *περικολποειδική ίνωση* (perisinusoidal fibrosis).²³⁸

Τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι η NAFLD δεν αποτελεί απλώς δείκτη, αλλά παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου. Επιπλέον, το 10% των περιπτώσεων στεάτωσης εξελίσσεται σε NASH και το 35% των περιπτώσεων NASH εξελίσσεται σε ηπατική ίνωση.^{236,239} Εξ αυτών, το 15% αναπτύσσει κίρρωση, ηπατική ανεπάρκεια και τελικά ηπατοκυτταρικό καρκίνο (σε

μικρότερο, βέβαια, ποσοστό από τους ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα).^{236,239} Σε πολυετή μελέτη παρακολούθησης, το 50% των ατόμων με NAFLD δεν παρουσίασε καμία εξέλιξη της ηπατικής βλάβης, το 4% παρουσίασε βελτίωση και το 27% ανέπτυξε ίνωση, από το οποίο το 19% κατέληξε σε κίρρωση.^{240,241} Τα άτομα που έχουν κλινικά μόνο στεάτωση έχουν καλύτερη πρόγνωση, ενώ παράγοντες κινδύνου εξέλιξης προς κίρρωση αποτελούν η παχυσαρκία και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2. Ως εκ τούτου, και στα πλαίσια της έλλειψης ειδικής θεραπείας που να στοχεύει αποκλειστικά στην NAFLD, η θεραπευτική αντιμετώπιση περιλαμβάνει τη θεραπεία των επιμέρους παραγόντων κινδύνου (όπως της παχυσαρκίας, της υπερλιπιδαιμίας, του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, καθώς και του κοινού παρονομαστή αυτών που είναι η αντίσταση στην ινσουλίνη).^{240,241} Φάρμακα όπως η μετφορμίνη και τα νεότερα, όπως οι θειαζολινεδιόνες (αγωνιστές PPAR-γ) που μειώνουν την αντίσταση στην ινσουλίνη, φαίνεται να μειώνουν τις τρανσαμινάσες χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνουν και την ιστολογική εικόνα.^{242,243} Ειδικά οι θειαζολινεδιόνες φαίνεται να δρουν επιπλέον στην μείωση της ενεργοποίησης των αστεροειδών κυττάρων, γεγονός που υποδεικνύει πιθανά σημαντικά πλεονεκτήματα όσον αφορά την ίνωση στη NASH.

Αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα

Τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος είναι οργανοειδικά, χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα αγνώστου αιτιολογίας με παθογένεια που οφείλεται σε αυτοάνοση απάντηση έναντι ηπατικών κυττάρων-στόχων (ηπατοκύτταρα ή χολαγγειοκύτταρα) σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα. Η **αυτοάνοση ηπατίτιδα** (AH) και η **πρωτοπαθής χολική κίρρωση** (primary biliary cirrhosis, PBC) είναι δύο από τα συχνότερα αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα, ωστόσο, αρκετά συχνά στην κλινική πράξη παρατηρούνται και σύνδρομα επικάλυψης (overlap syndromes), καθώς και οριακές μορφές (outlier syndromes) των παραπάνω νοσημάτων.^{244, 245} Η AH οφείλεται σε διαταραχές της ικανότητας αυτο-ανοχής (self-tolerance) του ανοσιακού συστήματος που οδηγεί στην υπέρμετρη αυτο-ενεργοποίηση ανοσιακών μηχανισμών. Συγκεκριμένα, κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (cytotoxic T lymphocytes, CTLs) διηθούν το ήπαρ και στρέφονται έναντι φυσιολογικών ηπατοκυττάρων που εκφράζουν επιτόπους έναντι των οποίων τα λεμφοκύτταρα έχουν ευαισθητοποιηθεί, με αποτέλεσμα την πρόκληση χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης στο ήπαρ και νέκρωση των ηπατοκυττάρων. Η AH προσβάλλει όλες τις ηλικιακές ομάδες και μπορεί να υποδιαγιγνώσκεται σε ηλικιωμένα άτομα. Οι ασυμπτωματικοί ασθενείς έχουν κατά κανόνα ήπια νόσο, ωστόσο η πλειονότητα των ασθενών θα αναπτύξει ίνωση και κίρρωση του ήπατος. Η ανοσοκατασταλτική αγωγή (πρεδνιζόνη μόνη της

ή σε συνδυασμό με αζαθειοπρίμη) που φαίνεται να μειώνει και την ηπατική ίνωση, αποτελεί τη θεραπεία πρώτης επιλογής για αυτούς τους αρρώστους.²⁴⁴

Η PBC αποτελεί χρόνια χολοστατική νόσο του ήπατος που προσβάλλει κυρίως γυναίκες μέσης ηλικίας και χαρακτηρίζεται από προοδευτική καταστροφή των ενδοηπατικών χοληφόρων. Αν και η ακριβής αιτιοπαθογένεια της PBC παραμένει άγνωστη, η γενετική προδιάθεση, καθώς και διαταραχές της χυμικής και κυτταρικής ανοσίας φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου. Η PBC ακολουθεί μια εξελικτική πορεία χωρίς αυτόματες υφέσεις που οδηγεί σε ηπατοκυτταρική βλάβη (πιθανά από τη δράση των χολικών οξέων) και στη χαρακτηριστική χολικού τύπου διαβρωτική νέκρωση, πυλαία ίνωση και κίρρωση. Όπως και στην ΑΗ, οι ασυμπτωματικοί ασθενείς παρουσιάζουν καλύτερη πορεία (μέση επιβίωση 16 έτη) από τους συμπτωματικούς (μέση επιβίωση 6-8 χρόνια, χωρίς μεταμόσχευση). Ειδική θεραπεία για την PBC δεν υπάρχει και η θεραπευτική αντιμετώπιση είναι συμπτωματική σκοπεύοντας στην ανακούφιση των ασθενών από τα συμπτώματα και τις επιπλοκές της νόσου (όπως αδυναμία, κνησμό, ίκτερο, οστική νόσο/οστεοπόρωση και συνοδά αυτοάνοσα νοσήματα). Τα φάρμακα που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα στην αντιμετώπιση του νοσήματος είναι το αρκτοδεοξυχολικό οξύ (που αποτελεί τη μόνη εγκεκριμένη και ασφαλή θεραπεία, έως τώρα), ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (όπως, η μεθοτρεξάτη, τα κορτικοστεροειδή και η κυκλοσπορίνη) και αντι-ινωτικές αγωγές (D-πενικιλλαμίνη και κολχικίνη).²⁴⁵

3.4.2. Χρόνια ηπατική φλεγμονή, ανοσορρύθμιση και ίνωση

Στην οξεία ιογενή ηπατίτιδα η θανάτωση των προσβεβλημένων ηπατοκυττάρων και κατ' επέκταση η κάθαρση από τον ιό μεσολαβείται από τα CTLs. Ωστόσο, οι ιοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ανοσιακής διαφυγής με αποτέλεσμα την ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής στο ήπαρ σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών. Η ανοσιακή απάντηση του οργανισμού κατά την οξεία και τη χρόνια φλεγμονή διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του ιού. Συγκεκριμένα, στην HBV λοίμωξη οι αντι-ιϊκές κυτταροκίνες που παράγονται από τα CTLs αναστέλλουν τον κύκλο ζωής του ιού, ενώ στην περίπτωση της HCV λοίμωξης ο ιός ανοσοδιαφεύγει οδηγώντας σε χρονιότητα παρά την παρουσία έντονης CTL απάντησης.²⁴⁶ Στα αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα οι παθογενετικοί μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτοάνοση αντίδραση είναι άγνωστοι, ενώ στην περίπτωση της ΑΗ έχει προταθεί ότι ξένα αντιγόνα προσομοιάζουν με «ίδια» αντιγόνα (φαινόμενο μοριακής μίμησης) και πιθανώς ενεργοποιούν έναν ετερόκλητο αριθμό λεμφοκυττάρων πυροδοτώντας την

ανοσιακή απάντηση.²⁴⁴ Από την άλλη, ο ρόλος του ανοσιακού συστήματος κατά την παθογένεια και την εξέλιξη της NAFLD είναι εν πολλοίς άγνωστος.

Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι στα περισσότερα ηπατικά νοσήματα παρατηρείται απορρύθμιση των φυσιολογικών μηχανισμών της απόπτωσης. Μελέτες σε χρόνιες ιογενείς λοιμώξεις του ήπατος έχουν αρχίσει να αναδεικνύουν τον πιθανό διττό ρόλο των αποπτωτικών μηχανισμών, αφενός μεν στην πρόκληση ηπατικής βλάβης από το ανοσιακό σύστημα του οργανισμού, αφετέρου δε στη διαιώνιση αυτών των λοιμώξεων με την αντίσταση στην απόπτωση των μολυσμένων από ιό ηπατοκυττάρων. Μάλιστα, η αυξημένη απόπτωση των κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή βλάβη του ηπατικού ιστού, κάτι που καταδεικνύεται από την πρόκληση θανατηφόρας ηπατικής ανεπάρκειας σε ποντίκια μετά από πειραματική επαγωγή της απόπτωσης.²⁴⁷ Όπως προαναφέρθηκε, τα κύτταρα οδηγούνται σε αποπτωτικό θάνατο είτε λόγω δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων, είτε μέσω ενεργοποίησης επιφανειακών υποδοχέων θανάτου οδηγώντας στην ενεργοποίηση των κασπασών με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο.²⁴⁸ Η απόπτωση που παρατηρείται στο ήπαρ κατά τη διάρκεια των ιογενών λοιμώξεων οφείλεται στη δράση των CTLs που ενεργοποιούν μονοπάτια, όπως αυτό των Fas-FasL, του TNF-α και του συστήματος περφορίνης/κοκκιοενζύμων.^{187,249,250} Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ηπατοκύτταρα εκφράζουν Fas, TNF-R1, TRAIL-R1 και TRAIL-R2.²⁵⁰ Στις ΧΗΒ και ΧΗC, για παράδειγμα, τα CTLs που διηθούν το ήπαρ χρησιμοποιούν το συνδέτη FasL για να καθαίνουν τα μολυσμένα από τον ιό ηπατοκύτταρα, τα οποία εκφράζουν τον υποδοχέα Fas στην επιφάνειά τους («το φιλί του θανάτου» των T-κυττάρων).^{251,252,253} Πράγματι, διαγονιδιακά ποντίκια που εξέφραζαν στο ήπαρ τους είτε το HBsAg, είτε δομικές πρωτεΐνες του HCV εμφάνισαν ηπατική βλάβη έπειτα από μεταμόσχευση ειδικών για τον HBV ή τον HCV FasL⁺ CTLs.^{254,255} Στον άνθρωπο έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση του Fas σε βιοψίες ήπατος ασθενών με ΧΗΒ^{256, 257, 258} και ΧΗC^{258, 259, 260} συγκριτικά με φυσιολογικούς μάρτυρες. Επιπλέον τα επίπεδα του διαλυτού Fas στον ορό ασθενών με ΧΗΒ σχετίζονται με τον βαθμό ενεργού δραστηριότητας της νόσου.²⁶¹ Από την άλλη μεριά, έκφραση του FasL έχει περιγραφεί μόνο στον ηπατικό ιστό ασθενών με ΧΗΒ κι όχι σε φυσιολογικούς μάρτυρες, ενώ εντοπίζεται σε περιοχές διαβρωτικής νέκρωσης και στην περιφέρεια των κίρρωτικών όζων σε ανατομική γειτνίαση με περιοχές λεμφοκυτταρικών διηθήσεων.^{256, 262} Ενώ η σημασία της ενεργοποίησης των Fas και TNFR1 στην επαγωγή της απόπτωσης των ηπατοκυττάρων είναι καλά τεκμηριωμένη, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*,²⁵⁰ η πιθανή ηπατοτοξική δράση του TRAIL είναι μέχρι σήμερα αμφιλεγόμενη.²⁶³ Μελέτες καταδεικνύουν ότι κάποιες ιικές πρωτεΐνες συμβάλλουν κι αυτές στην επιβίωση του ιού και στη διαιώνιση της λοίμωξης αναστέλλοντας την απόπτωση,^{264,265,266} ενώ άλλες, όπως για παράδειγμα

η πρωτεΐνη X του ιού της ηπατίτιδας Β, επάγουν την απόπτωση των ηπατοκυττάρων.^{267, 268} Εντέλει, η ισορροπία μεταξύ αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών ερεθισμάτων καθορίζει την επιβίωση των μολυσμένων από ιό ηπατοκυττάρων. Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι διαταραχές της απόπτωσης, μπορεί να παρατηρηθούν κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης, όπως για παράδειγμα η απώλεια έκφρασης Fas από τα ηπατοκύτταρα, που οδηγεί σε διαφυγή από την κυτταροτοξική δράση των CTLs, επάγοντας την επιβίωση προ-νεοπλασματικών ηπατοκυττάρων.²⁶⁹

Είναι αξιοσημείωτο το αυξανόμενο ενδιαφέρον που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια σχετικά με το ρόλο των Tregs στην παθογένεια και την εξέλιξη της χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας. Έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση και συσσώρευση αυτών των κυττάρων κατά τη διάρκεια της ιογενούς ηπατικής φλεγμονής είναι αυτή που οδηγεί σε ανεπαρκή ανοσιακή απάντηση και χρονιότητα της φλεγμονής, λόγω εμμένουσας ιογενούς λοίμωξης. Σε αυτό συνηγορούν μελέτες που καταδεικνύουν αυξημένη έκφραση Foxp3 στο περιφερικό αίμα, καθώς και αυξημένη παρουσία ρυθμιστικών κυττάρων στον προσβεβλημένο ηπατικό ιστό, ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα.^{137,138} Ωστόσο, τα ευρήματα αυτά θα πρέπει να αντιμετωπιστούν με αρκετή επιφύλαξη, γιατί όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η απουσία των Tregs αποτελεί την αιτία ανεξέλεγκτων ανοσιακών απαντήσεων και γενικευμένης καταστροφικής αυτοάνοσης φλεγμονώδους αντίδρασης των ιστών.²¹⁷

Πρόσφατες μελέτες σε ένα μοντέλο ποντικών με ηπατική φλεγμονή προκαλούμενη από κονκαβαλαμίνη (Con-A) κατέδειξαν επιδείνωση της φλεγμονής μετά από μείωση των Foxp3⁺ Tregs και βελτίωσή της έπειτα από εξωγενή χορήγησή τους με έναν TGF-β-εξαρτώμενο τρόπο δράσης.²⁷⁰ Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν την πιθανή προστατευτική δράση της ανοσορρύθμισης κατά τη διάρκεια οξείας ή χρόνιας ηπατικής φλεγμονής. Από την άλλη μεριά, ο ρόλος της ανοσορρύθμισης και ειδικότερα των Tregs στην NAFLD, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω αποτελεί τη συχνότερη ηπατοπάθεια, δεν έχει μελετηθεί εκτενώς μέχρι σήμερα.

Σημαντικό ρόλο στην παθογένεια και την εξέλιξη της χρόνιας φλεγμονής διαδραματίζουν κυτταροκίνες της υπεροικογένειας του TGF-β οι οποίες συμμετέχουν σε ένα πλήθος φυσιολογικών λειτουργιών (π.χ., εμβρυογένεση, ομοίωση του ανοσιακού συστήματος, χημειοταξία, κτλ.), ενώ κατέχουν ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες. Μεταξύ αυτών, ο TGF-β1 εμφανίζει ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες, χαρακτηρίζει τα pTregs και έχει την ικανότητα να επάγει παροδικά την έκφραση Foxp3 *in vitro*. Παράλληλα, αποτελεί την κυτταροκίνη που επάγει τη διαδικασία επούλωσης τραύματος και σε παθολογικές

καταστάσεις, την ίνωση.^{213,218, 271, 272, 273} Σε καταστάσεις χρόνιας ηπατικής φλεγμονής, η υπερπαραγωγή του TGF-β1 έχει συσχετιστεί με μεγάλη εναπόθεση ινώδους ιστού που τελικά οδηγεί σε ίνωση και κίρρωση του ήπατος.²⁷³ Συγκεκριμένα, ο TGF-β1 ενεργοποιεί τα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος (hepatic stellate cells, HSCs) και αυξάνει την παραγωγή κολλαγόνου από αυτά,²⁷⁴ ενώ η υπερέκφρασή του σε διαγονιδιακά πειραματόζωα οδηγεί σε ίνωση στους νεφρούς, στο ήπαρ και στους πνεύμονες.²⁷⁵ Σήμερα, η αναστολή της οδού μετάδοσης σήματος του TGF-β αποτελεί μια ελπιδοφόρο προσέγγιση στη θεραπεία τόσο της ίνωσης/κίρρωσης, αλλά και του καρκίνου. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η επιτυχής θεραπεία ασθενών με ΧΗC ή με ΑΗ (με IFN-α και με πρεδνιζόνη, αντίστοιχα) συσχετίστηκε με μείωση των επιπέδων του TGF-β1 στον ορό.^{276, 277} Ωστόσο, έχει πρόσφατα προταθεί ότι για την επαγωγή χρόνιας ηπατικής νόσου και της καρκινογένεσης απαιτείται συνδυασμός της ενεργοποίησης του μονοπατιού του TGF-β με την απενεργοποίηση άλλων ενδοκυττάρων μονοπατιών (όπως των STAT5).²⁷⁸

Από τα παραπάνω γίνεται εύκολα αντιληπτή η κομβική σημασία της οδού μετάδοσης σήματος του TGF-β στην ανάπτυξη ίνωσης, την εξέλιξη των χρόνιων ηπατοπαθειών και την κίρρωση. Αν και η γνώση σχετικά με τη σηματοδότηση του TGF-β έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, η σημασία των διαφόρων κυτταροκινών της υπεροικογένειας, τόσο στην φυσιολογία όσο και στην νοσολογία της ίνωσης, δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένη, αφού σχεδόν αποκλειστικά από όλα τα μόρια έχει μελετηθεί ο TGF-β1. Ποια μέλη της οικογένειας του TGF-β, ποιοι υποδοχείς και ποια ενδοκυττάρια μόρια μεταγωγής σήματος παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη ίνωσης και τελικά κίρρωσης του ήπατος δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένο, ενώ δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα η σχέση της θεραπευτικής παρέμβασης (IFN-α, ριμπαβιρίνη και νουκλεοσιδικά ανάλογα) με τους ενδοκυττάρους μηχανισμούς ενεργοποίησης του TGF-β.

3.5 Η οστεοαρθρίτιδα ως μοντέλο μελέτης της χρόνιας φλεγμονής

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι η πιο συχνή μορφή αρθρίτιδας παγκοσμίως, μια σημαντική αιτία πόνου των αρθρώσεων και κινητικών δυσκολιών, καθώς και η πιο κοινή αιτία για ολική αρθροπλαστική του ισχίου και του γόνατος. Σε πρόσφατη πανελλήνια επιδημιολογική μελέτη για τις ρευματικές παθήσεις, βρέθηκε ότι η συμπτωματική ΟΑ των αρθρώσεων των άνω και κάτω άκρων έχει σημαντικές δυσμενείς επιπτώσεις στο κοινωνικό σύνολο και στην εθνική οικονομία της Ελλάδος, αφού είναι το τρίτο κατά σειρά συχνότητας αίτιο μακροχρόνιας λειτουργικής

ανικανότητας, μετά από την ομάδα των υπολοίπων ρευματικών παθήσεων και την ομάδα των καρδιαγγειακών παθήσεων.²⁷⁹ Στη χώρα μας, ο συνολικός επιπολασμός της συμπτωματικής ΟΑ, που αφορά τις αρθρώσεις τόσο των άνω και κάτω άκρων όσο και της σπονδυλικής στήλης, ανέρχεται στο 13,1% των ενηλίκων. Το νόσημα εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες, ενώ η συχνότητά του αυξάνει σημαντικά προϊούσης της ηλικίας. Από όλες τις εντοπίσεις της συμπτωματικής ΟΑ συχνότερη είναι η εκφυλιστική σπονδυλαρθροπάθεια (6,9%) και ακολουθούν η ΟΑ του γόνατος (6%), των άνω άκρων (2%) και του ισχίου (0,9%). Περίπου το 20% των ασθενών με συμπτωματική ΟΑ παρουσιάζουν δύο ή περισσότερες από τις παραπάνω εντοπίσεις.²⁸⁰

Τα τελευταία χρόνια, η προσοχή έχει στραφεί στο ρόλο της φλεγμονής του αρθρικού υμένα (synovitis) στην ΟΑ, μολονότι παραδοσιακά δε θεωρείται ως μία κλασική φλεγμονώδης αρθροπάθεια, λόγω της σχετικής έλλειψης ουδετερόφιλων στο αρθρικό υγρό και της έλλειψης συστηματικών εκδηλώσεων φλεγμονής. Ωστόσο, η ΟΑ συχνά συνδέεται με σημεία και συμπτώματα της φλεγμονής, όπως πόνο στις αρθρώσεις, οίδημα και δυσκαμψία που οδηγούν σε σημαντική δυσλειτουργία έως και αναπηρία.²⁸¹ Είναι πλέον γνωστό ότι η φλεγμονή του υμένα αποτελεί χαρακτηριστικό εύρημα, τόσο στην πρώιμη όσο και στην προχωρημένη ΟΑ, προσφέροντας ένα πιθανό θεραπευτικό στόχο. Μελέτες σε αρθρικό υμένα από τα γόνατα ασθενών με ΟΑ (που λαμβάνονται σε αρθροσκόπηση για τον πόνο στο γόνατο ή κατά την αντικατάσταση της άρθρωσης) έχουν καταδείξει βασικές αλλαγές στον υμένα, οι οποίες, αν και είναι πιο έντονες στα προχωρημένα στάδια, είναι παρούσες από τα πρώιμα στάδια του νοσήματος.^{282, 283} Αυτές οι βλάβες του αρθρικού υμένα περιλαμβάνουν: α) *υπερπλασία του υμένα*, β) *αυξημένη αγγειοβρίθεια* και γ) *διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων*. Η ιστολογία του αρθρικού υμένα εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα χαρακτηριστικών που κυμαίνεται από έντονη υπερπλασία της επενδυτικής στοιβάδας, με έντονη διήθηση κυττάρων (κυρίως λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων), έως υπερπλασία του αρθρικού υμένα με ινώδη ιστό.²⁸⁴ Η ίνωση του αρθρικού υμένα συναντάται συχνά στη ΟΑ και ιδιαίτερα στα προχωρημένα στάδια του νοσήματος.²⁸²

Παρά το γεγονός ότι εξακολουθεί να υπάρχει συζήτηση σχετικά με τον ουσιαστικό ρόλο της φλεγμονής του αρθρικού υμένα στην ΟΑ, η διήθηση του αρθρικού υγρού με ενεργοποιημένα Β- και Τ-λεμφοκύτταρα, καθώς και η υπερέκφραση φλεγμονωδών μεσολαβητών είναι κοινή, τόσο στα πρώιμα όσο και στα προχωρημένα στάδια της νόσου.²⁸⁵ Μελέτη σε 41 ασθενείς με ΟΑ που παρουσιάστηκαν με πόνο ή και οίδημα γόνατος κατέδειξε διήθηση από Β-κύτταρα στο ήμισυ των ασθενών.²⁸⁶ Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι ασθενείς με πρώιμη

ΟΑ εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα διήθησης από μονοκύτταρα στον αρθρικό υμένα συγκριτικά με ασθενείς με βαρύτερη νόσο, καθώς και υψηλότερη έκφραση φλεγμονωδών μεσολαβητών, συμπεριλαμβανομένης της IL-1, του TNF-α, του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor alpha, VEGF) και μορίων προσκόλλησης.²⁸⁵ Αυξημένη παραγωγή των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1α, IL-1β και TNF-α έχει περιγραφεί στον αρθρικό υμένα, τόσο σε ήπια, όσο και σε σοβαρή ΟΑ, ωστόσο οι κυτταροκίνες αυτές φαίνεται να αυξάνουν σημαντικά στη μέτρια και σοβαρή ΟΑ, πιθανά λόγω αύξησης των κυττάρων του στρώματος του αρθρικού υμένα.²⁸⁷ Υπάρχουν επίσης ενδείξεις για διήθηση και παρουσία ενεργοποιημένων T-κυττάρων, καθώς και παραγωγή Th1 κυτταροκινών (για παράδειγμα, IFN-γ) στον αρθρικό υμένα στην ΟΑ.²⁸⁸

Σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ΟΑ φαίνεται να διαδραματίζουν οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτταροκίνες που παράγονται από το φλεγμαινόντα αρθρικό υμένα και τα ενεργοποιημένα χονδροκύτταρα.^{281,287, 289} Αυτά τα μόρια μπορούν αρχικά να παράγονται από τον υμένα και έπειτα να διαχέονται μέσα στο χόνδρο μέσω του αρθρικού υγρού.²⁸¹ Κατά την τελευταία δεκαετία, *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι κυρίαρχο ρόλο μεταξύ των φλεγμονωδών και καταβολικών κυτταροκινών στην έναρξη και την εξέλιξη της βλάβης του αρθρικού χόνδρου στην ΟΑ κατέχουν η IL-1 και ο TNF-α.²⁸⁹ Αυτές οι κυτταροκίνες είναι ικανές να διεγείρουν την παραγωγή από τα χονδροκύτταρα μορίων (όπως, μεταλλοπρωτεϊνάσες, MMPs) που αποικοδομούν πρωτεΐνες της ECM και κολλαγόνο. Ακολούθως, τα χονδροκύτταρα παράγουν περαιτέρω IL-1, η οποία στη συνέχεια ενισχύει την περαιτέρω παραγωγή MMPs. Τα αυξημένα επίπεδα καταβολικών ενζύμων, προσταγλανδινών, οξειδίου του αζώτου (nitric oxide, NO) και άλλων δεικτών στο αρθρικό υγρό και τον ιστό στην ΟΑ φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα της IL-1 και του TNF-α.²⁸⁹ Επιπρόσθετα, παρατηρείται αύξηση της IL-6 κατά τη διάρκεια της αρθρικής φλεγμονής, ενώ παράγεται από κύτταρα του αρθρικού υμένα, οστεοβλάστες και χονδροκύτταρα και μπορεί να ανιχνευθεί στο αρθρικό υγρό σε δείγματα αρθρώσεων ασθενών με ΟΑ.²⁹⁰ Από τα παραπάνω μπορεί κανείς να συνάγει ότι ο ρόλος της φλεγμονής του αρθρικού υμένα στην ΟΑ, αν και εν πολλοίς αδιευκρίνιστος, είναι κομβικής σημασίας.

Κατά την τελευταία δεκαετία, η απόπτωση έχει αναγνωριστεί ως κρίσιμος παράγοντας υπεύθυνος για υποκυτταροβρίθεια στην ΟΑ. Μελέτες TUNEL *in situ* αλλά και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας περιγράφουν αυξημένα επίπεδα απόπτωσης χονδροκυττάρων στον πάσχοντα ιστό,^{291, 292, 293, 294} ενώ η σοβαρότητα του νοσήματος έχει συσχετιστεί με επίταση της αποπτωτικής διαδικασίας.^{295, 296, 297} Από την άλλη μεριά, μελέτες στον αρθρικό υμένα με ΟΑ δείχνουν ότι η απόπτωση που

μεσολαβείται από το σύστημα Fas/FasL δεν παρατηρείται, συνήθως, στα κύτταρα του ιστού.^{298,299} Ωστόσο, αυτά τα κύτταρα εκφράζουν Fas στην επιφάνειά τους, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορούν να γίνουν επιδεκτικά σε Fas-μεσολαβούμενη απόπτωση, ειδικά έπειτα από επίδραση με TNF-α.^{298,299,300} Εκτός από το σύστημα Fas/FasL, ο συνδέτης θανάτου TRAIL φαίνεται να συμμετέχει στην απόπτωση των κυττάρων του αρθρικού υμένα. Πρόσφατες μελέτες σε ζωικά μοντέλα με φλεγμονώδη αρθρίτιδα απέδειξαν ότι το TRAIL είναι ικανό να διεγείρει την απόπτωση στον υμένα και παράλληλα να προκαλεί μείωση της φλεγμονής, γεγονός που υποδηλώνει πιθανό αντιφλεγμονώδη ρόλο.^{301,302}

4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Δεδομένου του αδιευκρίνιστου ρόλου της ανοσορρύθμισης στην παθογένεση της χρόνιας φλεγμονής (διαφόρων ιστών και οργάνων), η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με στόχο να διερευνηθεί ο ρόλος της ανοσορρύθμισης στην επαγόμενη από την απόπτωση φλεγμονή. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η φλεγμονή που συνοδεύει τόσο τις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες όσο και άλλες αυτοδραστικής παθογενετικής βάσεως καταστάσεις (π.χ. αυτοανοσία, στεατοηπατίτιδες, φαρμακευτικές ηπατίτιδες, κλπ), καθώς και η άσηπτη μηχανική χρόνια φλεγμονή του αρθρικού υμένα που χαρακτηρίζει την οστεοαρθρίτιδα. Ειδικότερα, η παρούσα μελέτη επιχείρησε να διερευνήσει τη συσχέτιση (σε πρωτεϊνικό και μοριακό επίπεδο) των οδών της απόπτωσης και της φλεγμονής με τις ανοσορρυθμιστικές οδούς που εμπλέκονται στη λειτουργία των Tregs. Η μελέτη έγινε στο πλαίσιο του ενδιαφέροντος που υπάρχει παγκοσμίως σχετικά με την αποκάλυψη θεραπευτικών προσεγγίσεων με στόχο τα ρυθμιστικά κύτταρα (π.χ. μοριακή στόχευση του γονιδίου FOXP3).

Αναλυτικά, στην παρούσα διατριβή

1. μελετήθηκαν τα μόρια και τα ενδοκυττάρια μονοπάτια της απόπτωσης που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής σε σχέση με τη συσσώρευση ρυθμιστικών κυττάρων
2. αναζητήθηκαν πιθανές διαφοροποιήσεις στην έκφραση των παραπάνω μορίων ανάλογα με το αίτιο της ιστικής βλάβης
3. μελετήθηκε το αποτέλεσμα της θεραπευτικής αγωγής (αντι-ιική θεραπεία σε ασθενείς με ΧΗΒ) στη φλεγμονώδη διαδικασία στο ήπαρ και στους μηχανισμούς της ανοσορρύθμισης και της απόπτωσης
4. έγινε προσπάθεια επιβεβαίωσης των πιθανών σχέσεων της ανοσορρύθμισης με την επαγόμενη από απόπτωση φλεγμονή σε ένα δεύτερο μοντέλο ανθρώπινης φλεγμονής, όπως η φλεγμονώδης αρθρίτιδα που συνοδεύει την οστεοαρθρίτιδα του γόνατος και του ισχίου
5. τέλος, μελετήθηκε το μονοπάτι κυτταροκινών της υπεροικογένειας του TGF- β ($-\beta 1$, $-\beta 2$, $-\beta 3$) και των ακτιβινών, που σχετίζονται με σοβαρή φλεγμονή και ίνωση.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι, έλαβε την έγκριση της Επιτροπής Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και όλοι οι συμμετέχοντες παρείχαν την έγγραφη συγκατάθεσή τους.

1.1 Ασθενείς με Χρόνια Ηπατικά Νοσήματα

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν βιοπτικά δείγματα ήπατος 101 ασθενών με χρόνια ηπατικά νοσήματα. Ελήφθησαν βιοψίες ήπατος από 18 ασθενείς με ΧΗC και 61 ασθενείς με ΧΗΒ. Από τους ασθενείς με ΧΗΒ, οι 33 ήταν νεοδιαγνωσθέντες και αξιολογήθηκαν πριν από κάθε θεραπεία, 5 ανταποκρίθηκαν σε θεραπεία 48 εβδομάδων με Peg-IFNα2α ή αντι-ιικά φάρμακα και υποτροπίασαν μετά την απόσυρση της θεραπείας για 24 εβδομάδες, ενώ οι υπόλοιποι 23 βρίσκονταν σε συνεχή διατηρούμενη αντι-ϊική θεραπευτική απάντηση και ύφεση για διάστημα, τουλάχιστον 240 εβδομάδων (5 χρόνια) με εντεκαβίρη (entecavir). Όλοι οι ασθενείς είχαν HBV λοίμωξη γονοτύπου D και HBeAg-αρνητική χρόνια πάθηση, ενώ κανένας δεν παρουσίαζε ταυτόχρονη λοίμωξη με άλλους ιούς ηπατίτιδας (τύποι A, D και E) ή με τον ιό HIV (Human Immunodeficiency Virus).

Επιπλέον, συλλέχθηκαν βιοπτικά δείγματα από 12 ασθενείς με NAFLD, από 8 ασθενείς με αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα (4 με ΑΗ και κίρρωση και 4 με ΡΒC) και 2 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και ηπατοτοξικότητα σχετιζόμενη με τη λήψη μεθοτρεξάτης (methotrexate, MTX).

Κανένας από τους ασθενείς δεν ελάμβανε αντι-ϊική ή ανοσοτροποποιητική θεραπεία κατά τους τελευταίους 3 μήνες πριν από την δειγματοληψία του ήπατος, εκτός από τους 2 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα που λάμβαναν MTX. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ηπατικά νοσήματα παρατίθενται στον **Πίνακα 1**.

Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν βιοπτικά δείγματα (τα οποία ελήφθησαν για διαγνωστικούς λόγους) 8 ατόμων που υποβλήθηκαν σε βιοψία ήπατος λόγω ήπιας αύξησης των τρανσαμινασών αλλά χωρίς νεκρο-φλεγμονώδη στοιχεία και ιστολογία αρνητική για νόσο (**Πίνακας 1**).

Πίνακας 1. Κλινικά και ορολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με ηπατοπάθειες

	Φυσιολογικοί μάρτυρες	Χρόνια ηπατίτιδα Β			Χρόνια ηπατίτιδα C	NAFLD ^α	Αυτοάνοσες ηπατοπάθειες ^β	MTX-ηπατο- τοξικότητα ^γ
		Διάγνωση	Υποτροπή	Ύφεση				
<i>Αρ. δειγμάτων</i>	8	33	5	23	18	12	8	2
<i>Φύλο (Α/Θ)^δ</i>	5/3	15/18	3/2	18/5	14/4	7/5	2/6	0/2
<i>Ηλικία (δτ^ε, εύρος)</i>	58, 45-82	49, 24-64	49, 22-65	52, 23-73	40,9, 27-54	45, 21-71	57, 37-73	66, 60-72
<i>AST (U/μl)^{στ} (δτ^ε, εύρος)</i>	42, 36-45	48, 17-1969	97, 32-277	24, 15-51	45, 24-237	32, 19-70	49, 25-225	32,5, 24-41
<i>ALT (U/ml)^ζ (δτ^ε, εύρος)</i>	32, 21-48	58, 15-1478	102, 32-332	27, 15-49	75, 32-213	54, 15-141	41, 31-212	28,5, 17-40
<i>Βαθμός φλεγμονής^η</i>								
<i>I-0</i>	8	–	–	1	–	3	–	–
<i>I-1</i>	–	8	–	18	2	4	–	2
<i>I-2</i>	–	15	4	4	9	5	–	–
<i>I-3</i>	–	8	1	–	7	–	3	–
<i>I-4</i>	–	2	–	–	–	–	–	–
<i>Ίνωση^η (δτ^ε, εύρος)</i>	0	3, 0-6	4, 1-5	2, 0-4	3, 1-6	0,5, 0-2	6, 2-6	1, 1-1
<i>Βαθμός HAI (δτ^ε, εύρος)</i>		6, 2-15	8, 5-11	2, 0-7	7, 2-12	2, 0-5		
<i>Ίικό φορτίο (δτ^ε, εύρος)</i>		0,1 Meq/mL, 0,0016-699	0,1 Meq/mL, 0-44,5	0 Meq/mL, 0-0.008	0,7 Meq/mL, 0,10-6,25			

^α NAFLD: μη αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος, ^β Η ομάδα με τις αυτοάνοσες ηπατοπάθειες αποτελείται από 4 ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και 4 με πρωτοπαθή χολική κίρρωση, ^γ MTX-ηπατοτοξικότητα: ηπατοτοξικότητα σχετιζόμενη με τη λήψη μεθοτρεξάτης, ^δ Α: Άρρενες και Θ: Θήλειες, ^ε δτ: διάμεση τιμή, ^{στ} AST: ασπαραγινική τρανσαμινάση, ^ζ ALT: τρανσαμινάση της αλανίνης, ^η Ο βαθμός φλεγμονής (**I-0**: απουσία φλεγμονής, **I-1**: ελάχιστη φλεγμονή, **I-2**: ήπια φλεγμονή, **I-3**: μέτρια φλεγμονή, **I-4**: έντονη φλεγμονή) και ίνωσης αξιολογήθηκε όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και μεθοδολογία της Έρευνας- Ιστολογική εξέταση βιοψιών ήπατος»

Σε όλους τους ασθενείς με ηπατοπάθειες έγινε πλήρης κλινικοεργαστηριακός έλεγχος, ελήφθησαν κλινικές πληροφορίες και μετρήθηκαν βασικές εργαστηριακές παράμετροι, όπως οι τιμές της ασπαραγινικής τρανσαμινάσης (aspartate transaminase, AST) και της τρανσαμινάσης αλανίνης (alanine transaminase, ALT) (**Πίνακας 1**). Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν τα πακέτα δοκιμασιών bDNA V2.0 (Bayer, Siemens, PA, USA) και COBAS Amplicor (Roche Molecular Systems, NJ, USA) για τον προσδιορισμό του φορτίου του HBV DNA (προ θεραπείας) και του HCV RNA, αντίστοιχα. Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας των ασθενών με ΧΗΒ στο πέμπτο έτος περιελάμβανε τη βιοχημική ανταπόκριση με βάση τα φυσιολογικά επίπεδα της ALT και την πλήρη ιολογική ανταπόκριση που ορίζεται ως 169 αντίγραφα DNA του HBV/1 ml ορού (29 IU/ml), δηλαδή το κατώτερο όριο του ποσοτικού προσδιορισμού της δοκιμασίας COBAS Taqman (Roche Molecular Systems, NJ, USA), η οποία χρησιμοποιήθηκε λόγω της εξαιρετικά μεγάλης ευαισθησίας της.

Η κάθε βιοψία χωρίστηκε σε δύο κομμάτια. Το πρώτο χρησιμοποιήθηκε για την ιστοπαθολογική εξέταση, ενώ το δεύτερο αποθηκεύτηκε άμεσα σε βαθιά κατάψυξη (-80 °C) για να χρησιμοποιηθεί για τη μοριακή ή και την πρωτεϊνική ανάλυση. Μετά από την ιστολογική εξέταση προσδιορίστηκαν, σε κάθε περίπτωση, ο βαθμός ενεργού δραστηριότητας της φλεγμονής και το στάδιο της ίνωσης. Στους ασθενείς με ιογενή ηπατίτιδα, ο βαθμός ενεργού δραστηριότητας της φλεγμονής (HAI) και το στάδιο της ίνωσης (0-6) προσδιορίστηκαν ημιποσοτικά σύμφωνα με το τροποποιημένο σύστημα HAI³⁰³, ενώ στους ασθενείς με NAFLD, η νεκροφλεγμονώδης δραστηριότητα και το στάδιο της ίνωσης (0-4) προσδιορίστηκαν σύμφωνα με το σύστημα των Brunt και συν. (**Πίνακας 1**).³⁰⁴ Βάσει του βαθμού HAI οι ασθενείς κατατάχθηκαν στις ακόλουθες τέσσερις ομάδες:

I-0: απουσία φλεγμονής

I-1: ελάχιστη φλεγμονή (βαθμός HAI = 1-4 και ηπίου βαθμού φλεγμονή για τους ασθενείς με NAFLD)

I-2: ήπια φλεγμονή (βαθμός HAI = 5-8 και μετρίου I βαθμού φλεγμονή με ελάχιστη φλεγμονή στα πυλαία διαστήματα για τους ασθενείς με NAFLD)

I-3: μέτρια φλεγμονή (βαθμός HAI = 9-12 και μετρίου II βαθμού φλεγμονή με έντονη φλεγμονή στα πυλαία διαστήματα για τους ασθενείς με NAFLD)

I-4: σοβαρή φλεγμονή (βαθμός HAI = 13-18 και σοβαρού βαθμού φλεγμονή για τους ασθενείς με NAFLD)

Στην περίπτωση των ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα, ο βαθμός ενεργού δραστηριότητας της φλεγμονής και το στάδιο της ίνωσης προσδιορίστηκαν από μορφολογικά κριτήρια ίδια με αυτά των ασθενών με ιογενείς ηπατίτιδες και

κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα, ενώ για τους ασθενείς με MTX-ηπατοτοξικότητα ίσχυσαν κριτήρια όμοια με αυτά των ασθενών με NAFLD (**Πίνακας 1**). Ωστόσο, οι ασθενείς με PBC, δύο ασθενείς σταδίου I και δύο ασθενείς σταδίου III, σύμφωνα με τους Ludwig και συν.³⁰⁵ και Scheuer και συν.³⁰⁶, δεν ενσωματώθηκαν στις παραπάνω ομάδες, εξαιτίας των διαφορετικών παθολογικών ευρημάτων του νοσήματος.

1.2 Ασθενείς με Οστεοαρθρίτιδα

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 27 ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ), οι οποίοι υποβλήθηκαν σε πρωταρχική ολική αρθροπλαστική γόνατος (ΟΑΓ) ή ισχίου (ΟΑΙ) από την ομάδα χειρουργών στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Από τους 27 ασθενείς που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη, συλλέχθηκαν δείγματα αρθρικού υμένα από 21 άτομα με ΟΑΓ [1 Άνδρας (Α)/ 20 Γυναίκες (Γ)] και από 6 με ΟΑΙ (2Α/ 4Γ). Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών με ΟΑΓ ήταν τα 72 έτη (σταθερή διακύμανση: 6,4 έτη) και των ασθενών με ΟΑΙ τα 71 έτη (σταθερή διακύμανση: 5,9 έτη). Οι ασθενείς με ΟΑ χωρίστηκαν σε τρεις υποκατηγορίες με βάση τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά της άρθρωσης, δηλαδή σε ασθενείς με ατροφικό, φυσιολογικό και υπερτροφικό φαινότυπο οστεοαρθρίτιδας. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα 5 ασθενών με δευτεροπαθή ΟΑ λόγω τραύματος (μέση ηλικία: 85 έτη, σταθερή διακύμανση: 14 έτη). Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με αρθροπάθειες παρατίθενται στον **Πίνακα 2**.

Πίνακας 2. Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με αρθροπάθειες

	Φυσιολογικοί μάρτυρες	Οστεοαρθρίτιδα		
		Ατροφικός φαινότυπος	Φυσιολογικός φαινότυπος	Υπερτροφικός φαινότυπος
<i>Αρ. δειγμάτων</i>	5	5	16	6
<i>Φύλο (Α/Θ)^α</i>	3/2	0/5	3/13	0/6
<i>Ηλικία (δ^β, εύρος)</i>	85, 63-99	74, 72-76	74, 60-79	71, 65-86
<i>Γόνατος</i>		3	13	5
<i>Ισχίο</i>	5	2	3	1

^α Α: Άρρενες και Θ: Θήλειες, ^β δτ: διάμεση τιμή

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

2.1 Εκχύλιση RNA

Ολικό RNA απομονώθηκε από ηπατικό ιστό και αρθρικό υμένα με τη χρήση του μονοφασικού διαλύματος φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, TRIzol, ακολουθώντας τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας που συνοδεύουν το προϊόν. Κατά την ομογενοποίηση και τη λύση των δειγμάτων, το διάλυμα έχει την ικανότητα να διατηρεί την ακεραιότητα του RNA, ενώ διασπά τις μεμβράνες των κυττάρων και το εσωτερικό τους. Η προσθήκη χλωροφορμίου και η ακόλουθη φυγοκέντρηση διαχωρίζει τα δείγματα σε δύο φάσεις, μία ανόργανη και μία οργανική. Το RNA παραμένει στην ανόργανη φάση από όπου μπορεί να συλλεχθεί με τη χρήση ισοπροπανόλης και 75% αιθανόλης και αναδιάλυσης του ιζήματος σε νερό ελεύθερο RNAσών. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην εκχύλιση RNA παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**.

Τα βιοπτικά δείγματα ήταν αποθηκευμένα στους -80°C . Μόλις αποψύχθηκαν τοποθετήθηκαν απευθείας σε TRIzol και επεξεργάστηκαν με αποστειρωμένους πλαστικούς ομογενοποιητές, ισχυρή ανακίνηση του σωληναρίου για 30 sec και εισαγωγή του δείγματος 5 φορές μέσα από σύριγγα 21G. Το υλικό επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature; RT) για 5 min και ακολούθησε φυγοκέντρηση (12000 g; 10 min; 4°C) (Microcentrifuge 5417R, Eppendorf, Cat 0023733). Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο φυγοκέντρησης 1,5 ml ελεύθερου ριβονουκλεασών (RNAσών), τύπου eppendorf, και ακολούθησε προσθήκη 100 μL χλωροφορμίου. Τα δείγματα ανακινήθηκαν με αναστροφή του σωληναρίου και μετά από επώαση 8 min σε RT, φυγοκεντρήθηκαν σε συνθήκες όμοιες με τις προαναφερθείσες. Η υδάτινη φάση μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια και προστέθηκαν 500 μL ισοπροπανόλης. Ακολούθησε ανακίνηση των σωληναρίων για 10 sec, επώαση σε RT για 5 min και φυγοκέντρηση (12000 g; 8 min; 20°C). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 mL 75% αιθανόλης με αναστροφή των σωληναρίων. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (7600 g; 5 min; 4°C), το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα σωληνάρια παρέμειναν ανοικτά σε RT για μικρό χρονικό διάστημα, ώστε να εξατμιστεί η εναπομείνασα αιθανόλη. Προστέθηκαν 50 μL νερό ελεύθερο RNAσών και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας όλα τα δείγματα ποσοτικοποιήθηκαν. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του RNA και η εκτίμηση της καθαρότητάς του πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) από τις βάσεις των ριβονουκλεοτιδίων του σε μήκη κύματος 260 nm (OD260) και

280nm (OD280) σε φασματοφωτόμετρο (Bio Photometer, Eppendorf). Σε μήκος κύματος 260 nm ελέγχουμε την περιεκτικότητα σε DNA, ενώ σε μήκος κύματος 280 nm ελέγχουμε την πρόσμιξη με πρωτεΐνες. Εκτίμηση της καθαρότητας έγινε με τον προσδιορισμό του λόγου των μετρήσεων στα 260 nm και 280 nm (OD260/ OD280). Το καθαρό RNA δίνει λόγο A260/A280 ίσο με 2, ωστόσο, υψηλής καθαρότητας RNA με ελάχιστες προσμίξεις έχει πηλίκο μεταξύ 1,6 με 2.

Σαν τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε νερό ελεύθερο RNAσών και ακόλουθα στην ίδια κυβέτα UVette τοποθετήθηκε το άγνωστο δείγμα σε αραιώση 1/40 και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή του σε ng/μL. Ακολούθησε επαλήθευση της συγκέντρωσης και έλεγχος της ποιότητας του δείγματος για την παρουσία γενωμικού DNA με ηλεκτροφόρηση 2.5 μL RNA σε πηκτή αγαρόζης, πυκνότητας 1,5% με προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και τη χρήση μάρτυρα DNA, σε συσκευή Wide Mini Subcell GT system and PowerPac Basic power supply (BioRad, Cat 164-0301). Μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Καθ' όλη τη διάρκεια των παραπάνω διεργασιών, όλοι οι χώροι και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένα καθαριστεί με το διάλυμα απολύμανσης επιφανειών RNAaseZap που καταστρέφει τις RNάσες μετά από επαφή.

2.2 Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση μορίων DNA συμπληρωματικών (complementary DNA, cDNA) του εξαχθέντος RNA πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcriptase PCR; RT PCR). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πακέτο της M-MLV ανάστροφης μεταγραφάσης (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; M-MLV RT) που περιελάμβανε τα αντιδραστήρια MMLV-RT, 5xFS buffer, και 0,1 DTT (**Πίνακας 3**). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε το πακέτο τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων, (Deoxynucleotide Triphosphates Set; dNTPs, dATP, dTTP, dCTP, και dGTP), τελικής συγκέντρωσης 10 mM κι ένας αναστολέας των RNAσών (RNase Inhibitor; RNasin), ενώ ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν τυχαία εξανουκλεοτίδια (random hexamers) (50pmol/μL) (**Πίνακας 3**).

Τα δείγματα RNA και τα αντιδραστήρια αποψύχθηκαν και διατηρήθηκαν σε πάγο ώσπου να χρησιμοποιηθούν. Αφού όλοι οι χώροι και τα όργανα που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν καθαρίστηκαν με διάλυμα RNAaseZap (**Πίνακας 3**), παρασκευάστηκε το μείγμα της αντίδρασης σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4**.

Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε 1μg RNA από κάθε δείγμα. Η κατάλληλη ποσότητα RNA και 4 μL εκκινητών τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο σωληνάριο PCR 0,2 mL, ενώ προστέθηκε και τόση ποσότητα νερού, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 14 μL. Στη συνέχεια τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στους 72 °C για 2 min ώστε να επιτευχθεί η αποδιάταξη των μορίων. Έπειτα, έγινε παύση της αντίδρασης για να προστεθούν 11 μL μείγματος αντιδραστηρίων (**Πίνακας 4**) και ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους 42°C για 60 min και στους 65°C για 10 min για να επέλθει αδρανοποίηση των ενζύμων. Με το πέρας της αντίδρασης προστέθηκαν 25 μL νερού και τα δείγματα cDNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C, μέχρις ότου να χρησιμοποιηθούν. Για τις αντιδράσεις RT PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας MJ Research Thermal Cycler PTC-200 (Massachusetts, USA).

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μοριακή ανάλυση των δειγμάτων

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
Διάλυμα TRIzol	TRIzol Reagent	15596-026	Invitrogen, Life Technologies, UK
Χλωροφόρμιο	Acid phenol Chloroform	112250	Euroclone, Italy
Ισοπροπανόλη	Isopropanol	AL0323	Scharlau, Spain
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	E/0650DF/C17	Fischer Scientific, Eu
Νερό ελεύθερο Ρησών	Ultra Pure Water	10977-015	Gibco, USA
Αγαρόζη	Agarose	16500-500	Invitrogen, Life Technologies, UK
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10 mg/mL	161-0433	BioRad, USA
Μάρτυρας DNA	100bp DNA Ladder	15628-019	Invitrogen, Life Technologies, UK
Διάλυμα προστασίας από RNάσες	Rnase ZAP	AM9780	Ambion, Life Technologies, UK
Ανάστροφη μεταγραφάση MMLV	MMLV-RT	28025-021	Invitrogen, Life Technologies, UK
Πακέτο dNTPs	100 mM dNTP set	10297-018	Invitrogen, Life Technologies, UK
Αναστολέας των RNασών	RNAasin Rnase Inhibitor, 2,500 U/mL	N2111	Promega, USA
Τυχαία εξανουκλεοτίδια	Primer Random p(dN)	14292421	Roche, Eu
SYBR Green I	Platinum SYBR Green qPCR Supermix- UDG	11733-038	Invitrogen, Life Technologies, UK

Πίνακας 4. Ποσότητες αντιδραστηρίων για τη σύνθεση διαλύματος master mix για σύνθεση cDNA ανά δείγμα

Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα (μL)
5xFS buffer	5
Διάλυμα dNTPs (10 mM)	2
0,1 DTT	2,25
RNAsin (2,500 U/mL)	0,6
MMLV RT	1.25
Τελικός όγκος	11

2.3 Ανίχνευση μεταγράφων των υπό διερεύνηση γονιδίων με τη μεθοδολογία της PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

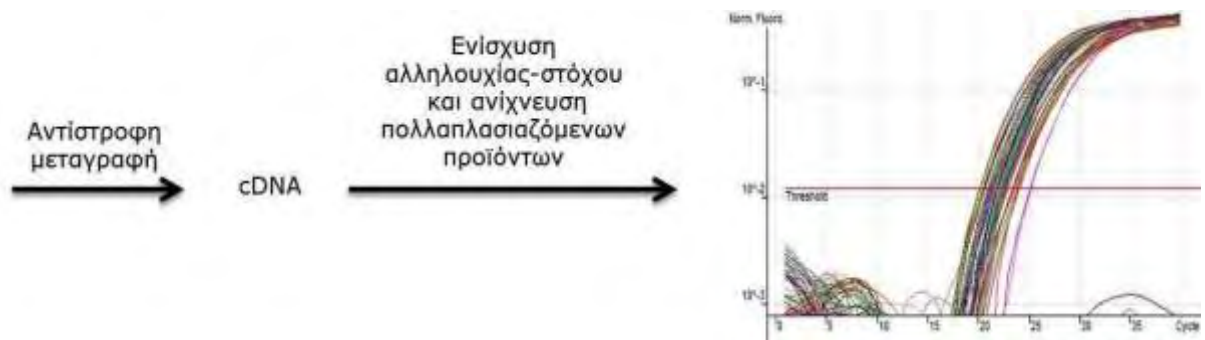
Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε ένα πλήθος γονιδίων σχετιζόμενων με τη φλεγμονή, την απόπτωση και την ανοσορρύθμιση. Αναλυτικά, μελετήθηκε η έκφραση των *FOXP3* (tTregs, *FOXP3*⁺ pTregs), *IL10* (Tr1 pTregs) και *TGFB1* (Th3 pTregs) για τον καθορισμό του τύπου των Tregs, των φλεγμονωδών κυτταροκινών *IL1B* και *TNFA*, των μεσολαβητών της απόπτωσης *FAS*, *FASL*, *TRAIL*, και *CASP3*, καθώς και των δεικτών εξάντλησης των T-κυττάρων *PD1*, *PDL1*, *PDL2* και της αποκατάστασής τους *IL2* και *IFNG*. Επιπρόσθετα, αναλύθηκε ο ρόλος του *TGFB1*, καθώς και των άλλων κυτταροκινών της υπεροικογένειας του *TGFB* (όπως των *TGFB2* και *TGFB3*) των ακτιβινών, των υποδοχέων τους *TGFBRI* και *TGFBRII*, και των ενδοκυττάρων μεσολαβητών που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι, όπως τα *SMADs* (*SMAD-2,-3,-4* και *-7*). Τα γονίδια που μελετήθηκαν, καθώς και οι ανοσιακές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν φαίνονται συνοπτικά στον **Πίνακα 5**.

Πίνακας 5. Τα υπό μελέτη γονίδια και οι ανοσιακές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν

Γονίδια	Ανοσιακές διεργασίες
<i>FOXP3</i> , <i>IL10</i> , <i>TGFB</i>	Δείκτες ρυθμιστικών T-κυττάρων
<i>CD4</i> , <i>CD8</i>	Δείκτες T-κυττάρων
<i>IL1B</i> , <i>TNFA</i>	Φλεγμονή
<i>FAS/FASL</i> , <i>TRAIL</i> , <i>CASP3</i>	Απόπτωση
<i>PD1</i> , <i>PDL1</i> , <i>PDL2</i>	Εξάντληση T-κυττάρων
<i>IL2</i> , <i>IFNG</i>	Αποκατάσταση T-κυττάρων
<i>TGF-B (-B1,-B2,-B3)</i> , <i>TGFBRs</i> , <i>SMADs (-2,-3,-4,-7)</i> , <i>Activins (INH-B,-A,-B,-C,-E)</i>	Ίνωση

Αρχή της μεθόδου

Προκειμένου να προσδιοριστεί η έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία της PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). Η Real-Time PCR είναι μία γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη τεχνική που βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και αποτελεί ένα από τα πιο βασικά εργαλεία για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό DNA και RNA. Το πλεονέκτημά της έγκειται στο συνδυασμό του πολλαπλασιασμού μιας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας-στόχου με τη σύγχρονη παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, την ανίχνευση των παραγόμενων προϊόντων και την ποσοτικοποίησή τους κατά απόλυτες ή και σχετικές τιμές. Το χαρακτηριστικό της είναι ότι το πολλαπλασιαζόμενο DNA ποσοτικοποιείται καθώς συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, μετά το τέλος κάθε κύκλου πολλαπλασιασμού, σε πραγματικό χρόνο (**Εικ. 6**).



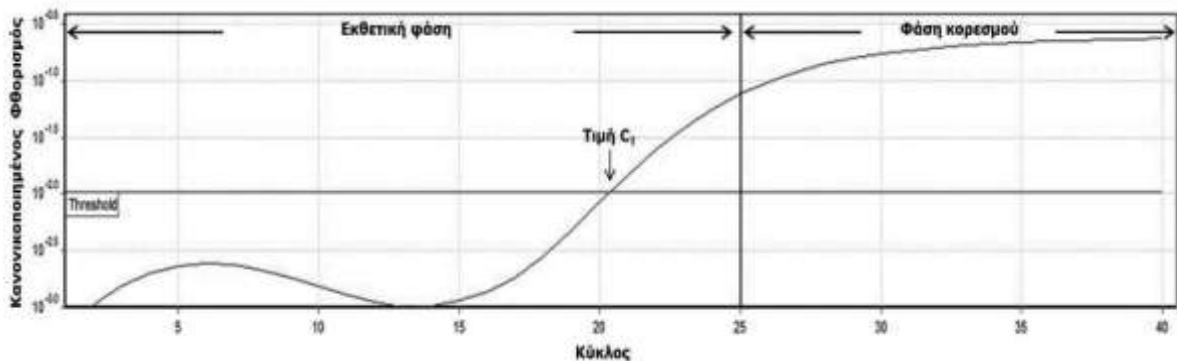
Εικ. 6 Στάδια της RT Real-Time -PCR. Το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής μπορεί να γίνει είτε σε ξεχωριστή αντίδραση και το παραγόμενο cDNA να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για την real-time PCR, είτε σε μία συνδυασμένη αντίδραση χρησιμοποιώντας θερμοανθεκτική DNA εξαρτώμενη πολυμεράση. Όλα τα υπόλοιπα στάδια διεξάγονται από τη συσκευή της Real-time PCR (thermal cycler/detector) και τα ποσοτικά αποτελέσματα προωθούνται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Η ανίχνευση των πολλαπλασιαζόμενων προϊόντων επιτυγχάνεται με τη χρήση συστημάτων ιχνηθέτησης φθορισμού. Ο φθορισμός μετράται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Το σήμα αυτό μειώνεται κατά το στάδιο της αποδιάταξης (denaturation), επομένως, η ανίχνευση του σήματος στο τέλος του σταδίου επιμήκυνσης κάθε κύκλου είναι εκείνη που καταγράφει το αυξανόμενο ποσό του DNA.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της

αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα).

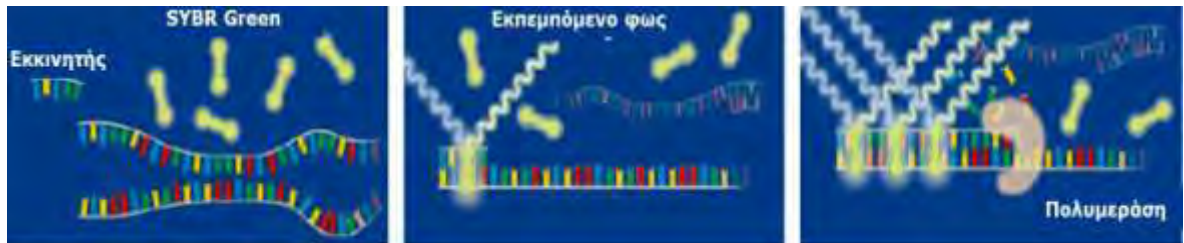
Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητά της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεων τους (**Εικ. 7**).



Εικ. 7 Τα κύρια χαρακτηριστικά ενός διαγράμματος *real-time PCR*. Η γραμμή Threshold διέρχεται από το σημείο όπου το φθορίζον σήμα των προϊόντων ξεχωρίζει έντονα από το φόντο, ενώ ο κύκλος που αντιστοιχεί σε αυτό το σημείο λέγεται τιμή C_T . Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε ένα δείγμα, τόσο πιο νωρίς θα εμφανιστεί στο διάγραμμα η τιμή C_T που αντιστοιχεί στο δείγμα αυτό (μικρότερη τιμή C_T).

Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή C_T (threshold cycle), η οποία εντοπίζεται πάντα στην εκθετική φάση της αντίδρασης. Αυτό σημαίνει ότι η ποσοτικοποίηση δεν επηρεάζεται από την εξάντληση κάποιου εκ των συστατικών, η οποία συμβαίνει κατά τη φάση κορεσμού. Συνεπώς, η τιμή C_T αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη τιμή του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή C_T είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος.^{307,308} Η ανίχνευση των προϊόντων PCR γίνεται με τη χρήση διαφόρων μεθόδων ιχνηθέτησης φθορισμού, είτε άμεσα είτε έμμεσα. Ο φθορισμός που αποδίδει η έμμεση μέθοδος παράγεται κατά την επιμήκυνση των εκκινητών στο στάδιο της ενίσχυσης, ενώ οι άμεσες μέθοδοι αναφέρονται σε συστήματα όπου ο φθορισμός είναι το άμεσο αποτέλεσμα κάποιας σύνδεσης του φθορίζοντος μορίου στο ενισχυόμενο προϊόν ή μιας άμεσης ενσωμάτωσης του φθορίζοντος ανιχνευτή στο ενισχυόμενο μόριο. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μη-ειδική φθορίζουσα χρωστική, SYBR Green I, που έχει την ικανότητα πρόσδεσης σε δίκλινα μόρια DNA. Η ουσία αυτή διεγείρεται

με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm. Η ελεύθερη χρωστική στο διάλυμα εκπέμπει μηδαμινό φθορισμό, ενώ η ενσωμάτωσή της στο σχηματιζόμενο δίκλωνο μόριο DNA κατά το στάδιο της επιμήκυνσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανίχνευσης του φθορίζοντος σήματος (**Εικ. 8**). Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

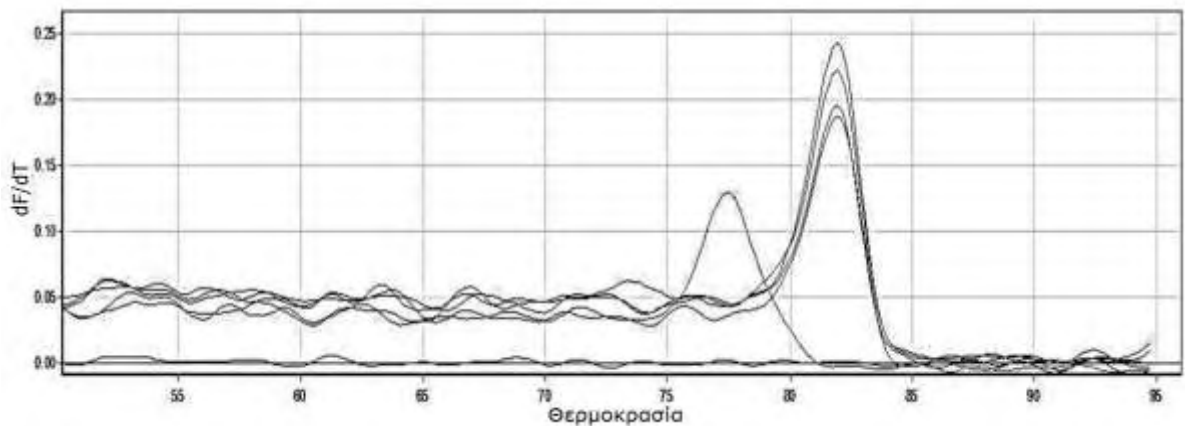


Εικ. 8 Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBR green I. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. Η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. [Τροποποίηση από <http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>]

Η χρήση αυτού του μη-ειδικού συστήματος ανίχνευσης παρουσιάζει τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημά της είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική μέθοδο από την χρήση ειδικού ανιχνευτή (probe). Επιπλέον, συνιστά μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο, καθώς σε κάθε μόριο DNA που συντίθεται δεσμεύονται πολλά μόρια χρωστικής, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του παραγόμενου σήματος. Αντίθετα, σημαντικό μειονέκτημα της SYBR Green I αποτελεί το γεγονός ότι προσδένεται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών, καθώς και μη-ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν.

Το γεγονός αυτό οδηγεί σε λανθασμένη υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της αλληλουχίας-στόχου. Ωστόσο, ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών, όπως επίσης και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποφυγή αυτών των προβλημάτων. Επιπλέον, η ανάλυση των καμπυλών τήξης (melting curve analysis) μετά το πέρας της αντίδρασης, δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου, από το φθορισμό που μπορεί να οφείλεται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη-ειδικά προϊόντα.

Η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά πάνω από το σημείο τήξης (T_m) του προϊόντος της PCR και προσδιορίζεται ο φθορισμός. Καθώς το T_m του προϊόντος εξαρτάται κυρίως από τη νουκλεοτιδική του αλληλουχία είναι δυνατή η διάκριση του σήματος που προκύπτει από το επιθυμητό προϊόν, το οποίο θα παρουσιάζεται ως μία οξεία κορυφή κοντά στη θερμοκρασία τήξης του, ενώ τα μη-ειδικά προϊόντα θα εμφανίζουν πολλαπλές κορυφές σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (**Εικ. 9**).



Εικ. 9 Χαρακτηριστικές καμπύλες αποδιάταξης. Οι παραπάνω καμπύλες αποδιάταξης (dissociation curves) δείχνουν χαρακτηριστικά το διμερισμό των εκκινήτων (primer dimers). Το ειδικό προϊόν έχει θερμοκρασία τήξεως (T_m) $82,5^{\circ}\text{C}$, ενώ τα διμερή των εκκινήτων έχουν χαρακτηριστικά χαμηλότερη θερμοκρασία τήξεως στους 77°C .

Μέθοδος ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με τη μέθοδο της Real-Time PCR χρησιμοποιούνται οι μεθοδολογίες του απόλυτου ποσοτικού προσδιορισμού (absolute quantification) και του σχετικού ποσοτικού προσδιορισμού (relative quantification), οι οποίες αναλύονται παρακάτω. Η παρούσα μελέτη βασίστηκε στο σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό της γονιδιακής έκφρασης.

Η απόλυτη ποσοτικοποίηση γίνεται όταν είναι αναγκαία η γνώση του απόλυτου αριθμού των αντιγράφων του RNA στόχου και πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας απόλυτης πρότυπης καμπύλης (absolute standard curve). Αυτό προϋποθέτει τη συμβολή πρότυπων (standard) δειγμάτων, δηλαδή δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Συνήθως ως πρότυπο δείγμα χρησιμοποιείται πλασμιδιακό DNA και RNA που έχει υποστεί μεταγραφή *in vitro* (*in vitro* transcribed RNA). Κατά την απόλυτη ποσοτικοποίηση πρέπει να είναι γνωστές οι απόλυτες τιμές των πρότυπων δειγμάτων με κάποιο ανεξάρτητο τρόπο. Η συγκέντρωση των δειγμάτων μετράται με βάση την απορρόφηση σε μήκος κύματος 260nm (A_{260}) και στη συνέχεια μετατρέπεται σε αριθμό αντιγράφων χρησιμοποιώντας το μοριακό βάρος του DNA ή του RNA. Η πρότυπη καμπύλη προκύπτει από τη γραφική παράσταση των C_T τιμών τους σε συνάρτηση με το λογάριθμο των αρχικών αριθμών των αντιγράφων τους. Ο αριθμός

των δειγμάτων του υπό εξέταση RNA μπορεί στη συνέχεια να υπολογιστεί από την γραμμική απόκλιση (linear regression) της πρότυπης καμπύλης. Είναι πολύ σημαντικό, αφενός το DNA ή το RNA που θα χρησιμοποιηθεί να είναι απόλυτα καθαρό ώστε να μην συμβαίνει ψευδής αύξηση της απορρόφησης A260, και αφετέρου το πιπετάρισμα να είναι πολύ ακριβές, καθώς κατά τη δημιουργία της καμπύλης τα πρότυπα δείγματα υφίστανται διαδοχικές αραιώσεις.

Κατά τη σχετική ποσοτικοποίηση, οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA ενός γονιδίου-στόχου προσδιορίζονται σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα ενός παράλληλα ενισχυόμενου mRNA ενός κατάλληλου ενδογενούς συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου αναφοράς (*reference gene*), π.χ. ενός γονιδίου βασικής λειτουργίας (*housekeeping gene*). Το ιδανικό γονίδιο αναφοράς θα πρέπει να εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα ανάμεσα στους διάφορους ιστούς του οργανισμού, να μην επηρεάζεται από την ίδια την πειραματική διαδικασία και να εκφράζεται σε παρόμοια επίπεδα με το υπό εξέταση γονίδιο. Η επιλογή του κατάλληλου γονιδίου είναι πολύ σημαντική για την εξασφάλιση αξιόπιστων αποτελεσμάτων και εξαρτάται από τη συγκεκριμένη πειραματική κατεργασία και το είδος του χρησιμοποιούμενου δείγματος. Στην παρούσα μελέτη, ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η β2-μικροσφαιρίνη (*B2M*) που αποτελεί πρωτεΐνη του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, υπάρχει σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους (εκτός από τα ερυθροκύτταρα) και παρουσιάζει σχεδόν σταθερή έκφραση στους περισσότερους ιστούς, ενώ επιπλέον, δεν έχει αναφερθεί η ύπαρξη ψευδογονιδίων.

Πραγματοποιείται σύγκριση των τιμών C_T των δειγμάτων προς ανάλυση με τις αντίστοιχες τιμές ενός δείγματος αναφοράς. Ως δείγμα αναφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παράδειγμα, RNA από φυσιολογικό ηπατικό ιστό στην περίπτωση εξέτασης παθολογικού δείγματος. Οι τιμές C_T του mRNA-στόχου, τόσο των δειγμάτων προς εξέταση όσο και του δείγματος αναφοράς, κανονικοποιούνται ως προς τις αντίστοιχες τιμές του ενδογενούς γονιδίου αναφοράς. Η κανονικοποίηση ως προς το ενδογενές γονίδιο απαιτείται για τη διόρθωση των πιθανών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, οι οποίες οφείλονται σε διαφορετική συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (cDNA) ή σε διαφορές στην αποδοτικότητα της αντίδρασης ενίσχυσης.

Η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης χαρακτηρίζεται μαθηματικά από την εξίσωση

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

όπου $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ δείγματος - ΔC_T αναφοράς. Η τιμή ΔC_T δείγματος είναι η κανονικοποιημένη τιμή C_T για κάθε δείγμα, ως προς την αντίστοιχη τιμή του γονιδίου αναφοράς, ενώ η τιμή ΔC_T αναφοράς είναι, αντίστοιχα, η κανονικοποιημένη τιμή C_T για το δείγμα αναφοράς. Εξ' ορισμού, για το δείγμα αναφοράς ισχύει ότι $2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^0 = 1$,

οπότε η διαφορά στην έκφραση του γονιδίου-στόχου στο δείγμα αναφοράς σε σχέση με τον εαυτό του, ισούται με 1. Οι αντίστοιχες εξισώσεις για τα υπόλοιπα δείγματα δείχνουν πόσες φορές είναι αυξημένη ή μειωμένη η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-στόχου στα δείγματα αυτά σε σχέση με το δείγμα αναφοράς.³⁰⁹

Σχεδιασμός Εκκινήτων

Γενικά προτιμάται η παραγωγή μικρών προϊόντων σε μήκος (80-250 βάσεις), καθώς ενισχύονται αποτελεσματικότερα και είναι ανθεκτικότερα στις συνθήκες της αντίδρασης. Αυτό συμβαίνει γιατί η αποδιάταξή τους κατά το στάδιο της θέρμανσης στους 92-95°C είναι περισσότερο πιθανή, οπότε διευκολύνεται η σύνδεση των εκκινήτων με τη συμπληρωματική τους αλληλουχία.

Οι εκκινήτες πρέπει να προσδένονται σε διαφορετικά εξόνια προς αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την ενίσχυση γενωμικού DNA που μπορεί να υπάρχει στο δείγμα. Η επιλογή των εκκινήτων γίνεται με βάση το επιθυμητό T_m , το επιθυμητό μικρό μέγεθος προϊόντος και τη θέση τους. Το βέλτιστο μήκος για τους εκκινήτες κυμαίνεται μεταξύ 18 και 24 βάσεων. Το T_m πρέπει να είναι κοντά στους 60 °C (55-72°C), ενώ η διαφορά T_m μεταξύ των εκκινήτων δεν πρέπει να ξεπερνά τους 2°C. Επιπρόσθετα, το T_m του προϊόντος PCR δεν πρέπει να είναι χαμηλότερο από αυτό των εκκινήτων. Η περιεκτικότητά τους σε βάσεις GC% δεν πρέπει να υπερβαίνει κατά πολύ το 50%, ωστόσο, το 3' άκρο των εκκινήτων είναι καλό να είναι πλούσιο σε GC% (>50%) με την τελευταία βάση να είναι, κατά προτίμηση G ή C. Η πιο σημαντική περιοχή για ειδική ενίσχυση είναι η 3' περιοχή του εκκινήτη, επειδή η ενίσχυση ξεκινά από την περιοχή αυτή. Αυτά τα άκρα δεν πρέπει να σχηματίζουν δευτεροταγείς και παλινδρομικές δομές, όπως επίσης και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Τέλος, οι αλληλουχίες των δύο εκκινήτων δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, ιδιαίτερα στο 3' άκρο τους, έτσι ώστε να μη σχηματίζονται διμερή εκκινήτων.

Με βάση τις παραπάνω προϋποθέσεις και τη χρήση του πολυλειτουργικού λογισμικού Oligo 6 σχεδιάστηκαν οι αλληλουχίες των εκκινήτων για τα γονίδια *TGFB2*, *CTGF*, *PDL1*, *PDL2*, *CD4* και *CD8*. Οι εκκινήτες για την ενίσχυση των γονιδίων προσφέρθηκαν ευγενώς από το Δρ. Π. Σιδερά [Ερευνητή Α', Κέντρο Ανοσολογίας και Μεταμοσχεύσεων, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, (ΙΙΒΕΑΑ)],³¹⁰ ενώ οι εκκινήτες για τα υπόλοιπα γονίδια που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν εμπορικά διαθέσιμοι από την εταιρεία SA Biosciences (Qiagen; Valencia, CA, USA). Οι αλληλουχίες και τα χαρακτηριστικά όλων των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**.

Πίνακας 6: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη Real-Time PCR και τα χαρακτηριστικά τους

Αντιδραστήριο	Αλληλουχία	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
<i>FOXP3</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH00029B	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>FAS</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH00141B	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>FASL</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH00142B	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>TRAIL</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH00242E	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>PD1</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH13086E	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>PDL1</i>	εμπρόσθιος: 5'- GGTGGTGCCGACTACAA- 3' οπίσθιος: 5'- TAGCCCTCAGCCTGACAT- 3'		Invitrogen, Life Technologies, UK
<i>PDL2</i>	εμπρόσθιος: 5'- CTGTGGCAAGTCCTCATA- 3' οπίσθιος: 5'- TAAAGCTGCTATCTGGTGA- 3'		Invitrogen, Life Technologies, UK
<i>TNFA</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH00341E	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>IFNG</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH00380B	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>IL1β</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH00171B	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>CASP3</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH0017B	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>CD4</i>	εμπρόσθιος: 5'- CATCAAGGTTCTGCCCACAT- 3' οπίσθιος: 5'- TTCTGAAACCGGTGAGGACAC- 3'		Invitrogen, Life Technologies, UK
<i>CD8</i>	εμπρόσθιος: 5'- GCTGGACTTCGCCTGTGATA- 3' οπίσθιος: 5'- TGTCTCCCGATTTGACCAC- 3'		Invitrogen, Life Technologies, UK
<i>IL2</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH00172B	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>IL10</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH00572B	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>TGFB1</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH00508A	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA

Πίνακας 6: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη Real- Time PCR και τα χαρακτηριστικά τους (συνέχεια)

Αντιδραστήριο	Αλληλουχία	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
<i>TGFB2</i>	εμπρόσθιος: 5'- AGAGTGCCTGAACAA-3' οπίσθιος: 5'- CCATTCGCCTTCTGCTCTT-3'		Invitrogen, Life Technologies, UK
<i>TGFB3</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH00508A	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>ALK5</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH00508A	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>SMAD2</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH01949E	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>SMAD3</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH01921B	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>SMAD4</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH00134B	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>SMAD7</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH01905B	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA
<i>INHBA</i>	εμπρόσθιος: 5'- AGCAGACCTCGGAGATCATC- 3' οπίσθιος: 5'- TTGGGGACTTTTAGGAAGAGC- 3'		Προσφορά Κέντρου Ανσολογίας και Μεταμοσχεύσεων, ΙΙΒΕΑΑ
<i>INHBB</i>	εμπρόσθιος: 5'- AGGAGCGCGTTTCCGAAATC- 3' οπίσθιος: 5'- TGGTTGCCTTCGTTGGAGATG- 3'		Προσφορά Κέντρου Ανσολογίας και Μεταμοσχεύσεων, ΙΙΒΕΑΑ
<i>INHBC</i>	εμπρόσθιος: 5'- AGAGCTGCTTTGAGGACTGC- 3' οπίσθιος: 5'- AAGACGAGTCTGGTTGATGGTG- 3'		Προσφορά Κέντρου Ανσολογίας και Μεταμοσχεύσεων, ΙΙΒΕΑΑ
<i>INHBE</i>	εμπρόσθιος: 5'- GCAACAATTCCTGGCGATACC- 3' οπίσθιος: 5'- GCCCTCAATTTCCCCTCCAC- 3'		Προσφορά Κέντρου Ανσολογίας και Μεταμοσχεύσεων, ΙΙΒΕΑΑ
<i>ALK4</i>	εμπρόσθιος: 5'- CATTGACATTGCCCGAATC- 3' οπίσθιος: 5'- CGAGCAATCTCCCAATATACAAG- 3'		Προσφορά Κέντρου Ανσολογίας και Μεταμοσχεύσεων, ΙΙΒΕΑΑ
<i>B2M</i>	εμπορικά διαθέσιμοι	PPH01094E	SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA

Πειραματική διαδικασία

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση RT-PCR δύο βημάτων. Αυτό σημαίνει ότι η αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA έγινε σε ξεχωριστό στάδιο και στη συνέχεια το παραγόμενο cDNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την αντίδραση της real-time PCR.

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου αναπόφευκτα επηρεάζεται από την απόδοση της ίδιας της αντίδρασης RT, καθώς επίσης και από το γεγονός ότι απαιτούνται δυο διαδοχικά ενζυμικά στάδια.³¹¹ Επιπρόσθετα, λόγω του πλήθους των υπό εξέταση γονιδίων, η αντίδραση RT χρειάστηκε να γίνει πολλαπλές φορές για κάθε δείγμα. Για να διαπιστωθούν τυχόν σφάλματα που προκύπτουν από πιθανές διαφορές στην απόδοση της αντίδρασης RT, τα δείγματα cDNA ελέγχονταν πάντα για την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (*B2M*) και γίνονταν αποδεκτές διαφορές $<1 C_T$.

Όσον αφορά την αντίδραση Real-Time PCR, η εκθετική φάση της σε συνδυασμό με τις μικρές ποσότητες των μορίων-στόχων την καθιστούν ευάλωτη σε πιθανές ασήμαντες διακυμάνσεις στα συστατικά της αντίδρασης και στις θερμοκρασίες των κύκλων, καθώς και σε φαινόμενα λανθασμένης πρόσδεσης των εκκινητών (*mispriming*) κατά τα πρώιμα στάδια της αντίδρασης, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά το τελικό αποτέλεσμα των πολλαπλασιαζόμενων προϊόντων. Για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της αντίδρασης Real-Time PCR και να μειωθούν τα τυχόν σφάλματα από διαφορές στο πιπετάρισμα, κάθε δείγμα αναλύθηκε στην αντίδραση εις διπλούν (*duplicates*).

Για την προετοιμασία του μείγματος των αντιδραστηρίων της PCR για την ανάλυση κάθε γονιδίου χρησιμοποιήθηκε το Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG, το αντίστοιχο ζεύγος των εκκινητών και H₂O. Τα δείγματα cDNA και τα αντιδραστήρια αποψύχθηκαν και διατηρήθηκαν σε πάγο ώσπου να χρησιμοποιηθούν. Έπειτα, παρασκευάστηκε το μείγμα της αντίδρασης (*master mix*) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 7**.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια 0,1 ml (0.1 ml tubes and caps) τοποθετημένα σε ειδική μεταλλική πλάκα 72 θέσεων. Σε κάθε θέση προστέθηκαν 23 μl από το *master mix* και 2 μl cDNA από τα υπό διερεύνηση δείγματα.

Πίνακας 7. Ποσότητες αντιδραστηρίων για την προετοιμασία του master mix ανά δείγμα

Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα (μL)
Platinum SYBR Green qPCR Supermix- UDG	12,5
H ₂ O	9,5
Εμπρόσθιος εκκινητής*	0,5
Οπίσθιος εκκινητής*	0,5
Τελικός όγκος	23

*στην περίπτωση των εμπορικά διαθέσιμων σετ εκκινητών προστίθεντο 1μl από το έτοιμο διάλυμα που περιείχε αι τους δύο εκκινητές

Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε δύο φορές, σε δύο θέσεις της μεταλλικής πλάκας της αντίδρασης (duplicates). Επίσης, ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα στα οποία δεν είχε προστεθεί cDNA αλλά H₂O (no template control; NTC). Στη συνέχεια ενεργοποιήθηκε η έναρξη των αντιδράσεων, όπου συνολικά πραγματοποιήθηκαν 40 κύκλοι αντίδρασης για την ανάλυση όλων των γονιδίων, εκτός από αυτά των ακτιβινών (*INHBA*, *INHBB*, *INHBC* και *INHBE*) και του υποδοχέα *ALK4* για τα οποία πραγματοποιήθηκαν 50 κύκλοι αντίδρασης. Η απόδοση όλων των αντιδράσεων κυμαινόταν από 0,9-1,05 και οι συνθήκες για κάθε γονίδιο χωριστά φαίνονται στον **Πίνακα 8**. Οι αντιδράσεις της Real-Time PCR πραγματοποιήθηκαν στον αυτόματο κυκλικό μετατροπέα RotorGene 6000 της Corbett Life Science (Qiagen; Valencia, CA, USA).

Ανάλυση αποτελεσμάτων

Το λογισμικό του μηχανήματος παρέχει τις γραφικές παραστάσεις πολλαπλασιασμού (amplification plot), των καμπυλών τήξεως ή αποδιάταξης (dissociation curve) καθώς και τις τιμές C_T για το σύνολο των δειγμάτων. Για την στατιστική επεξεργασία οι τιμές C_T υπεβλήθησαν στις στατιστικές δοκιμασίες των Mann-Whitney U test, Kruskal- Wallis H test και της συσχέτισης κατά Spearman με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS V18.0. Η διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων έγινε με το ίδιο πακέτο στατιστικής ανάλυσης.

Πίνακας 8. Συνθήκες και τιμές *threshold* των αντιδράσεων *Real-Time PCR* για την ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων

Γονίδιο	Threshold	Συνθήκες PCR			
		Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Υβριδισμός	Επιμήκυνση
<i>FOXP3</i>	0,013	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 15 sec	60 ⁰ C, 15 sec	72 ⁰ C, 15 sec
<i>FAS</i>	0,01529	95 ⁰ C, 2 min	95 ⁰ C, 10 sec	55 ⁰ C, 10 sec	72 ⁰ C, 20 sec
<i>FASL</i>	0,0147	95 ⁰ C, 2 min	95 ⁰ C, 10 sec	55 ⁰ C, 10 sec	72 ⁰ C, 30 sec
<i>TRAIL</i>	0,0828	95 ⁰ C, 2 min	95 ⁰ C, 10 sec	55 ⁰ C, 10 sec	72 ⁰ C, 20 sec
<i>PD1</i>	0,00869	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 15 sec	60 ⁰ C, 60sec	
<i>PDL1</i>	0,00989	95 ⁰ C, 2 min	95 ⁰ C, 10 sec	58 ⁰ C, 10 sec	72 ⁰ C, 20 sec
<i>PDL2</i>	0,00796	95 ⁰ C, 2 min	95 ⁰ C, 30 sec	55 ⁰ C, 30 sec	72 ⁰ C, 30 sec
<i>TNFA</i>	0,029	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 15 sec	60 ⁰ C, 60 sec	
<i>IFNG</i>	0,0841	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 10 sec	58 ⁰ C, 10 sec	72 ⁰ C, 30 sec
<i>IL1B</i>	0,0221	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 15 sec	60 ⁰ C, 60sec	
<i>CASP3</i>	0,01321	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 15 sec	60 ⁰ C, 60sec	
<i>CD4</i>	0,02	95 ⁰ C, 2 min	95 ⁰ C, 10 sec	58 ⁰ C, 10 sec	72 ⁰ C, 20 sec
<i>CD8a</i>	0,01168	95 ⁰ C, 2 min	95 ⁰ C, 10 sec	55 ⁰ C, 10 sec	72 ⁰ C, 60 sec
<i>IL2</i>	0,009	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 15 sec	60 ⁰ C, 60sec	
<i>IL10</i>	0,031	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 15 sec	58 ⁰ C, 60sec	
<i>TGFB1</i>	0,0092	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 15 sec	60 ⁰ C, 60sec	
<i>TGFB2</i>	0,02924	95 ⁰ C, 2 min	95 ⁰ C, 15 sec	53 ⁰ C, 15 sec	72 ⁰ C, 15 sec
<i>TGFB3</i>	0,01206	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 10 sec	58 ⁰ C, 10 sec	72 ⁰ C, 30 sec
<i>ALK5</i>	0,0106	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 15 sec	60 ⁰ C, 60sec	
<i>SMAD2</i>	0,0258	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 15 sec	58 ⁰ C, 15 sec	72 ⁰ C, 15 sec
<i>SMAD3</i>	0,01695	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 10 sec	58 ⁰ C, 10 sec	72 ⁰ C, 30 sec
<i>SMAD4</i>	0,0296	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 15 sec	60 ⁰ C, 60sec	
<i>SMAD7</i>	0,01875	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 15 sec	60 ⁰ C, 60sec	
<i>INHBA</i>	0,036	95 ⁰ C, 2 min	95 ⁰ C, 15 sec	56 ⁰ C, 40sec	
<i>INHBB</i>	0,031	95 ⁰ C, 2 min	95 ⁰ C, 15 sec	56 ⁰ C, 40sec	
<i>INHBC</i>	0,047	95 ⁰ C, 2 min	95 ⁰ C, 15 sec	56 ⁰ C, 40sec	
<i>INHBE</i>	0,032	95 ⁰ C, 2 min	95 ⁰ C, 15 sec	56 ⁰ C, 40sec	
<i>ALK4</i>	032	95 ⁰ C, 2 min	95 ⁰ C, 15 sec	56 ⁰ C, 40sec	
<i>CTGF</i>	0,01287	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 15 sec	60 ⁰ C, 60sec	
<i>B2M</i>	0,01006	95 ⁰ C, 10 min	95 ⁰ C, 15 sec	60 ⁰ C, 60sec	

2.4 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η τεχνική Western blot είναι μία ευρέως αποδεκτή αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ειδικών πρωτεϊνών στο εκάστοτε δείγμα του ομογενοποιημένου ιστού ή του εκχυλίσματος. Χρησιμοποιεί ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου προς διαχωρισμό των φυσικών πρωτεϊνών από την τρισδιάστατη δομή τους ή των μετουσιωμένων πρωτεϊνών από το μήκος του πολυπεπτιδίου. Οι πρωτεΐνες στη συνέχεια μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF), όπου χρωματίζονται με αντισώματα ειδικά για την πρωτεΐνη-στόχο.

Η τεχνική εφαρμόστηκε για την ανίχνευση της πρωτεΐνης FOXP3 σε τυχαία επιλεγμένα δείγματα 7 ασθενών με ηπατοπάθειες (3 με ΧΗΒ, 2 με ΧΗC και 2 με ΝΑFLD) και σε 3 μάρτυρες, ενώ ως πρωτεΐνη ελέγχου φόρτωσης (loading control) χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο GAPDH (**Πίνακας 9**). Η ανοσοεντόπιση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πακέτου WesternDot™ 625 Western Blot που ανιχνεύει υπεριώδη ακτινοβολία (Ultra Violet; UV), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (**Πίνακας 9**). Για τον ανοσοεντοπισμό της πρωτεΐνης FOXP3 χρησιμοποιήθηκε το πακέτο WesternDot™ 625 Goat Anti-Mouse Western Blot, αφού ο ξενιστής στον οποίο παρήχθη το μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ποντικός (**Πίνακας 9**). Στην περίπτωση του GAPDH, ο ξενιστής στον οποίο παρήχθη το πολυκλωνικό αντίσωμα ήταν κουνέλι, γι' αυτό και χρησιμοποιήθηκε το πακέτο WesternDot™ 625 Goat Anti-Rabbit Western Blot (**Πίνακας 9**). Ακολουθεί αναλυτική περιγραφή των σταδίων και της πειραματικής πορείας της τεχνικής, ενώ οι λεπτομέρειες των αντιδραστηρίων και των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των σχετικών πειραμάτων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9**.

Πίνακας 9: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην πρωτεϊνική ανάλυση των δειγμάτων

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
Πακέτο Western Blot για την ανίχνευση του FOXP3	WesternDot™ 625 Goat Anti-Mouse Western Blot	W10132	Invitrogen, Life Technologies, UK
Πακέτο Western Blot για την ανίχνευση του GAPDH	WesternDot™ 625 Goat Anti-Rabbit Western Blot	W10142	Invitrogen, Life Technologies, UK
Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του FOXP3	Anti-FOXP3 antibody [mAbcam 22510]	ab22510	Abcam, Cambridge, UK
Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του GAPDH	Human Anti-G3PDH Antibody	2275-PC-100	Gaithersburg, Md, USA
1% Triton X-100	Triton X-100 for Molecular Biology	T8787	Sigma-Aldrich, USA
NaCl	NaCl	S6191	Sigma-Aldrich, USA
HEPES	HEPES	H-3375	Sigma-Aldrich, USA
Αναστολείς πρωτεασών	Complete Protease Inhibitor Tablets	11836153001	Roche, Switzerland, Eu
Πακέτο BCA Protein Assay	BCA Protein Assay Kit	23227	Pierce Inc., Rockford, IL, USA
Ρυθμιστικό δάλυμα LDS	LDS sample buffer 4x	NP0007	Invitrogen, Life Technologies, UK
Αποδιατακτικός παράγοντας	NuPAGE, Sample reducing agent, 10X	NP0004	Invitrogen, Life Technologies, UK
Διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών	NuPAGE, MES SDS Running Buffer, 20X	NP0002	Invitrogen, Life Technologies, UK
Αντιοξειδωτικός παράγοντας	NuPAGE, Antioxidant	NP0005	Invitrogen, Life Technologies, UK
Προκατασκευασμένα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου	NuPAGE, 4-12% Bis-Tris Gel 1.0mmx10 well	NP0321BOX	Invitrogen, Life Technologies, UK
Προεχρωσμένος δείκτης μοριακών βαρών	SeeBlue Plus2 Prestained Standard, 1X	LC5925	Invitrogen, Life Technologies, UK
Μεμβράνες PVDF	Invitrolon PVDF /Filter Paper Sandwiches	LC2005	Invitrogen, Life Technologies, UK
Μεθανόλη	Methanol RPE ACS-Reag.Ph.Eur.-Reag.USP-analytical grade	414816	Carlo Erba, Italy
Χρωστική Ponceau S	Ponceau S		

Απομόνωση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Για την απομόνωση των πρωτεϊνών, ο ιστός διαλύθηκε με τη χρήση αποστειρωμένων πλαστικών ομογενοποιητών σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης με σύσταση 1% Triton X-100 σε 150 mM NaCl/ 20mM HEPES (pH 7.5), το οποίο περιείχε ένα μείγμα από αναστολείς πρωτεασών. Ακολούθησαν τρεις κύκλοι βαθιάς κατάψυξης και απόψυξης, συνοδευόμενοι από ισχυρή ανακίνηση μερικών δευτερολέπτων (vortex) και σύντομη φυγοκέντρηση. Η τελευταία φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε στις 13000 rpm για 3 min, απομακρύνθηκαν οι μη διασπασμένες πρωτεΐνες και συλλέχθηκε το υπερκείμενο.

Η μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του ομογενοποιημένου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο BCA (Bicinchoninic Acid) χρησιμοποιώντας το πακέτο BCA Protein Assay, με τη βοήθεια σπεκτροφωτομέτρου, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μικροποσότητα του δείγματος (1 μl) αναμίχθηκε με το ειδικό διάλυμα αντιδραστήριου BCA και επώαστηκε σε θάλαμο θερμοκρασίας 37°C για 30 min. Ακολούθησε μέτρηση στο σπεκτροφωτόμετρο A3 859 Plate Reader της εταιρείας das (Digital and Analog Systems, Italy) και ποσοτικοποίηση του δείγματος με βάση την πρότυπη καμπύλη.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών να μετακινούνται όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο και σε τιμές pH διαφορετικές από το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Η ταχύτητα μετατόπισης εξαρτάται από το λόγο του φορτίου που φέρουν προς τη μάζα τους. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών μορίων επιτυγχάνεται μέσω των πόρων που σχηματίζονται μέσα στα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου και λειτουργούν ως μοριακοί ηθμοί. Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος εξαρτάται από την απόλυτη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου και του δι-ακρυλαμιδίου στα διαλύματα του πηκτώματος. Η έναρξη του πολυμερισμού καθορίζεται από την προσθήκη του υπερθειικού αμμωνίου (APS) και επιταχύνεται παρουσία N,N,N,N-τετραμεθυλο-αιθυλο-διαμίνης (TEMED). Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS, β-μερκαπτοαιθανόλη). Το SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό το οποίο δεσμεύεται στις πρωτεΐνες, ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών.

Πειραματική διαδικασία

Πριν την ηλεκτροφόρηση, 40μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος διαλύθηκαν σε 2,5 μl ρυθμιστικού διαλύματος LDS (LDS sample buffer) και προστέθηκε 1μl αποδιατακτικού

παράγοντα (Reducing agent). Τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 min για την επίτευξη της πλήρους αποδιάταξής τους. Ακολούθως, προστέθηκε νερό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 20 μl και οι πρωτεΐνες τοποθετήθηκαν σε πάγο ώσπου να ηλεκτροφορηθούν.

Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το NuPAGE MES SDS Running Buffer 20 X (50 mM MES, 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.3) αραιωμένο κατά 20 φορές (50 ml running buffer+950 ml H₂O). Σε 200 ml του αραιωμένου διαλύματος προστέθηκαν 500 μl από τον αντιοξειδωτικό παράγοντα NuPAGE Antioxidant. Αυτός ο παράγοντας έχει τη δυνατότητα να μεταναστεύει μαζί με τις αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες με σκοπό να διατηρεί τις συνθήκες αποδιάταξης και να εμποδίζει την επανοξείδωση ευαίσθητων αμινοξέων, όπως η μεθειονίνη και η τρυπτοφάνη. Το παραπάνω διάλυμα προστέθηκε στον ανώτερο θάλαμο της ηλεκτροφορητικής συσκευής (κάθοδος), ενώ τα υπόλοιπα 800 ml του διαλύματος ηλεκτροφόρησης προστέθηκαν στον κατώτερο θάλαμο (άνοδος).

Έπειτα, τα πρωτεϊνικά δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν στα εμπορικά διαθέσιμα προκατασκευασμένα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris, με τη χρήση ενός προεχρωσμένου δείκτη πρότυπων μοριακών βαρών (SeeBlue Plus2 Prestained Standard). Η ηλεκτροφόρηση διήρκεσε ~50 min, στα 200V και πραγματοποιήθηκε με το σύστημα XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System (Invitrogen). Ακολουθεί η προετοιμασία της συσκευής ηλεκτροφόρησης σύμφωνα με τον οδηγό της κατασκευάστριας εταιρείας, Invitrogen (**Εικ. 10**).

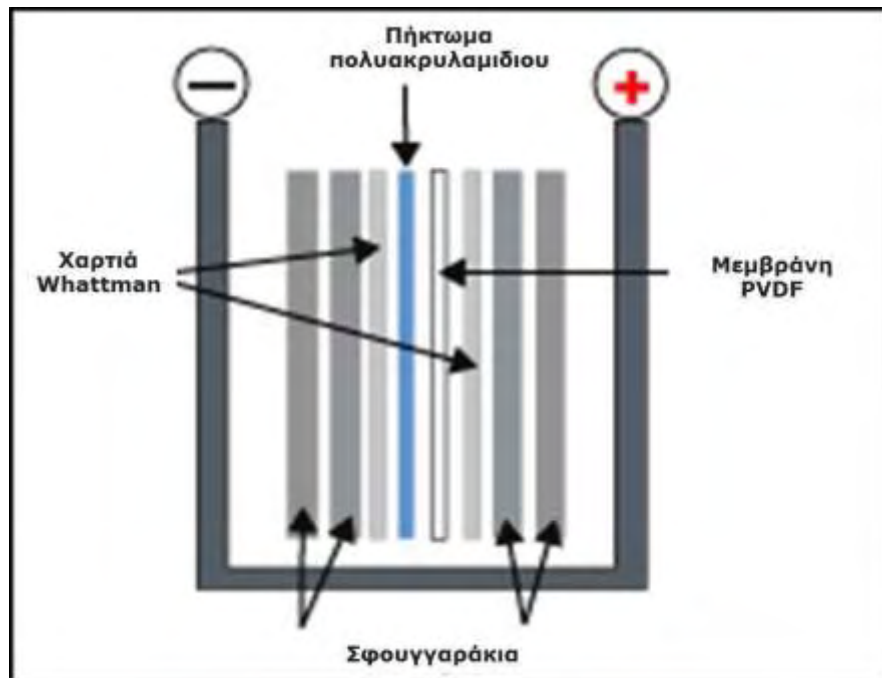


Εικ. 10 Απεικόνιση του τρόπου προετοιμασίας της συσκευής για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων. [<http://www.lifetechnologies.com/1/1/14473-xcell-surelock-mini-cell-xcell-ii-blot-module.html>]

Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Σε αυτό το στάδιο οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF όπου και αποτυπώθηκαν όπως ακριβώς διαχωρίστηκαν στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου κατά την ηλεκτροφόρηση. Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε το πακέτο των μεμβρανών Invitrolon PVDF /Filter Paper Sandwiches, το οποίο περιελάμβανε μεμβράνες και χαρτιά Whattman στις διαστάσεις των προκατασκευασμένων πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου που χρησιμοποιήθηκαν κατά το στάδιο της ηλεκτροφόρησης.

Τα χαρτιά Whattman και τα σφουγγαράκια (filter pads) εμποτίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς που περιείχε 50 ml NuPAGE, Transfer Buffer, 20X, 1 ml NuPAGE Antioxidant, 100 ml μεθανόλης και 849 ml H₂O. Η μεμβράνη εμποτίστηκε σε 100% μεθανόλη για ~20 sec, ακολούθησε πλύση της με δισ απεσταγμένο H₂O για 2 min και, τέλος, εμβάπτισή της στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς για τουλάχιστον 5 min. Στη συνέχεια, το πήκτωμα και η μεμβράνη τοποθετήθηκαν στην ειδική συσκευή υγρής μεταφοράς XCell II™ Blot Module με την εξής σειρά: από την κάθοδο προς την άνοδο: filter pads- Whattman- πήκτωμα- μεμβράνη PVDF- Whattman- filter pads (**Εικ. 11**). Η επίστρωση έγινε με προσοχή ώστε να μην εγκλωβιστούν φυσαλίδες σε κανένα σημείο του sandwich και η συσκευή υγρής μεταφοράς τοποθετήθηκε στο σύστημα XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System. Η μεταφορά διήρκεσε 90 min σε σταθερή τάση, ενώ το ρεύμα έφτασε τα 400 mA.



Εικ. 11 Διάταξη μεμβράνης-πηκτώματος κατά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών.

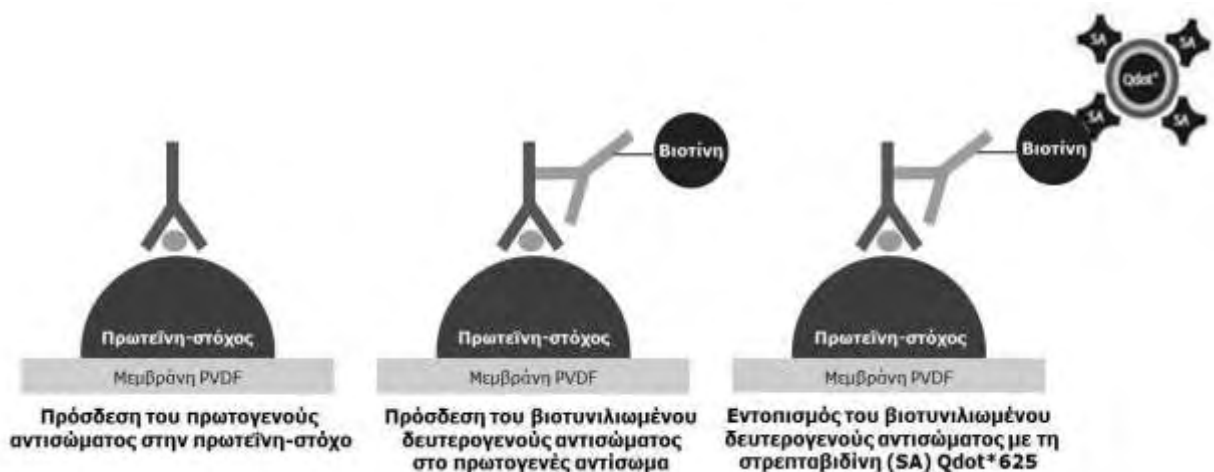
Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς ακολούθησε πλύση της μεμβράνης με δισ απεσταγμένο H₂O και χρώση της με Ponceau S προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη και η ισοφόρτωση ή μη των πρωτεϊνών. Έπειτα η μεμβράνη αποχρωματίστηκε με 2 πλύσεις με 20 mL δισ απεσταγμένου H₂O και 20 mL διαλύματος πλύσης (Wash buffer), που περιείχε 0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 0.5% Tween 20, pH 7.4 (μέρος του πακέτου WesternDot™ 625 Western Blot που χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών).

Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνικών αντιγόνων στη μεμβράνη PVDF

Το πακέτο WesternDot™ 625 Western Blot ενσωματώνει στα κλασσικά πειραματικά πρωτόκολλα τη χρήση νανοκρυστάλλων (QdotR 625) σε συνδυασμό με την υψηλής συγγένειας αλληλεπίδραση στρεπταβιδίνης-βιοτίνης για να επιτρέψει την απλή και εξαιρετικά ευαίσθητη ανίχνευση των πρωτεϊνών σε στυπώματα Western. Το πακέτο περιέχει αντιδραστήρια για την ευαίσθητη ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών ακινητοποιημένων σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης ή PVDF, είτε έτοιμα προς χρήση, όπως το διάλυμα παρεμπόδισης των μη-ειδικών θέσεων σύνδεσης (Blocking buffer) και τα αντισώματα έναντι της βιοτίνης και της στρεπταβιδίνης (προς σύζευξη με τη βιοτίνη), είτε έτοιμα προς αραιώση, όπως το διάλυμα πλύσης (Wash buffer) που για να χρησιμοποιηθεί αραιώνεται 10 φορές με δις απεσταγμένο H₂O.

Το στάδιο ανίχνευσης βασίζεται σε ένα βιοτινυλιωμένο δευτερογενές αντίσωμα ακολουθούμενο από το βασικό στοιχείο σύζευξης, τη στρεπταβιδίνη (**Εικ. 12**). Ο εξαιρετικά υψηλός συντελεστής απόσβεσης των νανοκρυστάλλων σε UV και μπλε μήκη κύματος σε συνδυασμό με υψηλή κβαντική απόδοση κι εκπομπή στο πορτοκαλί/κόκκινο επιτρέπουν την ανίχνευση υπο-νανογραμμαρίων πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας πρότυπα UV ή βασιζόμενα στο κυανό φως συστήματα ανίχνευσης.

Το σήμα φθορισμού είναι συμβατό με τους κοινώς χρησιμοποιούμενους τρόπους ανίχνευσης φθορισμού του DNA ή πηκτωμάτων πρωτεΐνης και δεν απαιτεί εξειδικευμένα φίλτρα εκπομπής.



Εικ. 12 Σχηματική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας του πακέτου WesternDot™ 625 Western Blot. [Τροποποίηση από <http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Protein-Expression-and-Analysis/Western-Blotting/WBlot-misc/WesternDot-Western-Blotting-Kits.html>]

Πειραματική διαδικασία

Αμέσως μετά την πλύση της μεμβράνης με H₂O και Wash buffer (WB) για τον αποχρωματισμό από τη χρωστική Ponceau S, η μεμβράνη τοποθετήθηκε στο ειδικό πιάτο χρώσης (staining dish), το οποίο παρέχεται με το πακέτο WesternDot. Επώαστηκε για 1 ώρα με Blocking buffer προκειμένου να δεσμευτούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης των αντισωμάτων. Ακολούθησε επώαση 4 ωρών σε RT, με το μονοκλωνικό πρωτογενές αντίσωμα (antibody, ab) έναντι της πρωτεΐνης FOXP3 (**Πίνακας 10**), το οποίο ήταν διαλυμένο σε διαλυμένο 1X WB με τελική συγκέντρωση 2μg/ml (1/250). Μετά το τέλος της επώασης πραγματοποιήθηκαν 3 πεντάλεπτες πλύσεις με 15ml 1X WB κι έπειτα προστέθηκαν 4 μl βιοτινυλιωμένου δευτερογενούς αντισώματος διαλυμένου σε 8 ml 1X WB. Η μεμβράνη επώαστηκε για 4 ώρες σε RT, με το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος. Στη συνέχεια, ακολούθησαν 3 πεντάλεπτες πλύσεις με 15ml 1X WB για να πραγματοποιηθεί η δύωρη επώαση σε RT, με 4 μl στρεπταβιδίνης Qdot 625 διαλυμένης σε 8 ml 1X WB. Μετά το πέρας των χρώσεων, ακολούθησε ανίχνευση της πρωτεΐνης FOXP3 (μοριακού βάρους ~50 kDa) μέσω ανίχνευσης του UV σήματος με το σύστημα UV transilluminator (Uvitec, M031308).

Στη συνέχεια, έγιναν 3 πεντάλεπτες πλύσεις της μεμβράνης με 15ml 1X WB και μία τελική με 20 ml H₂O. Έπειτα, η μεμβράνη αποχρωματίστηκε με επώασή της σε 3 ml 1X διαλύματος απομάκρυνσης όλων των προσδεμένων αντισωμάτων (stripping buffer) για 3 min έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η χρώση για το loading control (GAPDH). Ακολουθήθηκε η παραπάνω πειραματική πορεία με κάποιες διαφορές στη συγκέντρωση του πρωτογενούς αντισώματος και στους χρόνους επώασης των αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε επώαση μιας ώρας, σε RT, με το μονοκλωνικό πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης GAPDH (**Πίνακας 10**) (μοριακού βάρους ~38 kDa), το οποίο ήταν διαλυμένο σε 1X WB (1/5000). Η επώαση με το βιοτινυλιωμένο δευτερογενές αντίσωμα διήρκεσε μία ώρα ενώ με τη στρεπταβιδίνη 45 min. Ο τρόπος ανίχνευσης του σήματος φθορισμού παρέμεινε ο ίδιος.

2.5 Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Η ανοσοϊστοχημεία είναι ένας κλάδος της ιστοπαθολογίας, που ασχολείται με την ανίχνευση και ταυτοποίηση *in situ* φυσιολογικών ή παθολογικών χαρακτηριστικών των κυττάρων ή των ιστών. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση αντισωμάτων έναντι αντιγόνων, τα οποία συνδέονται με χρωστικές που καθιστούν ορατές τις θέσεις που εντοπίζονται τα αντιγόνα αυτά. Βασίζεται στη χρησιμοποίηση της συγγένειας (affinity) των αντισωμάτων για τα αντίστοιχα αντιγόνα τους και την υψηλή ειδικότητα (specificity) της δέσμευσης αντιγόνου-αντισώματος. Σήμερα είναι διαθέσιμες πολλές εναλλακτικές

τεχνικές για την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των αντιγόνων. Η επιλογή της κατάλληλης κάθε φορά μεθόδου θα πρέπει να βασίζεται τόσο στο είδος του υπό μελέτη δείγματος, όσο και στο βαθμό της ευαισθησίας που απαιτείται. Οι τεχνικές αυτές είναι γνωστές ως ανοσοενζυμικές και οι πιο σημαντικές είναι η τεχνική της ανοσοϋπεροξειδάσης, της αβιδίνης-βιοτίνης και της στρεπταβιδίνης-βιοτίνης. Με την ανοσοϊστοχημεία μπορούν να ανιχνευτούν ταυτόχρονα στην ίδια τομή ιστού αντιγόνα περισσότερα του ενός. Η χρήση των κατάλληλα σημασμένων αντισωμάτων (υπό αυστηρές συνθήκες) οδηγεί στην *in situ* σήμανση και ανίχνευση των αντίστοιχων κυτταρικών αντιγόνων, είτε πρόκειται για αντιγόνα επιφάνειας, είτε εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα σε ελεύθερη ή δεσμευμένη μορφή.

Πριν την εφαρμογή των ανοσοϊστοχημικών μεθόδων θα πρέπει να πραγματοποιηθούν οι εξής διαδικασίες:

α) η μονιμοποίηση του ιστού, που τον προστατεύει από αυτόλυση και βακτηριακή μόλυνση και τον σταθεροποιεί για τα επόμενα στάδια. Αυτό το στάδιο περιλαμβάνει θέρμανση και επώαση με ξυλένιο και αλκοόλη, αντιδραστήρια τα οποία συνήθως οδηγούν στην «απόκρυψη» των επιτόπων. Καθώς, όμως, η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται ευρύτατα στα κλινικά δείγματα, τα τελευταία 20 χρόνια έχουν αναπτυχθεί τεχνικές ανάκτησης των επιτόπων οι οποίες έχουν επιτρέψει και τη μελέτη αρχειακών δειγμάτων.³¹²

β) η έγκλειση του ιστού, που είναι απαραίτητη για την αύξηση της σκληρότητάς του, ώστε να μπορεί να κοπεί σε λεπτές τομές. Τα πιο συνηθισμένα υλικά γι' αυτό το σκοπό είναι η παραφίνη και η ζελατίνη

γ) και το κόψιμο σε λεπτές τομές με τη βοήθεια μικροτόμου.

Η έκφραση των πρωτεϊνών FOXP3, PD1, PDL1, CD4 και CD8 μελετήθηκε σε 15 νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΧΗΒ και σε 12 ασθενείς με ΧΗΒ που είχαν λάβει αντι-ιϊκή θεραπεία και βρίσκονταν σε παρατεταμένη ύφεση του νοσήματος. Η αναγνώριση των παραπάνω δεικτών πραγματοποιήθηκε σε τομές πάχους 4μm με την τεχνική της ανοσοϋπεροξειδάσης με τη χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Η ανίχνευση των πρωτεϊνικών αντιγόνων των FOXP3, PDL1, CD4, και CD8 πραγματοποιήθηκε στο αυτοματοποιημένο σύστημα ανοσοϊστοχημικής χρώσης, Bond (Automated Bond system, Menarini) με τη χρήση του πακέτου ανίχνευσης Bond polymer refine (Bond polymer refine detection kit, DS9800, Newcastle, UK), ενώ η ανίχνευση του PD1 πραγματοποιήθηκε στο αυτοματοποιημένο σύστημα DAKO (DAKO autostainer), με τη χρήση του πακέτου Envision Flex Plus (Envision Flex Plus kit, K8010, DAKO, Glostrup, Denmark), σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Στον

Πίνακα 10 παρατίθενται τα πρωτογενή μονοκλωνικά αντισώματα και οι αραιώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 10. *Αντισώματα και αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοϊστοχημική μελέτη.*

Αντιγόνο	Κλώνος αντισώματος	Αραίωση	Κατασκευαστής
FOXP3	ab22510	1:50	Abcam (Cambridge, UK)
PD1	ab52587	1:25	Abcam (Cambridge, UK)
PDL1	29E.2A3	1:30	Biolegend (Athens, Greece)
CD4	NCL-L-CD4-1F6	1:20	Novocastra (Athens, Greece)
CD8	C8/144B	1:50	DAKO (Glostrup, Denmark)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Η έκφραση του *FOXP3* στις ηπατοπάθειες

3.1.1 Γονιδιακή έκφραση στα ηπατικά νοσήματα

Στην προσπάθεια της διερεύνησης του ρόλου της ανοσορρύθμισης στην παθογένεια της ηπατικής βλάβης στη ΧΗΒ και ΧΗC και στην επαγόμενη από απόπτωση φλεγμονή, μελετήθηκε, με real-time PCR, η μεταγραφική έκφραση σημαντικών μορίων τόσο για τον αποπτωτικό θάνατο και την ηπατική φλεγμονή όσο και μόρια-δείκτες των ρυθμιστικών κυττάρων.

Αναλυτικά, σε μέρος του συνόλου των ασθενών με ηπατοπάθειες (**Πίνακας 11**), μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου *FOXP3*, που χαρακτηρίζει, κυρίως, τα θυμικής προέλευσης CD4⁺ tTregs (§ 1.1), καθώς και των γονιδίων *IL10* και *TGFB1* που χαρακτηρίζουν τα επαγόμενα στην περιφέρεια Tr1 και Th3 pTregs (§ 1.2), αντίστοιχα. Τα παραπάνω γονίδια μελετήθηκαν σε σχέση με την έκφραση κύριων μεσολαβητών της απόπτωσης, όπως είναι ο *FAS*, ο συνδέτης του *FASL*, ο *TNFA*, και ο συνδέτης *TRAIL*.

Επιπρόσθετα, προκειμένου να διευκρινιστεί κατά πόσον η έκπτυξη των Tregs είναι ένα χαρακτηριστικό εύρημα της χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας, εξετάστηκε η έκφραση του *FOXP3* σε βιοψίες ήπατος ασθενών με άλλες ηπατικές νόσους, συμπεριλαμβανομένης της NAFLD, της ΑΗ, της ΡΒC, και της ηπατικής τοξικότητας λόγω λήψης MTX.

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 12** και στην **Εικόνα 13Α**, οι ασθενείς με ΧΗΒ και ΧΗC, καθώς και εκείνοι με τις άλλες ηπατοπάθειες (NAFLD, ΑΗ, ΡΒC, και MTX-σχετιζόμενης ηπατοτοξικότητας) παρουσίασαν μια στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του *FOXP3* mRNA σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Σε καμία από τις ομάδες ασθενών, η έκφραση *FOXP3* δε φάνηκε να συσχετίζεται με τα επίπεδα της ALT ή της AST στον ορό και το ιϊκό φορτίο (HBV DNA στον ορό ή HCV RNA). Η έκφραση του *FOXP3* επιβεβαιώθηκε επίσης με ανοσοαποτύπωση κατά Western (**Εικ. 13Β**). Για να διαπιστωθούν τυχόν μεταβολές στην έκφραση συγκεκριμένων διαμεσολαβητών της απόπτωσης, εξετάστηκαν τα επίπεδα mRNA των *FAS*, *FASL*, *TRAIL*, *TNFA*, και *CASP3*. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του mRNA του *FASL* στις ηπατικές βιοψίες από όλες τις ομάδες των ασθενών συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (**Πίνακας 12**).

Πίνακας 11. Κλινικά και ορολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

	Φυσιολογικοί μάρτυρες	Χρόνια ηπατίτιδα Β		Χρόνια ηπατίτιδα C	NAFLD ^α	Αυτοάνοσες ηπατοπάθειες ^β	MTX- ηπατοτοξικότητα ^γ
		Διάγνωση	Υποτροπή				
<i>Αρ. δειγμάτων</i>	8	19	7	14	11	8	2
<i>Φύλο (Α/Θ)^δ</i>	5/3	9/10	4/3	11/3	6/5	2/6	0/2
<i>Ηλικία (δτ^ε, εύρος)</i>	54, 27-67	54, 24-64	56, 22-65	40, 27-50	42, 21-66	57, 37-73	66, 60-72
<i>AST (U/μl)^{στ} (δτ^ε, εύρος)</i>	42, 36-45	51, 17-1969	39, 31-277	41, 24-218	31, 19-63	49, 30-225	32,5, 24-41
<i>ALT (U/ml)^ζ (δτ^ε, εύρος)</i>	32, 21-48	61, 15-1478	70, 32-332	75, 32-213	41, 15-141	41,5, 31-212	28,4, 17-40
Βαθμός φλεγμονής^η							
<i>I-0</i>	8	–	–	–	3	–	–
<i>I-1</i>	–	4	–	2	3	–	2
<i>I-2</i>	–	8	6	6	5	–	–
<i>I-3</i>	–	5	1	6	–	3	–
<i>Ίνωση^η (δτ^ε, εύρος)</i>	0	4 (0-6)	3 (1-5)	2,5 (1-4)	0 (0-2)	6 (2-6)	1 (1-1)
<i>Βαθμός HAI (δτ^ε, εύρος)</i>		8 (1-15)	8 (5-11)	7 (2-12)	2 (0-5)		
<i>Ίικό φορτίο (δτ^ε, εύρος)</i>		4 Meq/mL, 0,0016-699	0,07 Meq/mL (0-44,5)	0,66 Meq/mL (0,06-6,20)			

^α NAFLD: μη αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος, ^β Η ομάδα με τις αυτοάνοσες ηπατοπάθειες αποτελείται από 4 ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και 4 με πρωτοπαθή χολική κίρρωση, ^γ MTX-ηπατοτοξικότητα: ηπατοτοξικότητα σχετιζόμενη με τη λήψη μεθοτρεξάτης, ^δ Α: Άρρενες και Θ: Θήλειες, ^ε δτ: διάμεση τιμή, ^{στ} AST: ασπαραγινική τρανσαμινάση, ^ζ ALT: τρανσαμινάση της αλανίνης, ^η Ο βαθμός φλεγμονής (**I-0**: απουσία φλεγμονής, **I-1**: ελάχιστη φλεγμονή, **I-2**: ήπια φλεγμονή, **I-3**: μέτρια φλεγμονή, **I-4**: έντονη φλεγμονή) και ίνωσης αξιολογήθηκε όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και μεθοδολογία της Έρευνας- Ιστολογική εξέταση βιοψιών ήπατος».

Πίνακας 12. Σχετική έκφραση των υπό εξέταση γονιδίων

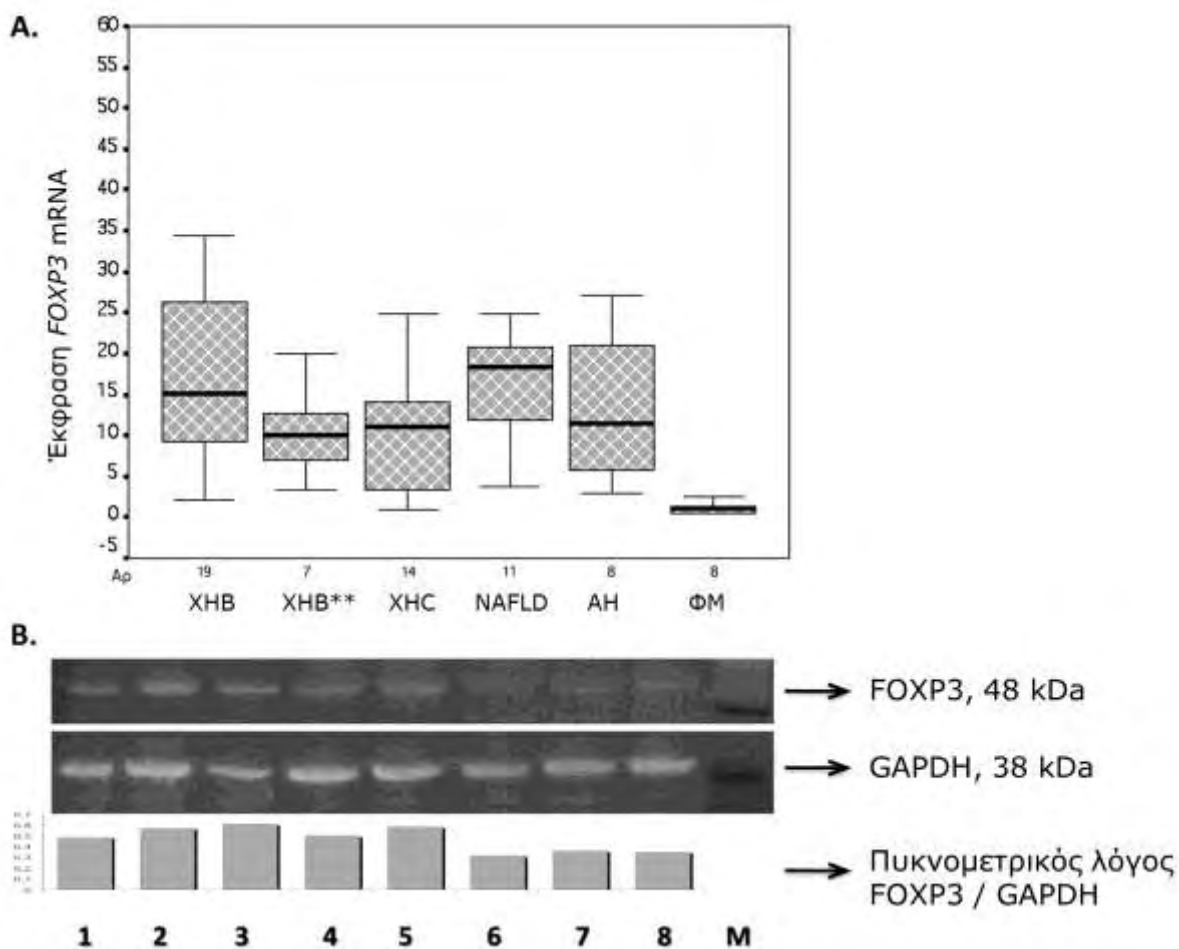
Γονίδιο	Φυσιολογικοί μάρτυρες (αρ. 8)	Χρόνια ηπατίτιδα Β		Χρόνια ηπατίτιδα C (αρ. 14)	NAFLD ^δ (αρ. 11)	Αυτοάνοσες ηπατοπάθειες ^ε (αρ. 8)	MTX- ηπατοτοξικότητα ^{στ} (αρ. 2)
		Διάγνωση (αρ. 19)	Υποτροπή (αρ. 7)				
		μτ ^α ± σα ^β	μτ ^α ± σα ^β				
		τιμή <i>p</i> ^γ	τιμή <i>p</i> ^γ	τιμή <i>p</i> ^γ	τιμή <i>p</i> ^γ	τιμή <i>p</i> ^γ	
<i>FOXP3</i>	1,11 ± 0,71	20,3 ± 16,0 < 0,001	10,4 ± 5,47 0,001	12,7 ± 12,3 0,001	18,4 ± 11,9 <0,001	16,0 ± 15,2 0,001	28,4 ± 27,8
<i>TGFB1</i>	1,56 ± 1,49	1,10 ± 0,84 0,710	0,53 ± 0,31 0,053	0,73 ± 0,58 0,065	1,60 ± 1,01 0,620	1,43 ± 1,04 0,834	0,72 ± 0,17
<i>IL10</i>	1,50 ± 1,02	0,66 ± 1,33 0,011	0,20 ± 0,24 0,016	0,48 ± 0,77 0,017	0,79 ± 0,77 0,131	0,64 ± 0,94 0,093	0,59 ± 0,62
<i>FAS</i>	0,82 ± 0,24	2,25 ± 0,70 < 0,001	2,12 ± 0,78 0,003	1,55 ± 1,07 0,179	3,51 ± 1,17 <0,001	1,56 ± 0,94 0,132	4,14 ± 0,41
<i>FASL</i>	1,05 ± 1,47	4,20 ± 2,05 0,001	3,05 ± 1,98 0,028	4,20 ± 4,09 0,004	3,94 ± 4,42 0,004	4,33 ± 3,69 0,008	0,49 ± 0,9
<i>TRAIL</i>	2,89 ± 2,04	7,28 ± 4,34 0,007	11,3 ± 6,29 0,015	8,86 ± 4,56 0,001	15,3 ± 6,64 <0,001	3,52 ± 2,11 0,355	15,3 ± 12,7

^α μτ: μέση τιμή, ^β σα: σταθερή απόκλιση, ^γ Η στατιστική σημαντικότητα (*p*) αναφέρεται στη σύγκριση με τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των φυσιολογικών μαρτύρων σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney U, ^δ NAFLD: μη αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος, ^ε Η ομάδα με τις αυτοάνοσες ηπατοπάθειες αποτελείται από 4 ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και 4 με πρωτοπαθή χολική κίρρωση, ^{στ} MTX-ηπατοτοξικότητα: ηπατοτοξικότητα σχετιζόμενη με τη λήψη μεθοτρεξάτη.

Πίνακας 12. Σχετική έκφραση των υπό εξέταση γονιδίων (συνέχεια)

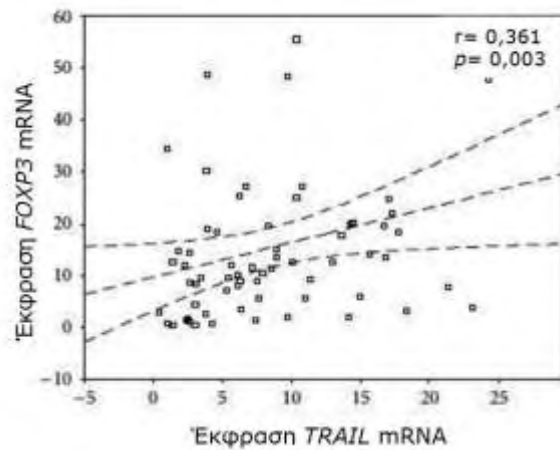
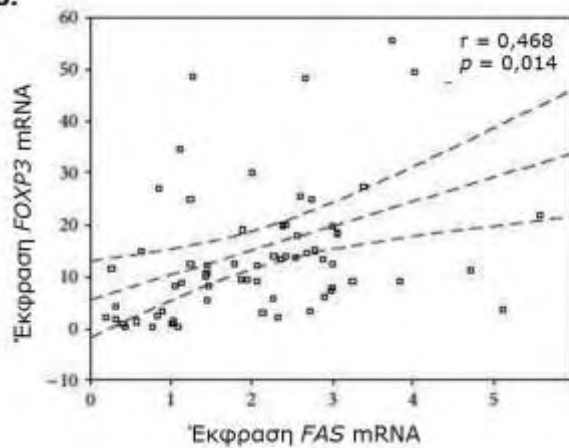
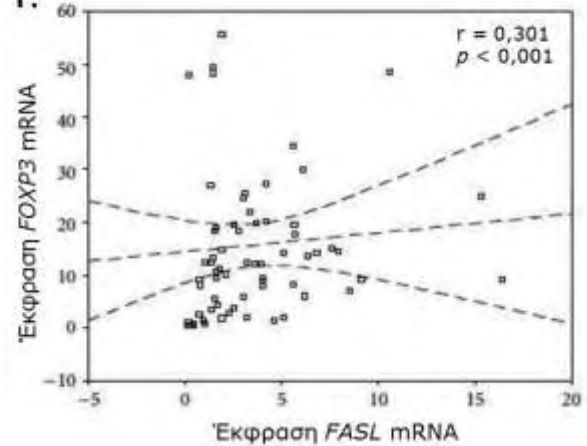
Γονίδιο	Φυσιολογικοί μάρτυρες (αρ. 8)	Χρόνια ηπατίτιδα Β		Χρόνια ηπατίτιδα C (αρ. 14)	NAFLD ^δ (αρ. 11)	Αυτοάνοσες ηπατοπάθειες ^ε (αρ. 8)	MTX- ηπατοτοξικότητα ^{στ} (αρ. 2)
		Διάγνωση (αρ. 19)	Υποτροπή (αρ. 7)				
		μτ ^α ± σα ^β	μτ ^α ± σα ^β				
		τιμή <i>p</i> ^γ	τιμή <i>p</i> ^γ	τιμή <i>p</i> ^γ	τιμή <i>p</i> ^γ	τιμή <i>p</i> ^γ	τιμή <i>p</i> ^γ
<i>CASP3</i>	1,87 ± 1,85	1,13 ± 0,74 0,915	0,76 ± 0,43 0,366	1,66 ± 1,34 0,700	1,97 ± 1,05 0,283	3,19 ± 2,23 0,093	2,28 ± 0,66
<i>TNFA</i>	3,43 ± 4,70	1,77 ± 3,12 0,307	1,54 ± 1,93 0,201	2,73 ± 3,58 0,544	8,17 ± 11,0 0,480	6,63 ± 9,11 0,186	1,21 ± 0,93
<i>IFNG</i>	1,92 ± 1,77	5,47 ± 5,99 0,202	4,17 ± 2,46 0,186	2,19 ± 1,77 0,628	4,18 ± 4,93 0,572	8,43 ± 7,25 0,059	0,37 ± 0,26
<i>IL1B</i>	1,37 ± 1,05	0,51 ± 1,39 0,022	0,41 ± 0,66 0,055	0,33 ± 0,26 0,042	0,99 ± 0,95 0,322	1,15 ± 1,12 0,571	0,30 ± 0,23

^α μτ: μέση τιμή, ^β σα: σταθερή απόκλιση, ^γ Η στατιστική σημαντικότητα (*p*) αναφέρεται στη σύγκριση με τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των φυσιολογικών μαρτύρων σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney U, ^δ NAFLD: μη αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος, ^ε Η ομάδα με τις αυτοάνοσες ηπατοπάθειες αποτελείται από 4 ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και 4 με πρωτοπαθή χολική κίρρωση, ^{στ} MTX-ηπατοτοξικότητα: ηπατοτοξικότητα σχετιζόμενη με τη λήψη μεθοτρεξάτη.



Εικ. 13 Η έκφραση του *FOXP3* στα υπό μελέτη ηπατικά νοσήματα. **A.** Θηκογράμματα της σχετικής έκφρασης του *FOXP3* στις διάφορες υπο-κατηγορίες νοσημάτων (*XHB*: χρόνια ηπατίτιδα Β, *XHB***: χρόνια ηπατίτιδα Β σε υποτροπή, *XHC*: χρόνια ηπατίτιδα C, *NAFLD*: μη αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος, *AH*: αυτοάνοσες ηπατοπάθειες (αυτοάνοση ηπατίτιδα και πρωτοπαθής χολική κίρρωση) και *ΦΜ*: φυσιολογικοί μάρτυρες), **B.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western της πρωτεϊνικής έκφρασης του *FOXP3* και της πρωτεΐνης-μάρτυρα *GAPDH*. *Στήλη 1*: ασθενής με *XHC*; *Στήλες 2 και 3*: ασθενείς με *XHB*; *Στήλη 4*: ασθενής με *NAFLD*; *Στήλη 5*: ασθενής με *AH* (αυτοάνοση ηπατίτιδα); *Στήλες 6-8*: φυσιολογικοί μάρτυρες; *M*: μάρτυρας μοριακών βαρών (SeeBlue Plus2 Prestained Standard; Invitrogen, UK).

Επιπλέον, η έκφραση του *FAS* ήταν σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με *XHB* και *NAFLD*, ενώ η έκφραση του *TRAIL* παρουσίασε σημαντική αύξηση σε όλους τους ασθενείς, εκτός από εκείνους με αυτοάνοσα νοσήματα (**Πίνακας 12**). Θετικές συσχετίσεις παρατηρήθηκαν μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του *FOXP3* με την έκφραση των *TRAIL* ($p = 0,003$) (**Εικ. 14Α**), *FAS* ($p = 0,014$) (**Εικ. 14Β**) και *FASL* ($p < 0,001$) (**Εικ. 14Γ**) και μεταξύ των *FAS* και *TRAIL* ($p < 0,001$) και *FASL* και *IFNG* ($p < 0,001$), ανεξάρτητα από την αιτία της ηπατικής βλάβης (ϊικής, λιπώδους, αυτοάνοσης ή *MTX*-σχετιζόμενης αιτιολογίας).

A.**B.****Γ.**

Εικ. 14 Αποτελέσματα της ανάλυσης συσχέτισης κατά Spearman. Παρατηρούνται θετικές συσχετίσεις μεταξύ των FOXP3 και TRAIL (**A**), FOXP3 και FAS (**B**) και FOXP3 και FASL (**Γ**) σε όλες τις ομάδες των ηπατικών νοσημάτων.

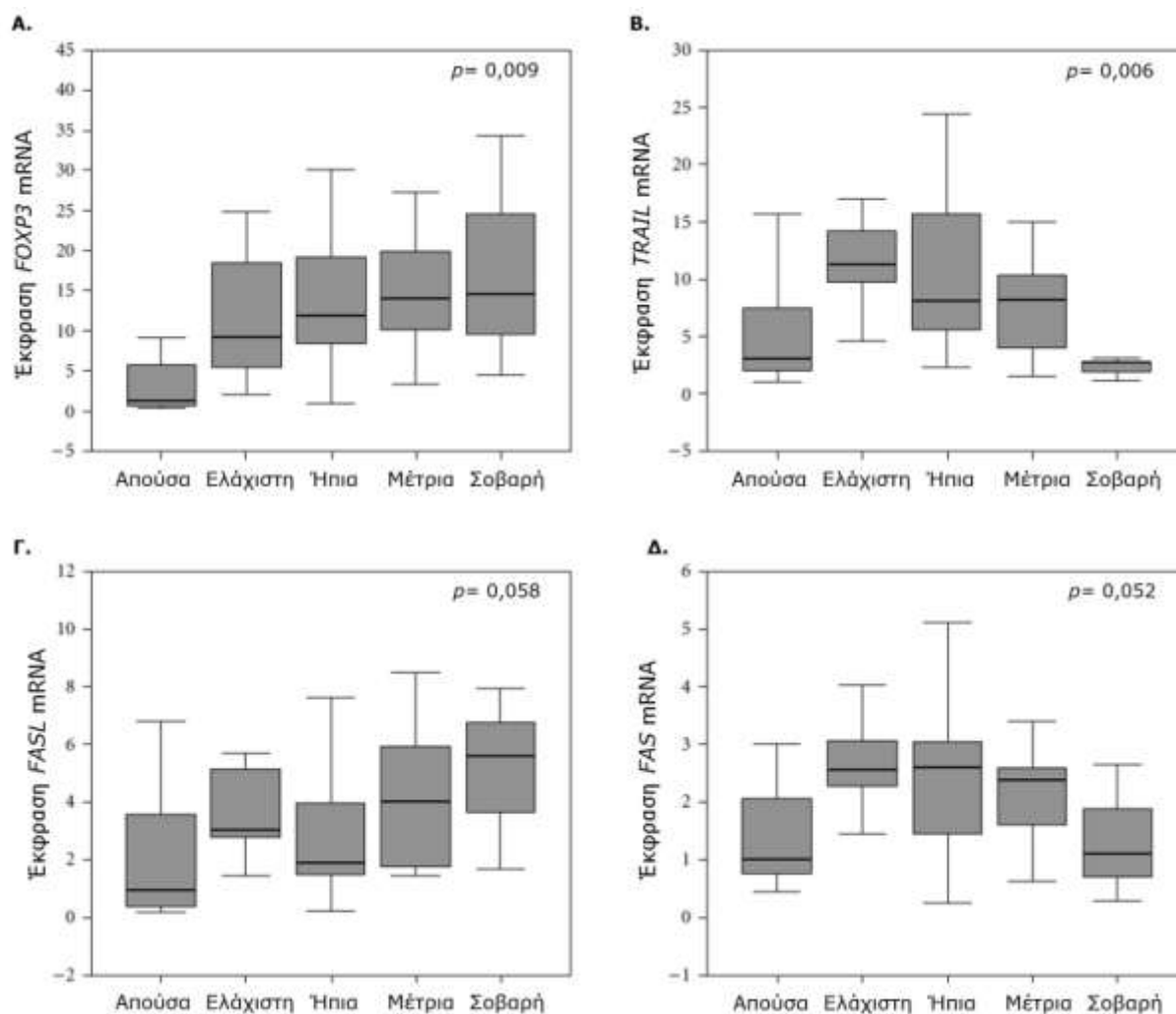
Οι ασθενείς με ΧΗΒ και ΧΗC εμφάνισαν περίπου 3 φορές χαμηλότερα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης της *IL10* σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (**Πίνακας 12**). Μάλιστα, τα επίπεδα έκφρασης της *IL10* των ασθενών με ιογενή ηπατίτιδα δεν ήταν σημαντικά διαφορετικά από εκείνα των ασθενών με NAFLD. Συγκριτικά με τους φυσιολογικούς μάρτυρες, οι ασθενείς με NAFLD, καθώς και αυτοί με αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα και MTX-σχετιζόμενης τοξικότητας, παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα *IL10*. Ωστόσο, αυτή η μείωση δεν άγγιξε το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας (**Πίνακας 12**). Επιπλέον, τα μεταγράφα της *IL1B* ήταν σημαντικά μειωμένα στους ασθενείς με ΧΗΒ και ΧΗC κατά τη διάγνωση σε σχέση με αυτά των φυσιολογικών μαρτύρων (**Πίνακας 12**), ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην έκφραση του *TGFB1* ανάμεσα στις διάφορες ομάδες των ασθενών με ηπατοπάθειες και στους υγιείς μάρτυρες (**Πίνακας 13**). Ωστόσο, βρέθηκαν σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του *TGFB1* και των γονιδίων *FAS*, *IL10*, *TNFA*, και της *IL1B* ($p < 0,05$, σε όλες τις περιπτώσεις).

Σε αυτό το σημείο, πρέπει να τονιστεί ότι ένας ασθενής ΧΗΒ με ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα *FOXP3* mRNA (25 φορές υψηλότερη από εκείνη του δείγματος αναφοράς) εμφάνισε, επίσης, υψηλή μεταγραφική έκφραση των γονιδίων *IL10* και *TGFB1* (περίπου 6 φορές και 4 φορές υψηλότερη από εκείνη του δείγματος αναφοράς, αντίστοιχα). Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν σε επανειλημμένες Q-RT-PCR αναλύσεις και αξίζει να αναφερθεί πως αυτός ο ασθενής δεν διέφερε από τους υπόλοιπους με ΧΗΒ σε οποιαδήποτε κλινική ή εργαστηριακή παράμετρο.

Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης όλων των γονιδίων στα βιοπτικά δείγματα των 7 ασθενών με ΧΗΒ μετά από θεραπεία, κατά τη διάρκεια της υποτροπής της νόσου, δε διέφεραν από τα αντίστοιχα επίπεδα των ασθενών με ΧΗΒ κατά τη διάγνωση.

3.1.2 Γονιδιακή έκφραση σε σχέση με τη φλεγμονή και την ίνωση

Λαμβάνοντας υπόψη ότι δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων ομάδων ασθενών σε σχέση με την έκφραση των γονιδίων που αναλύθηκαν, θεωρήσαμε όλα τα υποκείμενα της μελέτης ως μια ενιαία ομάδα, σε μια προσπάθεια να διερευνηθούν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων και της έντασης της φλεγμονής. Σε σχέση λοιπόν με την ένταση της φλεγμονής, το *FOXP3* εμφάνισε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής του από το φυσιολογικό ήπαρ προς το σοβαρά φλεγμαίνοντα ιστό (**Εικ. 15**). Αυτό το πρότυπο έκφρασης ήταν σχεδόν παρόμοιο για το γονίδιο *FASL* (**Εικ. 15**). Από την άλλη πλευρά, τα γονίδια *FAS* και *TRAIL* εμφάνισαν ένα διαφορετικό πρότυπο έκφρασης, όπου, σε σύγκριση με τους ασθενείς του σταδίου I-0 (χωρίς μακροσκοπικά στοιχεία φλεγμονής), οι ασθενείς με ελάχιστη έως μέτρια φλεγμονή (στάδιο I-1 έως I-3) εμφάνισαν μία στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής τους, που επέστρεψε στα επίπεδα του σταδίου I-0, όταν η φλεγμονή κατέστη σοβαρή (στάδιο I-4) (**Εικ. 15**). Τα γονίδια της *IL10* και του *TGFB1* δεν εμφάνισαν καμία στατιστικά σημαντική αλλαγή της μεταγραφικής έκφρασής τους σε σχέση με την ένταση της φλεγμονής. Στο σημείο αυτό, πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπήρχε κανένας ασθενής με NAFLD που να χαρακτηρίζεται από μέτρια ή σοβαρή φλεγμονή. Δηλαδή, όλοι οι ασθενείς που κατηγοριοποιήθηκαν ως I-3 και I-4 σταδίου φλεγμονής αντιπροσωπεύουν τα άτομα με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα και αυτοάνοση κίρρωση (**Πίv.11**). Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του mRNA των γονιδίων *FOXP3*, *FASL* και *IFNG* με την ίνωση ($p = 0,003$, $p = 0,004$ και $p = 0,013$, αντίστοιχα.).



Εικ. 15 Τα θηκογράμματα παρουσιάζουν τη σχετική έκφραση, σε μεταγραφικό επίπεδο, των γονιδίων *FOXP3* και των μεσολαβητών της απόπτωσης ανάλογα με την ένταση της φλεγμονής του ήπατος. Παρόμοια πρότυπο έκφρασης με το *FOXP3* ακολουθεί το γονίδιο *FASL*, αλλά όχι τα *FAS* και *TRAIL*. Η τιμή στατιστικής σημαντικότητας (p) που αναγράφεται σε κάθε διάγραμμα αναφέρεται στη στατιστική δοκιμασία Kruskal-Wallis H.

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η σταδιοποίηση της ίνωσης συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα έκφρασης της *IL10* ($p = 0,003$) και της *CASP3* ($p = 0,013$), αλλά όχι με την έκφραση του *TGFB1* και άλλων μεσολαβητών της απόπτωσης ($p > 0,05$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της *IL1B* με τα επίπεδα των γονιδίων *TNFA* και *CASP3* ($p < 0,001$ και στις δύο περιπτώσεις).

Συνοπτικά, αποδείξαμε ότι η έκφραση του *FOXP3* στο ήπαρ συσχετίζεται θετικά με την ένταση της φλεγμονής σε συνδυασμό με ένα συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης mRNA των μεσολαβητών της απόπτωσης *FAS*, *FASL* και *TRAIL*, ανεξάρτητα από την αιτία της ιστικής βλάβης (ιογενούς, τοξικής ή αυτοάνοσης αιτιολογίας), γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να αποτελεί συνοδό και όχι αιτιολογικό φαινόμενο της χρόνιας φλεγμονής.

3.2 Γονιδιακή έκφραση στη Χρόνια Ηπατίτιδα Β σε μακροχρόνια ύφεση

Στη συνέχεια, θελήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσον η επιτυχής μακροπρόθεσμη αντι-ϊική θεραπεία σε ασθενείς με HBeAg αρνητικής ΧΗΒ λοίμωξης μπορεί να επηρεάσει και να καταστείλει τα φαινόμενα της ανοσορρύθμισης και της επαγόμενης από απόπτωση φλεγμονής. Για το σκοπό αυτό, εξετάστηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *FOXP3*, *IL10* και *TGFB1* (δείκτες Tregs), *CD4* και *CD8* (δείκτες των Τ-κυττάρων), των φλεγμονωδών κυτταροκινών *IL1B* και *TNFA*, κυτταροκινών σχετικών με την αποκατάσταση της λειτουργίας των Teffs, όπως η *IL2* και η *IFNG* και των μεσολαβητών της απόπτωσης *FAS*, *FASL* και *TRAIL*. Επιπρόσθετα, μελετήσαμε ακόμα ένα σημαντικό μονοπάτι απόπτωσης που εμπλέκεται στην δυσλειτουργία Teffs στο ήπαρ, δηλαδή το PD1/PDL1. Τα κλινικά δεδομένα των ασθενών που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 13**.

Πίνακας 13. Κλινικά και ορολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΧΗΒ

	ΧΗΒ ^α στη διάγνωση	ΧΗΒ ^α σε μακροχρόνια ύφεση
Αρ. δειγμάτων	30	23
Φύλο (Α/Θ) ^β	13/17	18/5
Ηλικία (δτ ^γ , εύρος)	43, 21-64	52, 23-73
AST (U/μl) ^δ (δτ ^γ , εύρος)	54, 17-1969	24, 15-51
ALT (U/ml) ^ε (δτ ^γ , εύρος)	58, 15-1478	27, 15-49
Βαθμός φλεγμονής^{στ}		
I-0	–	1
I-1	8	18
I-2	14	4
I-3	6	–
I-4	2	–
Ίνωση ^{στ} (δτ ^γ , εύρος)	2,5, 0-6	2,0, 0-4
Βαθμός HAI (δτ ^γ , εύρος)	5,5, 1-15	2,0, 0-7
Ίικό φορτίο (δτ ^γ , εύρος)	0,1 Meq/mL, 0,0016-699	0 Meq/mL, 0-0.008

^α ΧΗΒ: χρόνια ηπατίτιδα Β, ^β Α: Άρρενες και Θ: Θήλειες, ^γ δτ: διάμεση τιμή, ^δ AST: ασπαραγινική τρανσαμινάση, ^ε ALT: τρανσαμινάση της αλανίνης, ^{στ} Ο βαθμός φλεγμονής (**I-0**: απουσία φλεγμονής, **I-1**: ελάχιστη φλεγμονή, **I-2**: ήπια φλεγμονή, **I-3**: μέτρια φλεγμονή, **I-4**: έντονη φλεγμονή) και ίνωσης αξιολογήθηκε όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και μεθοδολογία της Έρευνας- Ιστολογική εξέταση βιοψιών ήπατος».

3.2.1 Γονιδιακή έκφραση πριν και μετά από αντι-ϊική θεραπεία

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 16**, οι ασθενείς με ΧΗΒ που έλαβαν θεραπεία και βρίσκονται σε διατηρουμένη ύφεση του νοσήματος (ιολογική, βιοχημική και ιστοχημική), για τουλάχιστον 5 έτη, παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένα επίπεδα mRNA των γονιδίων *FOXP3*, *IL10*, *TGFB1*, *FASL*, *PD1*, *PDL1* και *CD8A*, καθώς επίσης αυξημένα επίπεδα του γονιδίου *TRAIL*, σε σύγκριση με τους ασθενείς με ενεργή νόσο, κατά τη διάγνωση. Τα επίπεδα έκφρασης της *IL2* και *IFNG*, επίσης μειώθηκαν, χωρίς ωστόσο να μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά (**Πίνακας 14**). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η μεταβολή της έκφρασης του *FOXP3* δεν συνοδεύεται από ανάλογη μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *CD4*.

Πίνακας 14. Σχετική έκφραση των υπό εξέταση γονιδίων

Γονίδιο	ΧΗΒ ^α στη διάγνωση (αρ. 30)	ΧΗΒ ^α σε μακροχρόνια ύφεση (αρ. 23)
	μτ ^β ± σα ^γ	μτ ^β ± σα ^γ τιμή <i>p</i> ^δ
<i>FOXP3</i>	16,5 ± 19,8	5,1 ± 4,1 0,003
<i>TGFB1</i>	0,7 ± 0,8	0,5 ± 0,4 0,037
<i>IL10</i>	1,6 ± 5,9	0,2 ± 0,4 0,019
<i>FAS</i>	1,8 ± 0,9	1,8 ± 0,9 0,747
<i>FASL</i>	5,0 ± 6,4	2,3 ± 2,2 0,009
<i>TRAIL</i>	6,7 ± 4,2	10,7 ± 4,2 0,002
<i>PD1</i>	5,4 ± 12,9	0,4 ± 0,2 < 0,001
<i>PDL1</i>	0,5 ± 0,6	0,1 ± 0,1 0,002
<i>PDL2</i>	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,2 0,394
<i>IL2</i>	63,5 ± 226,9	7,0 ± 6,2 0,647
<i>TNFA</i>	35,9 ± 100,1	22,7 ± 36,7 0,342

^α ΧΗΒ: χρόνια ηπατίτιδα Β; ^β μτ: μέση τιμή, ^γ σα: σταθερή απόκλιση, ^δ Η τιμή στατιστικής σημαντικότητας (*p*) αναφέρεται στη στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney U.

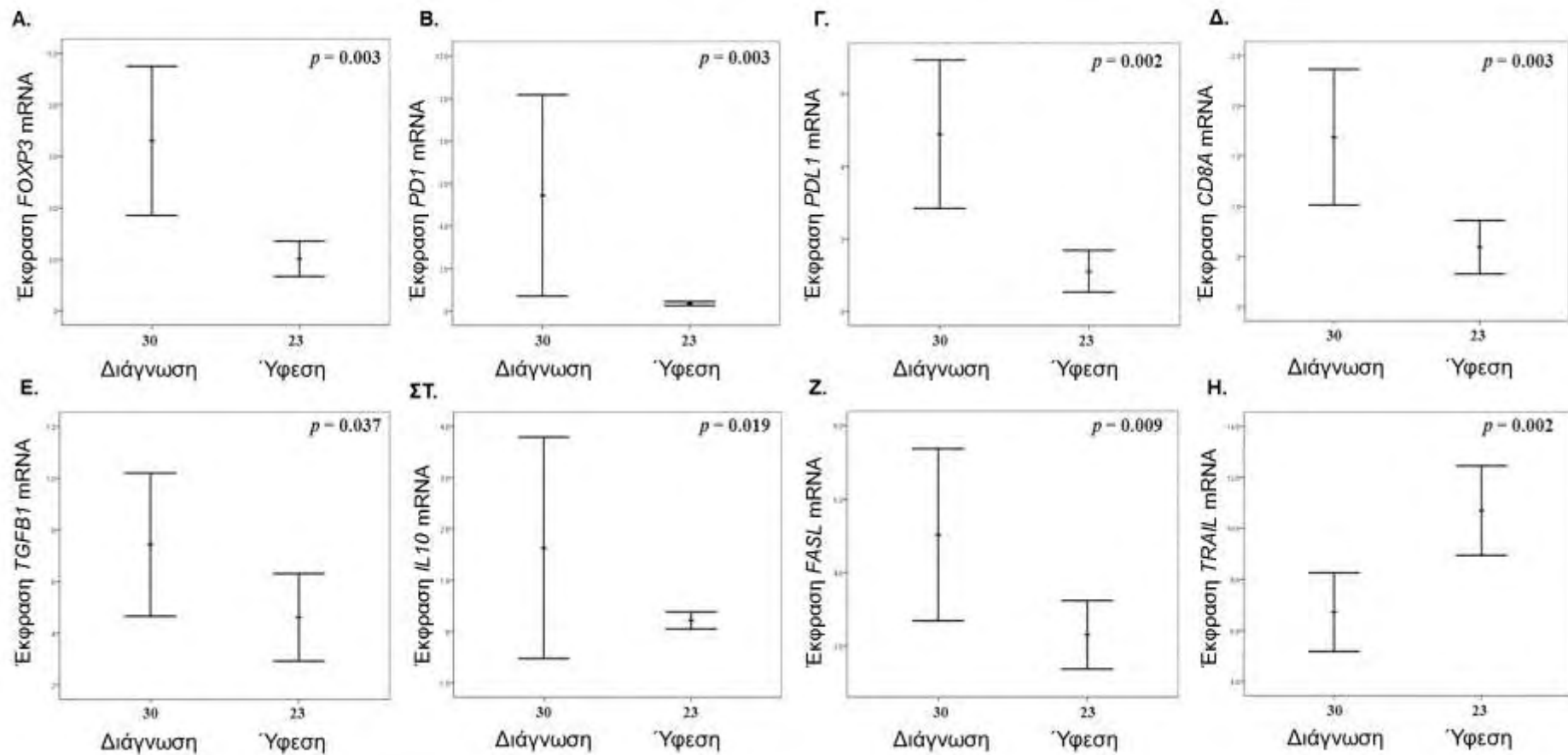
Πίνακας 14. Σχετική έκφραση των υπό εξέταση γονιδίων (συνέχεια)

Γονίδιο	ΧΗΒ ^α στη διάγνωση (αρ. 30)	ΧΗΒ ^α σε μακροχρόνια ύφεση (αρ. 23)
	$\mu\tau^{\beta} \pm \sigma\alpha^{\gamma}$	$\mu\tau^{\beta} \pm \sigma\alpha^{\gamma}$ τιμή p^{δ}
<i>IFNG</i>	11,0 ± 22,8	4,0 ± 4,8 0,083
<i>IL1B</i>	0,6 ± 1,4	0,1 ± 0,1 0,083
<i>CD4</i>	0,7 ± 1,1	0,5 ± 0,5 0,628
<i>CD8A</i>	1,7 ± 1,8	0,6 ± 0,6 0,003

^α ΧΗΒ: χρόνια ηπατίτιδα Β; ^β $\mu\tau$: μέση τιμή, ^γ $\sigma\alpha$: σταθερή απόκλιση, ^δ Η τιμή στατιστικής σημαντικότητας (p) αναφέρεται στη στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney U.

Η συσχέτιση της έκφρασης μεταξύ των γονιδίων που αναλύθηκαν, των βιοχημικών αναλύσεων του ήπατος (AST και ALT), και του ιϊκού φορτίου παρουσιάζεται λεπτομερώς στον **Πίνακα 15**.

Η ανοσοϊστοχημική χρώση για την ανίχνευση των πρωτεϊνών FOXP3, PD1 και PDL1 έδειξε μικρούς αριθμούς θετικών λεμφοκυττάρων στο ήπαρ ασθενών με ΧΗΒ στη διάγνωση, ενώ παρατηρήθηκε απουσία θετικών κυττάρων για την εκάστοτε χρώση μετά τη θεραπεία (**Εικ. 17**). Επιπλέον, τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα εντοπίζονταν, ως επί το πλείστον, στα πυλαία διαστήματα, ενώ τα CD8⁺ λεμφοκύτταρα εντοπίζονταν στα ηπατικά λόβια και πυλαία διαστήματα σε περιοχές με έκδηλη νεκρωτική φλεγμονώδη δραστηριότητα (**Εικ. 17**).

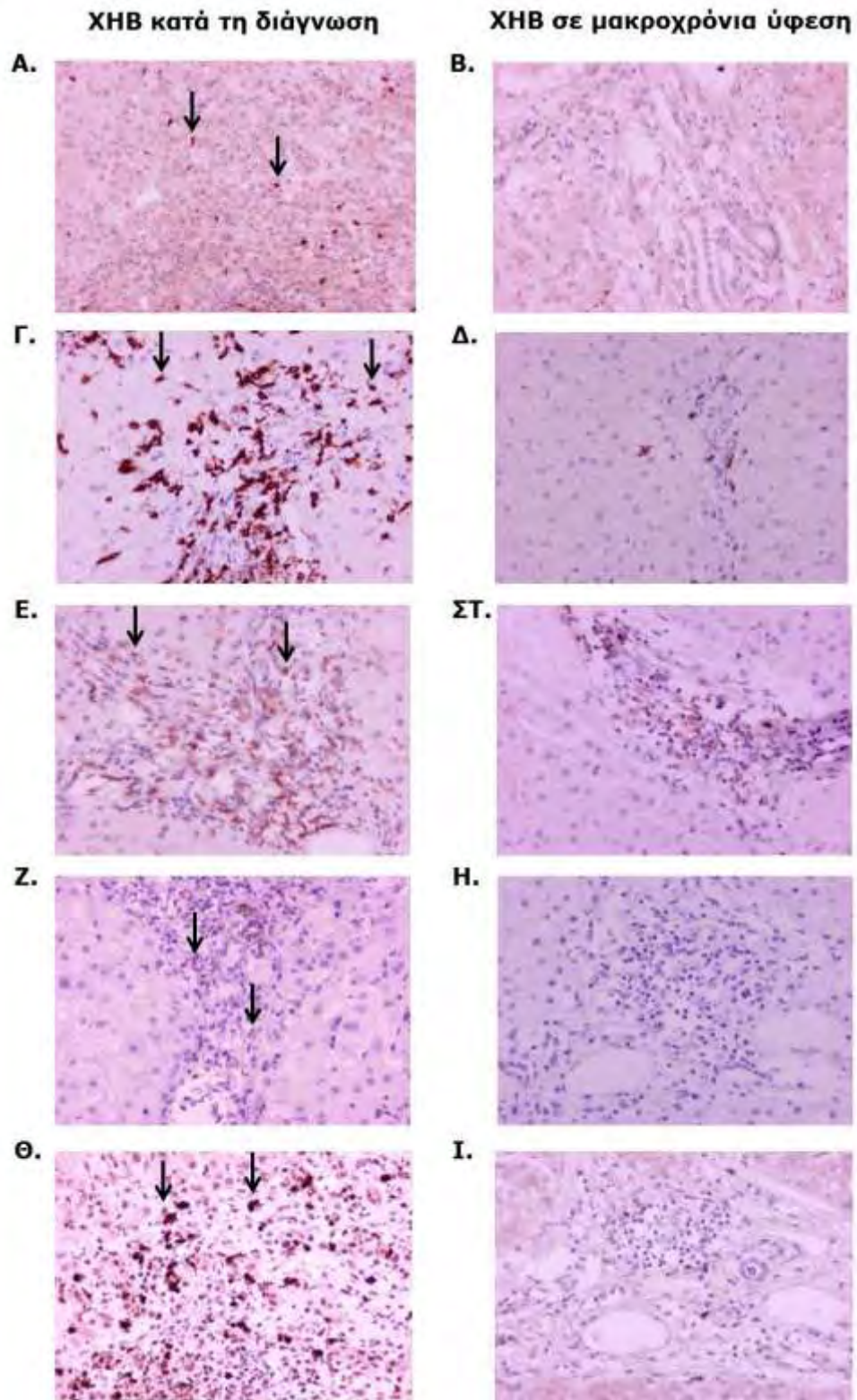


Εικ. 16 Γονίδια με σημαντική μεταβολή των mRNA επιπέδων έκφρασής τους στο ήπαρ ασθενών με ΧΗΒ. Διαγράμματα σφάλματος που παρουσιάζουν την έκφραση των γονιδίων *FOXP3* (Α), *PD1* (Β), *PDL1* (Γ), *CD8A* (Δ), *TGFB1* (Ε), *IL10* (ΣΤ), *FASL* (Ζ) και *TRAIL* (Η) στο ήπαρ των ασθενών με ΧΗΒ, μετά από θεραπεία, που βρίσκονται σε μακροχρόνια ύφεση του νοσήματος συγκριτικά με ασθενείς ΧΗΒ κατά τη διάγνωση. Η τιμή στατιστικής σημαντικότητας (p) αναφέρεται στη στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney U.

Πίνακας 15. Αποτελέσματα συσχετίσεων των ασθενών με ΧΗΒ

	ALT ^α	λικό φορτίο	FOXP3	FAS	FASL	TRAIL	IL10	TGFBI	IL1B	IFNG	TNFA	PDI	PDL1	PDL2	CD4	CD8	IL2
AST ^β Συντελεστής συσχέτισης p ^γ	0.785 <0.001	0.566 <0.001	0.428 0.001	0.080 0.569	0.096 0.494	-0.385 0.004	0.110 0.433	0.271 0.050	0.229 0.099	0.178 0.203	-0.091 0.518	0.329 0.016	0.271 0.050	0.065 0.643	0.119 0.397	0.286 0.038	0.103 0.462
ALT ^α Συντελεστής συσχέτισης p ^γ		0.678 <0.001	0.470 <0.001	-0.075 0.596	0.165 0.237	-0.427 0.001	0.243 0.080	0.252 0.069	0.321 0.019	0.278 0.044	-0.180 0.197	0.332 0.015	0.214 0.124	0.035 0.802	0.205 0.141	0.418 0.002	-0.142 0.309
λικό φορτίο Συντελεστής συσχέτισης p ^γ			0.473 <0.001	0.202 0.155	0.402 0.003	-0.511 <0.001	0.234 0.098	0.245 0.083	0.281 0.046	0.240 0.090	-0.016 0.910	0.666 <0.001	0.433 0.002	0.110 0.442	0.166 0.243	0.465 0.001	0.123 0.391
FOXP3 Συντελεστής συσχέτισης p ^γ				0.120 0.392	0.182 0.193	-0.213 0.125	0.511 <0.001	0.516 <0.001	0.148 0.292	0.075 0.595	-0.299 0.030	0.463 <0.001	0.657 <0.001	0.534 <0.001	0.273 0.048	0.503 <0.001	0.029 0.836
FAS Συντελεστής συσχέτισης p ^γ					0.258 0.063	0.142 0.311	-0.256 0.065	-0.088 0.529	0.084 0.552	-0.079 0.574	0.207 0.138	0.226 0.103	0.168 0.228	-0.030 0.828	-0.003 0.982	-0.183 0.190	0.253 0.068
FASL Συντελεστής συσχέτισης p ^γ						-0.367 0.007	0.128 0.361	0.302 0.028	0.677 <0.001	0.676 <0.001	0.495 <0.001	0.763 <0.001	0.377 0.005	0.278 0.044	0.094 0.505	0.437 0.001	0.509 <0.001
TRAIL Συντελεστής συσχέτισης p ^γ							-0.220 0.114	-0.014 0.919	-0.421 0.002	-0.423 0.002	-0.284 0.039	-0.458 0.001	-0.209 0.133	-0.102 0.469	0.018 0.899	-0.273 0.048	-0.125 0.372
IL10 Συντελεστής συσχέτισης p ^γ								0.511 <0.001	0.348 0.011	0.091 0.519	-0.157 0.261	0.388 0.004	0.413 0.002	0.544 <0.001	0.188 0.177	0.352 0.010	0.357 0.009
TGFBI Συντελεστής συσχέτισης p ^γ									0.278 0.044	0.160 0.253	-0.101 0.472	0.513 <0.001	0.709 <0.001	0.624 <0.001	0.492 <0.001	0.668 <0.001	0.297 0.031
IL1B Συντελεστής συσχέτισης p ^γ										0.611 <0.001	0.526 <0.001	0.588 <0.001	0.214 0.123	0.316 0.021	0.100 0.478	0.311 0.023	0.479 <0.001
IFNG Συντελεστής συσχέτισης p ^γ											0.395 0.003	0.486 <0.001	0.035 0.804	0.020 0.889	-0.002 0.986	0.455 0.001	0.304 0.027
TNFA Συντελεστής συσχέτισης p ^γ												0.265 0.055	-0.062 0.658	0.038 0.790	0.032 0.823	0.045 0.750	0.486 <0.001
PDI Συντελεστής συσχέτισης p ^γ													0.665 <0.001	0.419 0.002	0.161 0.248	0.576 <0.001	0.447 0.001
PDL1 Συντελεστής συσχέτισης p ^γ														0.731 <0.001	0.444 0.001	0.564 <0.001	0.262 0.058
PDL2 Συντελεστής συσχέτισης p ^γ															0.553 <0.001	0.484 <0.001	0.353 0.009
CD4 Συντελεστής συσχέτισης p ^γ																0.564 <0.001	0.113 0.420
CD8 Συντελεστής συσχέτισης p ^γ																	0.213 0.125

^α ALT: τρανσαμινάση της αλανίνης, ^β AST: ασπαραγινική τρανσαμινάση, ^γ Η στατιστική σημαντικότητα (p) αναφέρεται στη δοκιμασία συσχέτισης κατά Spearman. Η σκίαση με σκούρο γκρι χρώμα αναφέρεται σε συσχετίσεις των οποίων η στατιστική σημαντικότητα (p) είναι < 0.01, ενώ η σκίαση με ανοιχτό γκρι χρώμα αναφέρεται σε συσχετίσεις των οποίων η στατιστική σημαντικότητα (p) είναι < 0.05.



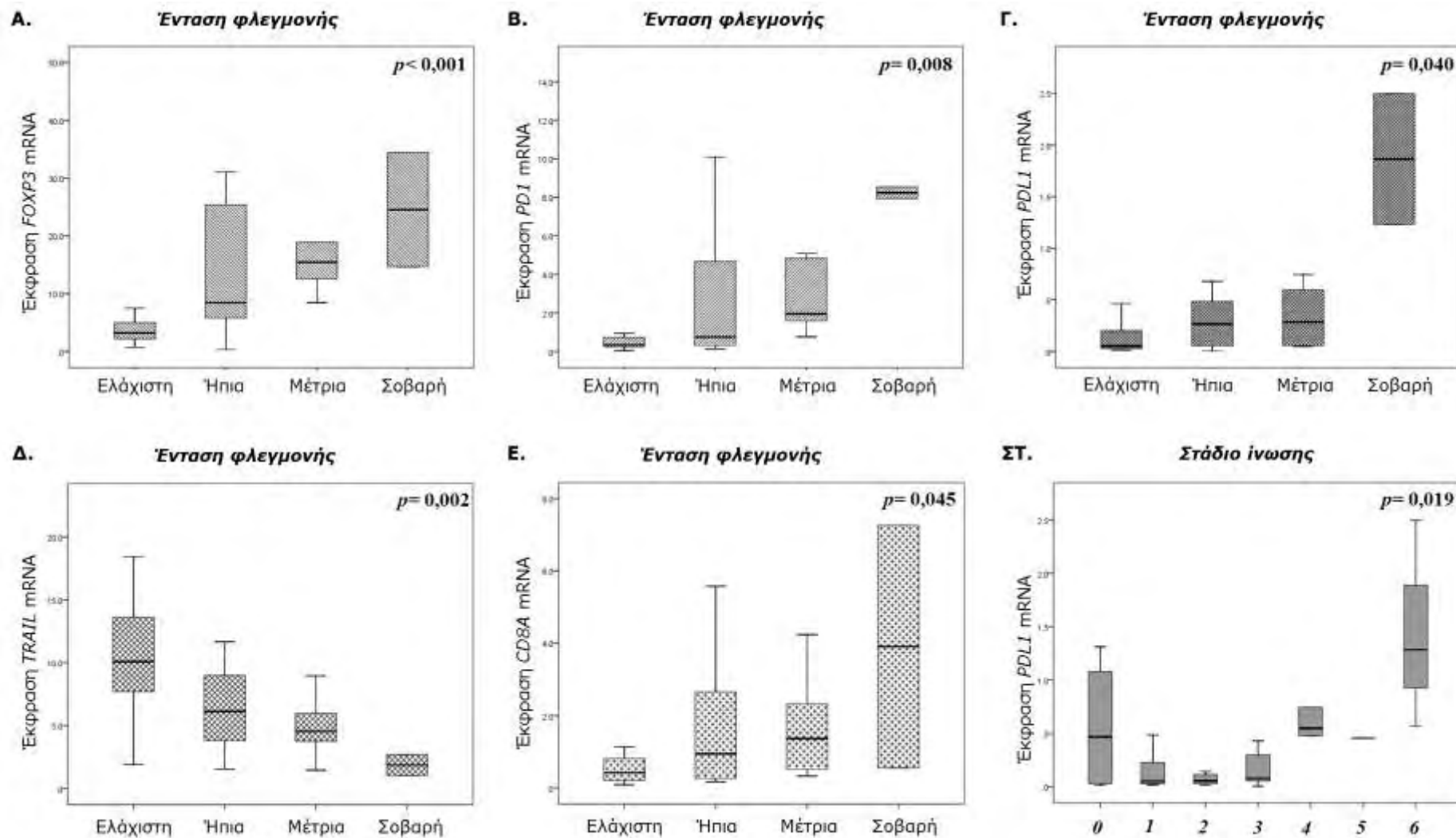
Εικ. 17 Ανοσοϊστοχημικά ευρήματα σε δείγματα της βιοψίας ήπατος ενός ασθενούς με ΧΗΒ, με έντονη νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα και ενός ασθενούς σε παρατεταμένη μακροχρόνια ύφεση. (Α, Β) περιστασιακά FOXP3⁺ λεμφοκύτταρα, (Γ, Δ) πολλά CD8⁺ λεμφοκύτταρα πριν από τη θεραπεία (που εντοπίζονται στα πυλαία διαστήματα και στους ηπατικούς λοβούς) σε αντίθεση με ελάχιστα θετικά λεμφοκύτταρα μετά τη θεραπεία, (Ε, ΣΤ) ορισμένα CD4⁺ λεμφοκύτταρα που εντοπίζονται στα πυλαία διαστήματα, (Ζ, Η) περιστασιακά PD1⁺ λεμφοκύτταρα (Ι, J) αρκετά PDL1⁺ λεμφοκύτταρα.

3.2.2 Συσχέτιση γονιδιακής έκφρασης με φλεγμονή και ίνωση

Σε σχέση με την ένταση της φλεγμονής, τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *FOXP3*, *PD1*, *PDL1* και *CD8A* αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά προϋούσης της φλεγμονής (από I-1 έως I-4 στάδιο) (**Εικ. 18**). Αυτό το πρότυπο έκφρασης ομοιάζε με αυτό του *FASL*, αν και το τελευταίο δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές μεταβολές ($p = 0,128$). Από την άλλη πλευρά, το γονίδιο *TRAIL* εμφάνισε ένα αντίθετο πρότυπο έκφρασης, μειώνοντας τα επίπεδά του από την ελάχιστη (I-1) έως τη σοβαρή φλεγμονή (I-4) (**Εικ. 18**).

Η έκφραση των υπόλοιπων γονιδίων που αναλύθηκαν δε φάνηκε να επηρεάζεται από την ένταση της φλεγμονής ($p > 0,05$, σε όλες τις περιπτώσεις). Η σοβαρότητα της ίνωσης παρουσίασε σημαντική συσχέτιση μόνο με την έκφραση του *PDL1*. Ένα παρόμοιο πρότυπο παρατηρήθηκε πως ακολουθούν τα γονίδια *FOXP3* και *PD1*, ενώ ένα αντίθετο πρότυπο το *TRAIL*, αν και οι μεταβολές δεν έφτασαν τα επίπεδα της στατιστικής σημαντικότητας ($p = 0,105$, $p = 0,080$ και $p = 0,060$, αντίστοιχα). Η έκφραση των άλλων γονιδίων που αναλύθηκαν δεν επηρεάστηκε από τη σοβαρότητα της ίνωσης ($p > 0,05$, σε όλες τις περιπτώσεις).

Τέλος, όπως ήταν αναμενόμενο, ο βαθμός HAI εμφάνισε ισχυρή συσχέτιση με το στάδιο της ίνωσης ($p < 0,001$, $r = 0,665$), ενώ το ιϊκό φορτίο συσχετίστηκε, επίσης, θετικά τόσο με το βαθμό HAI όσο και με το στάδιο της ίνωσης ($p < 0,001$, $r = 0,724$ και $p = 0,003$, $r = 0,403$, αντίστοιχα).



Εικ. 18 Ηπατική γονιδιακή έκφραση όλων των ασθενών με ΧΗΒ ανάλογα με την ένταση της φλεγμονής και της ίνωσης του ήπατος. Τα θηκογράμματα παρουσιάζουν τη σχετική έκφραση, σε μεταγραφικό επίπεδο, των γονιδίων FOXP3 (Α), PD1 (Β), PDL1 (Γ), TRAIL (Δ) και CD8A (Ε) ανάλογα με την ένταση της φλεγμονής του ήπατος (εξαιρουμένου ενός ασθενούς με βαθμό ΗΑΙ 0) και την έκφραση του PDL1 (ΣΤ) σύμφωνα με το στάδιο της ίνωσης (η σταδιοποίηση παρουσιάζεται στην ενότητα «Υλικά και μεθοδολογία της Έρευνας- Ιστολογική εξέταση βιοψιών ήπατος»). Η τιμή στατιστικής σημαντικότητας (p) που αναγράφεται σε κάθε διάγραμμα αναφέρεται στη στατιστική δοκιμασία Kruskal-Wallis H.

3.3 Η ανοσορρύθμιση στον αρθρικό υμένα ασθενών με οστεοαρθρίτιδα

Στα πλαίσια της ευρύτερης μελέτης της σχέσης της ανοσορρύθμισης με την απόπτωση, διερευνήθηκε η ύπαρξη τυχόν συσχετίσεων των μηχανισμών της ανοσορρύθμισης και της επαγόμενης από απόπτωση φλεγμονής σε μία χρόνια φλεγμονώδη νοσολογική οντότητα μη μικροβιακής αιτιολογίας, δηλαδή της οστεοαρθρίτιδας (ΟΑ) του γόνατος και του ισχίου που χαρακτηρίζεται από άσηπτη φλεγμονή. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε ο μηχανισμός της ανοσορρύθμισης, όπως αυτός εκφράζεται μέσω του μορίου *FOXP3*, με την απόπτωση και των κύριων μεσολαβητών της *FAS*, *FASL* και *TRAIL*. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο μέρος της μελέτης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 16**.

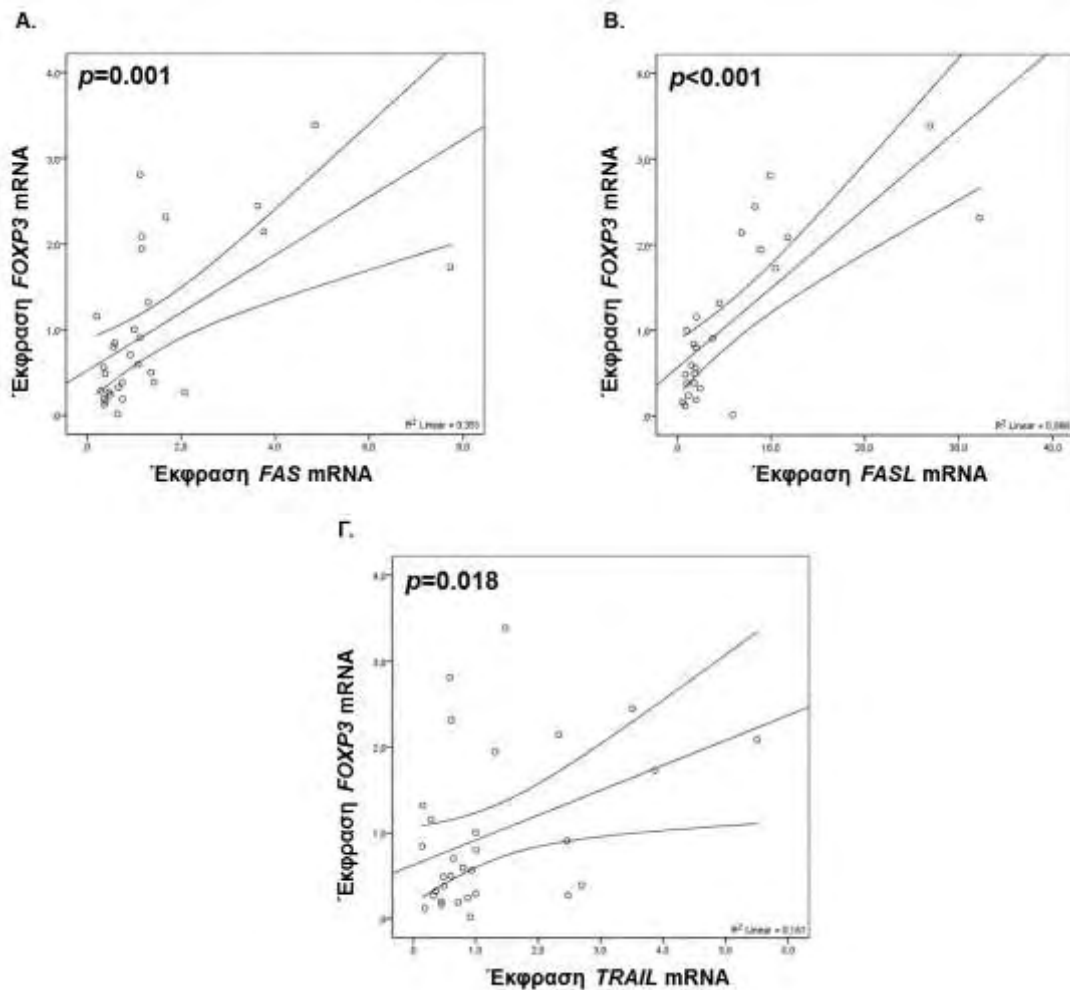
3.3.1 Γονιδιακή έκφραση στην Οστεοαρθρίτιδα

Για να διαπιστωθεί κατά πόσον η αρθρική έκφραση του *FOXP3* και των μεσολαβητών της απόπτωσης *FAS*, *FASL* και *TRAIL*, παρουσιάζει διαφορές στους ασθενείς με ΟΑ, εξετάστηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασής τους έναντι της ομάδας ελέγχου, που αποτελούνταν από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση λόγω κατάγματος ισχίου. Παρά το γεγονός ότι δε διαπιστώθηκαν σημαντικές αλλαγές της έκφρασης του mRNA των γονιδίων που αναλύθηκαν μεταξύ των δύο ομάδων (**Πίνακας 16**), παρατηρήθηκαν σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων της αρθρικής έκφρασης του *FOXP3* με την έκφραση των *FAS* ($p = 0,001$), *FASL* ($p < 0,001$) και *TRAIL* ($p = 0,018$) (**Εικ. 19**), και *FAS* και *TRAIL* ($p < 0,001$).

Πίνακας 16. Σχετική έκφραση των υπό εξέταση γονιδίων

Γονίδιο	Ομάδα ελέγχου μτ ^α ± σα ^β	Οστεοαρθρίτιδα μτ ^α ± σα ^β (τιμή $p^γ$)
<i>FOXP3</i>	1,2 ± 0,8	0,9 ± 0,9 (0,405)
<i>FAS</i>	1,3 ± 1,4	1,3 ± 1,6 (0,938)
<i>FASL</i>	4,7 ± 3,8	6,1 ± 8,4 (0,943)
<i>TRAIL</i>	1,2 ± 0,7	1,2 ± 1,3 (0,421)

^αμτ: μέση τιμή, ^βσα: σταθερή απόκλιση, ^γΗ στατιστική σημαντικότητα (p) αναφέρεται στη δοκιμασία Mann-Whitney U.

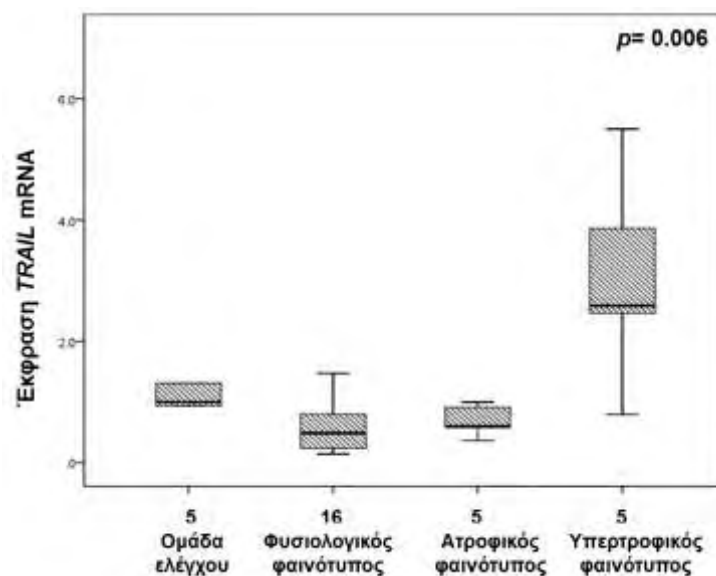


Εικ. 19 Αποτελέσματα της ανάλυσης συσχέτισης κατά Pearson. Παρατηρούνται θετικές συσχετίσεις μεταξύ των FOXP3 και FAS (A), FOXP3 και FASL (B) και FOXP3 και TRAIL (Γ) στο σύνολο των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα.

3.3.2 Γονιδιακή έκφραση σε σχέση με το φαινότυπο της οστεοαρθρίτιδας

Εν συνεχεία, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε υποομάδες ανάλογα με το φαινότυπο της πάσχουσας άρθρωσης. Από αυτό το διαχωρισμό προέκυψαν τρεις υποομάδες, μία με ατροφικό φαινότυπο (ΑΦ), μία με φυσιολογικό φαινότυπο (ΦΦ) και μία με υπερτροφικό φαινότυπο (ΥΦ) ΟΑ.

Σε σχέση λοιπόν με το φαινότυπο, το TRAIL παρουσίασε μία στατιστικά σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του στους ασθενείς της υποομάδας ΥΦ (**Εικ. 20**), σε σύγκριση με τις υποομάδες ΑΦ και ΦΦ, καθώς και της ομάδας ελέγχου. Ωστόσο, η αρθρική έκφραση των υπόλοιπων γονιδίων που αναλύθηκαν (FOXP3, FAS και FASL) δεν επηρεάστηκε από το διαφορετικό φαινότυπο της ΟΑ ($p > 0.05$, σε όλες τις περιπτώσεις).



Εικ. 20 Ηπατική γονιδιακή έκφραση του *TRAIL* στην ομάδα ελέγχου και στους ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα σύμφωνα με τον φαινότυπο της άρθρωσης (φυσιολογικός, ατροφικός ή υπερτροφικός φαινότυπος). Η τιμή (p) που αναγράφεται στο διάγραμμα αναφέρεται στη στατιστική δοκιμασία Kruskal-Wallis H.

3.4 Μελέτη της TGFβ/SMAD - επαγόμενης ίνωσης

Είναι γνωστό πως ανοσορρυθμιστικές κυτταροκίνες με ιδιαίτερη σημασία στην παθογένεια και εξέλιξη της χρόνιας φλεγμονής, είναι αυτές της υπεροικογένειας του TGFβ. Ο TGFβ1, εκτός από δείκτης και μόριο που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των ρυθμιστικών κυττάρων, αποτελεί παράγοντα-κλειδί που σχετίζεται με την ανάπτυξη ίνωσης.²¹⁸ Η ενεργοποίηση λοιπόν της οδού μετάδοσης σήματος του TGFβ είναι κομβικής σημασίας στη διαδικασία ίνωσης και εξέλιξης των χρόνιων ηπατοπαθειών και της κίρρωσης.

Με βάση τα παραπάνω, μελετήθηκαν μόρια που συμμετέχουν στην οδό επαγωγής σήματος του TGF-β, όπως μόρια-συνδέτες της υπεροικογένειας TGF-β (οι ισομορφές *TGFβ1*, *TGFβ2* και *TGFβ3*, καθώς και τα μόρια των ακτιβινών *INHBA*, *INHBB*, *INHBC* και *INHBE*), οι υποδοχείς τους (*TGFβRI/ALK5* και *ACVRI/ALK4*), ενδοκυττάριοι μεσολαβητές του σήματος (*SMAD2*, *SMAD3* και *SMAD4*), καθώς και ο κύριος αναστολέας της οδού *SMAD7*.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη της οδού TGFβ/Ακτιβινών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 17**.

Πίνακας 17. Κλινικά και ορολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης της οδού TGFB/ Ακτιβινών

	Φυσιολογικοί μάρτυρες	Χρόνια ηπατίτιδα Β			Χρόνια ηπατίτιδα C (ΧΗC)	NAFLD ^δ
		Διάγνωση (ΧΗΒ/δ) ^α	Υποτροπή (ΧΗΒ/υπ) ^β	Μακροχρόνια (ΧΗΒ/υφ) ^γ		
<i>Αρ. δειγμάτων</i>	3	19	4	14	18	12
<i>Φύλο (Α/Θ)^ε</i>	2/1	9/10	2/2	11/3	14/4	7/5
<i>Ηλικία (δτ^{στ}, εύρος)</i>	61, 60-67	54, 24-64	57, 22-65	52, 23-60	41.5, 27-54	45, 21-71
<i>AST (U/μl)^ζ (δτ^{στ}, εύρος)</i>	42, 36-45	51, 17-1969	62, 39-277	29,5, 15-51	45, 24-237	31.5, 19-70
<i>ALT (U/ml)^η (δτ^{στ}, εύρος)</i>	32, 21-48	61, 15-1478	97,5, 70-332	31,5, 17-49	75, 32-213	54, 15-141
Βαθμός φλεγμονής^θ						
<i>I-0</i>	3	–	–	1	–	3
<i>I-1</i>	–	4	–	10	2	4
<i>I-2</i>	–	8	3	3	10	5
<i>I-3</i>	–	5	1	–	6	–
<i>I-4</i>	–	2	–	–	–	–
<i>Ίνωση^θ (δτ^{στ}, εύρος)</i>	0	4, 0-6	4,5, 1-5	2, 0-3	3, 1-6	0,5, 0-2
<i>Βαθμός ΗΑΙ (δτ^{στ}, εύρος)</i>		8, 1-15	8, 5-11	2, 0-7	7, 2-12	2, 0-5
<i>Ίικό φορτίο (δτ^{στ}, εύρος)</i>		4 Meq/mL (0,009-699)	0,10 Meq/mL (0-44,5)	0 Meq/mL, (0,000-0,008)	0,70 Meq/mL (0,10-6,25)	–

^α ΧΗΒ/δ: ασθενείς με ΧΗΒ στη διάγνωση, πριν από οποιαδήποτε θεραπεία, ^β ΧΗΒ/υπ: ασθενείς με ΧΗΒ μετά από θεραπεία και υποτροπή του νοσήματος, ^γΧΗΒ/υφ: ασθενείς με ΧΗΒ μετά από θεραπεία και μακροχρόνια διατηρούμενη ύφεση του νοσήματος, ^δNAFLD: μη αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος, ^ε Α: Άρρενες και Θ: Θήλειες, ^{στ} δτ: διάμεση τιμή, ^ζ AST: ασπαραγινική τρανσαμινάση ^η ALT: τρανσαμινάση της αλανίνης, ^θ Ο βαθμός φλεγμονής (**I-0**: απουσία φλεγμονής, **I-1**: ελάχιστη φλεγμονή, **I-2**: ήπια φλεγμονή, **I-3**: μέτρια φλεγμονή, **I-4**: έντονη φλεγμονή) και ίνωσης αξιολογήθηκε όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και μεθοδολογία της Έρευνας- Ιστολογική εξέταση βιοψιών ήπατος».

Το πιο ενδιαφέρον εύρημα κατά της μελέτη της οδού TGF-β/Ακτιβινών ήταν το πρότυπο έκφρασης του *SMAD7* σύμφωνα με την κατάσταση της νόσου και το βαθμό της ίνωσης. Ειδικότερα, παρατηρήσαμε ότι οι ασθενείς με ΧΗΒ σε ύφεση (ΧΗΒ/υφ) εμφανίζουν μια περίπου 3πλάσια αύξηση της έκφρασης του *SMAD7* συγκριτικά με ασθενείς ΧΗΒ κατά τη διάγνωση (ΧΗΒ/δ) ($p = 0,001$) (Πίνακας 18, Εικ. 21). Κατά συνέπεια, τα επίπεδα έκφρασης του *SMAD7* έχουν αρνητική συσχέτιση με το ιϊκό φορτίο ($r = -0,336, p = 0,012$), καθώς και με τα επίπεδα των τρανσαμινασών ALT ($r = -0,382, p = 0,004$) και AST ($r = -0,345, p = 0,010$). Είναι αξιοσημείωτο ότι το μοτίβο της έκφρασης του *SMAD7* των ασθενών με ΧΗΒ/υφ ήταν παρόμοιο με εκείνο που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με NAFLD (Εικ. 21). Επιπλέον, οι ασθενείς με ΧΗΒ/δ εμφάνισαν σημαντικά αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα των μορίων *CTGF*, *INHBA*, *INHBE* και *ACVR1/ALK4* σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p = 0,025, p = 0,049, p = 0,049$ και $p = 0,037$, αντίστοιχα). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι ασθενείς με ΧΗΒ/υφ διατηρούν τα αυξημένα επίπεδα της *INHBE* και του *ACVR1/ALK4* ($p = 0,026$ και $p = 0,039$, αντίστοιχα), ενώ η έκφραση του *SMAD4* μειώνεται ($p = 0,032$) (Πίνακας 18) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Επιπρόσθετα, παρατηρείται σημαντική μείωση της μεταγραφικής έκφρασης των μορίων *CTGF* ($p = 0,010$), *TGFB1* ($p = 0,013$), *SMAD2* ($p < 0,001$) και *SMAD3* ($p < 0,001$) σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΧΗΒ/δ (Πίνακας 18).

Πίνακας 18. Σχετική έκφραση των υπό εξέταση γονιδίων

Γονίδιο	ΧΗΒ/δ ^α	ΧΗΒ/υπ ^β	ΧΗΒ/υφ ^γ
	(αρ. 19)	(αρ. 4)	(αρ. 14)
	μτ ^δ ± σα ^ε	μτ ^δ ± σα ^ε τιμή $p^{\sigma\tau}$	μτ ^δ ± σα ^ε τιμή $p^{\sigma\tau}$
<i>TGFB1</i>	1,11 ± 0,84	0,61 ± 0,38 (0,168)	0,64 ± 0,43 (0,013)
<i>TGFB2</i>	4,66 ± 5,12	5,44 ± 6,72 (0,898)	4,57 ± 4,48 (0,879)
<i>TGFB3</i>	0,16 ± 0,26	0,05 ± 0,04 (0,062)	0,13 ± 0,12 (0,771)
<i>ALK5</i>	1,63 ± 1,00	0,91 ± 0,50 (0,133)	1,69 ± 0,78 (0,536)
<i>ALK4</i>	4,96 ± 6,15	2,38 ± 1,74 (0,424)	8,19 ± 5,32 (0,036)
<i>SMAD2</i>	0,73 ± 0,40	0,54 ± 0,14 (0,224)	0,28 ± 0,24 (<0,001)

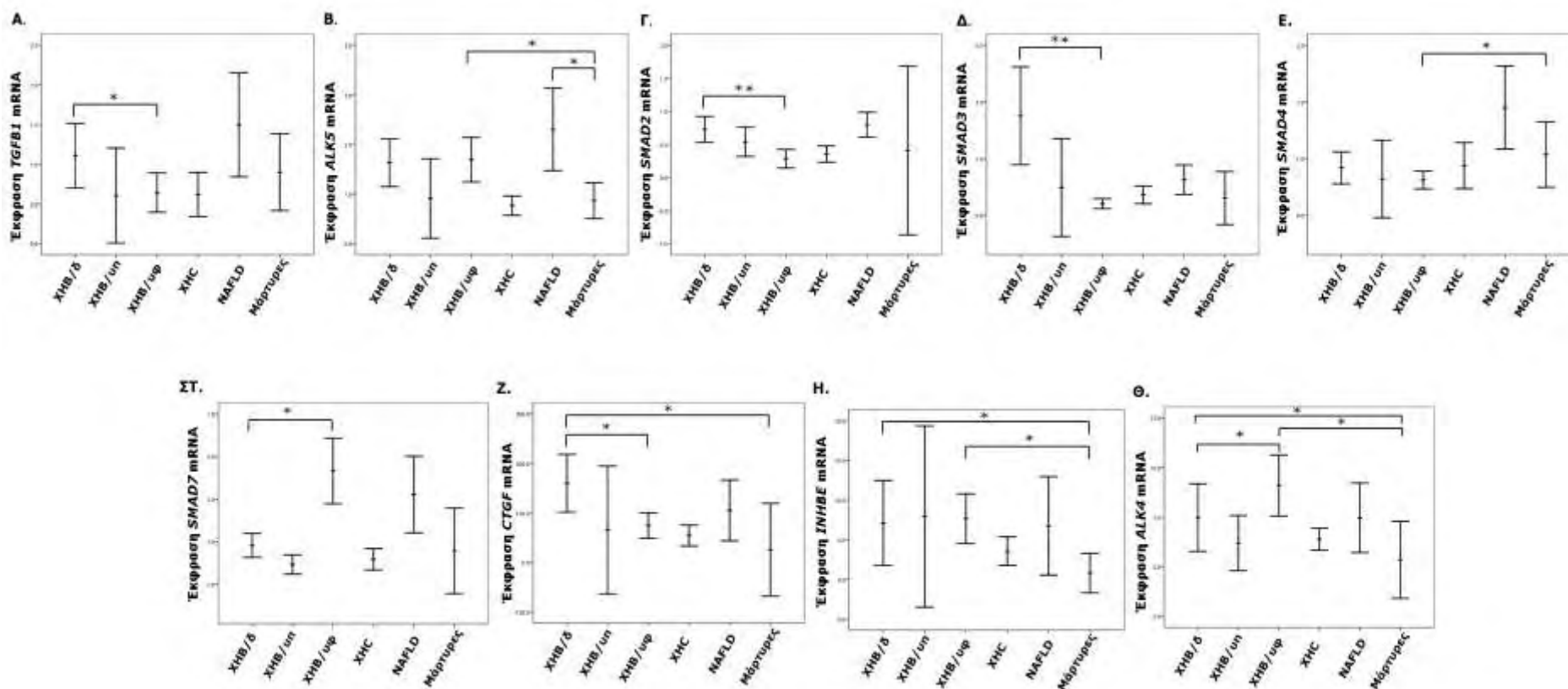
^α ΧΗΒ/δ: ασθενείς με ΧΗΒ στη διάγνωση, πριν από οποιαδήποτε θεραπεία, ^β ΧΗΒ/υπ: ασθενείς με ΧΗΒ μετά από θεραπεία και υποτροπή του νοσήματος, ^γ ΧΗΒ/υφ: ασθενείς με ΧΗΒ μετά από θεραπεία και μακροχρόνια διατηρούμενη ύφεση του νοσήματος, ^δ μτ: μέση τιμή, ^ε σα: σταθερή απόκλιση, ^{στ} Η τιμή στατιστικής σημαντικότητας (p) αναφέρεται στη δοκιμασία Mann-Whitney U.

Πίνακας 18. Σχετική έκφραση των υπό εξέταση γονιδίων (συνέχεια)

Γονίδιο	ΧΗΒ/δ ^α	ΧΗΒ/υη ^β	ΧΗΒ/υφ ^γ
	(αρ. 19)	(αρ. 4)	(αρ. 14)
	μτ ^δ ± σα ^ε	μτ ^δ ± σα ^ε τιμή ρ ^{στ}	μτ ^δ ± σα ^ε τιμή ρ ^{στ}
<i>SMAD3</i>	3,51 ± 3,58	0,98 ± 1,08 (0,062)	0,41 ± 0,31 (<0,001)
<i>SMAD4</i>	0,84 ± 0,59	0,64 ± 0,43 (0,626)	0,62 ± 0,27 (0,362)
<i>SMAD7</i>	2,73 ± 1,74	1,39 ± 0,43 (0,043)	7,97 ± 3,99 (0,001)
<i>INHBA</i>	6,22 ± 7,01	4,37 ± 3,65 (0,850)	4,70 ± 3,63 (0,868)
<i>INHBB</i>	0.88 ± 0.65	0.63 ± 0.52 (0,394)	0.58 ± 0.34 (0,360)
<i>INHBC</i>	1.84 ± 1.64	2.04 ± 1.73 (0,637)	2.90 ± 2.21 (0,064)
<i>INHBE</i>	7.12 ± 10.04	7.93 ± 7.18 (0,850)	7.65 ± 5.42 (0,151)
<i>CTGF</i>	0.22 ± 0.15	0.09 ± 0.07 (0,057)	0.10 ± 0.06 (0,010)

^α ΧΗΒ/δ: ασθενείς με ΧΗΒ στη διάγνωση, πριν από οποιαδήποτε θεραπεία, ^β ΧΗΒ/υη: ασθενείς με ΧΗΒ μετά από θεραπεία και υποτροπή του νοσήματος, ^γ ΧΗΒ/υφ: ασθενείς με ΧΗΒ μετά από θεραπεία και μακροχρόνια διατηρούμενη ύφεση του νοσήματος, ^δ μτ: μέση τιμή, ^ε σα: σταθερή απόκλιση, ^{στ} Η τιμή στατιστικής σημαντικότητας (ρ) αναφέρεται στη στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney U.

Λαμβάνοντας υπόψη το παρόμοιο πρότυπο έκφρασης του *SMAD7* που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με ΧΗΒ/υφ και NAFLD, διερευνήσαμε το κατά πόσον οι ασθενείς με NAFLD εμφανίζουν διαφορές στην έκφραση των υπόλοιπων γονιδίων της οδού. Παρατηρήσαμε ότι οι ασθενείς με NAFLD εμφανίζουν επίσης σημαντικά αυξημένη έκφραση των *TGFB1*, *TGFB3*, *INHBA*, *INHBB*, *INHBC*, *ALK5*, *SMAD2* και *SMAD4*, σε σύγκριση με όλους τους ασθενείς με ενεργή χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (ΧΗΒ/δ, ΧΗΒ/υη, και ΧΗC) (Πίνακας 19, Εικ. 22). Ωστόσο, δεδομένου ότι όλοι οι ασθενείς με NAFLD χαρακτηρίζονται από χαμηλού βαθμού φλεγμονή, συγκρίναμε περαιτέρω την έκφραση των προαναφερθέντων γονιδίων μεταξύ των ασθενών με NAFLD και των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα με παρόμοια ένταση της φλεγμονής. Η διαφορά της έκφρασης που παρατηρήθηκε μεταξύ των ασθενών με NAFLD και αυτών με χρόνια ηπατίτιδα διατηρείται για όλα τα γονίδια, εξαιρουμένων των ακτιβινών *INHBA* και *INHBC*.

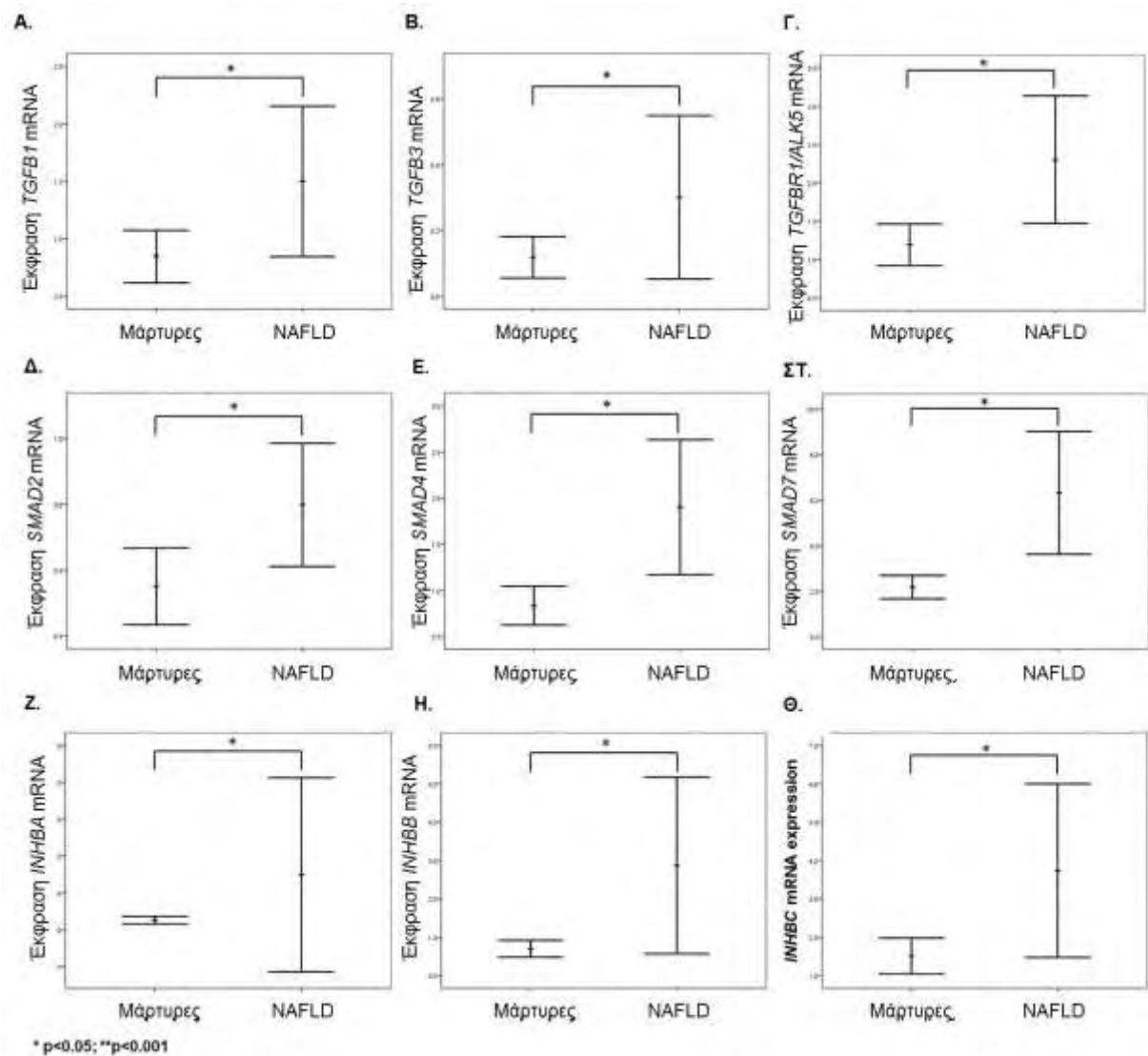


Εικ. 21 Γονίδια με σημαντική μεταβολή των mRNA επιπέδων έκφρασής τους στο ήπαρ ασθενών με ΧΗΒ. Διαγράμματα σφάλματος που παρουσιάζουν την έκφραση των γονιδίων *TGFB1* (Α), *ALK5* (Β), *SMAD2* (Γ), *SMAD3* (Δ), *SMAD4* (Ε), *SMAD7* (ΣΤ), *CTGF* (Ζ), *INHBE* (Η) και *ALK4* (Θ) στο ήπαρ των ασθενών με ΧΗΒ, μετά από θεραπεία, που βρίσκονται σε μακροχρόνια ύφεση του νοσήματος συγκριτικά με ασθενείς ΧΗΒ κατά τη διάγνωση, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, όπου η τιμή στατιστικής σημαντικότητας (p) αναφέρεται στη στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney U.

Πίνακας 19. Σχετική έκφραση των υπό εξέταση γονιδίων

Γονίδιο	Ομάδα ελέγχου ^α (αρ. 41)	NAFLD ^β (αρ. 12)
	μτ ^γ ± σα ^δ	μτ ^γ ± σα ^δ τιμή <i>p</i> ^ε
<i>TGFB1</i>	0,84 ± 0,72	1,50 ± 1,03 (0,019)
<i>TGFB2</i>	4,70 ± 5,45	3,39 ± 3,09 (0,981)
<i>TGFB3</i>	0,12 ± 0,20	0,30 ± 0,39 (0,015)
<i>ALK5</i>	1,19 ± 0,85	2,30 ± 1,31 (0,002)
<i>ALK4</i>	3,70 ± 4,39	4,93 ± 3,79 (0,406)
<i>SMAD2</i>	0,55 ± 0,36	0,80 ± 0,30 (0,008)
<i>SMAD3</i>	2,04 ± 2,82	1,26 ± 0,82 (0,815)
<i>SMAD4</i>	0,83 ± 0,66	1,90 ± 1,15 (0,001)
<i>SMAD7</i>	2,18 ± 1,62	6,31 ± 4,24 (0,001)
<i>INHBA</i>	5,07 ± 6,13	29,69 ± 63,08 (0,044)
<i>INHBB</i>	0,70 ± 0,63	2,87 ± 2,75 (0,009)
<i>INHBC</i>	1,51 ± 1,36	3,73 ± 2,71 (0,046)
<i>INHBE</i>	5,69 ± 7,54	6,75 ± 7,41 (0,731)
<i>CTGF</i>	104,97 ± 94,61	105,15 ± 66,27 (0,603)

^α Ομάδα ελέγχου: ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (ΧΗΒ) στη διάγνωση, πριν από οποιαδήποτε θεραπεία, ασθενείς με ΧΗΒ στην υποτροπή του νοσήματος και ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, ^β NAFLD: ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη διήθηση του ήπατος, ^γ μτ: μέση τιμή, ^δ σα: σταθερή απόκλιση, ^ε Η στατιστική σημαντικότητα (*p*) αναφέρεται στη δοκιμασία Mann-Whitney U.

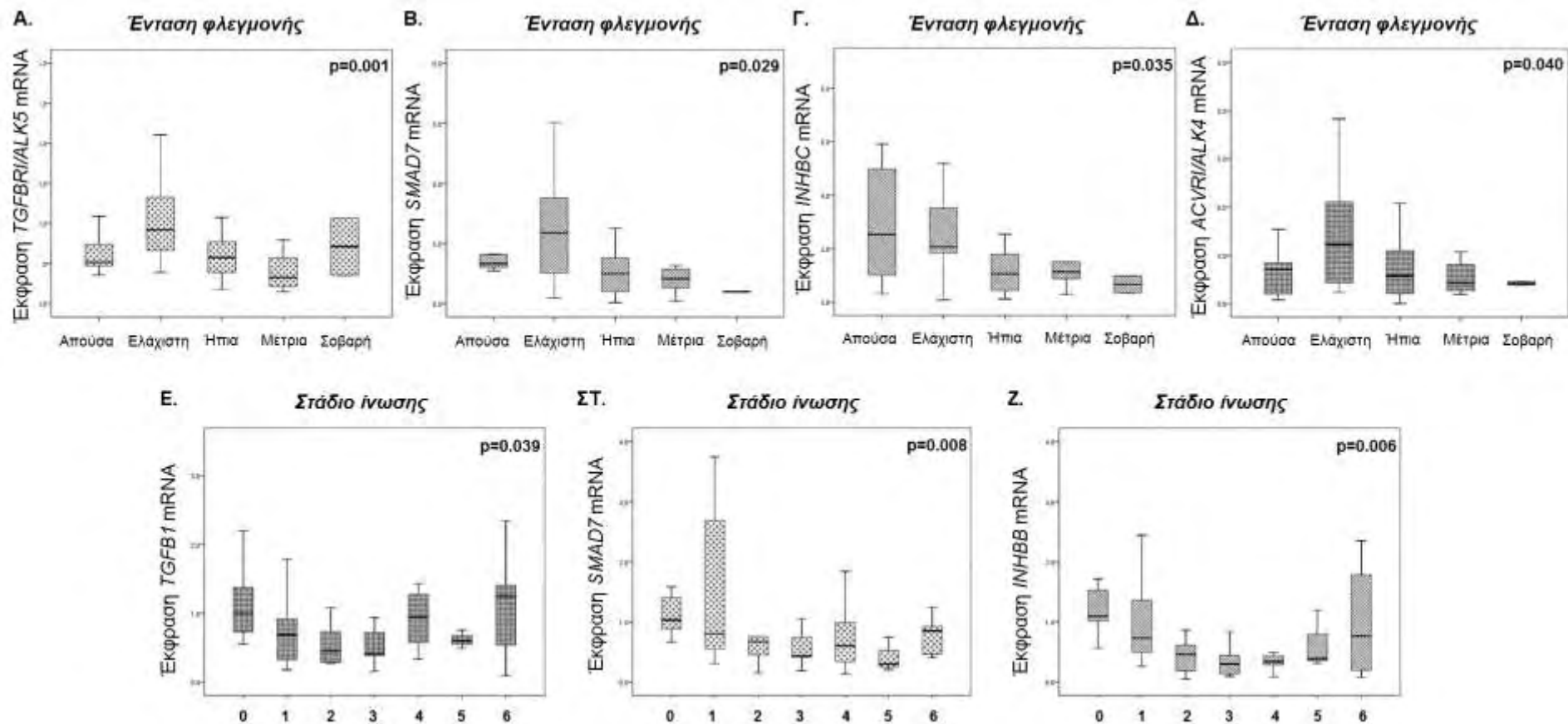


Εικ. 22 Γονίδια με σημαντική μεταβολή των mRNA επιπέδων έκφρασής τους στο ήπαρ ασθενών με NAFLD. Διαγράμματα σφάλματος που παρουσιάζουν την έκφραση των γονιδίων *TGFB1* (Α), *TGFB3* (Β), *ALK5* (Γ), *SMAD2* (Δ), *SMAD4* (Ε), *SMAD7* (ΣΤ), *INHBA* (Ζ), *INHBB* (Η) και *INHBC* (Θ) στο ήπαρ των ασθενών με NAFLD με την ομάδα των μαρτύρων που αποτελείται από ασθενείς με ΧΗΒ/δ, ΧΗΒ/υπ και ΧΗC, * $p < 0,05$, όπου η τιμή στατιστικής σημαντικότητας (p) αναφέρεται στη στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney U.

Θέλοντας να διερευνήσουμε πιθανές σχέσεις μεταξύ της έκφρασης του *SMAD7* με την ένταση της φλεγμονής και της ίνωσης, θεωρήσαμε όλες τις υποομάδες των ασθενών ως μια ενιαία ομάδα. Σχετικά με την ένταση της φλεγμονής, τα επίπεδα του *SMAD7* ήταν σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με ελάχιστη φλεγμονή (I-1), ενώ μειώνονταν προχωρώντας σε μεγαλύτερα στάδια φλεγμονής (I-4) (Εικ. 23). Αυτό το πρότυπο της έκφρασης ήταν παρόμοιο για την *INHBC* και τους υποδοχείς *ACVR1/ALK4* και *TGFB1/ALK5* (Εικ. 23). Η έκφραση των άλλων γονιδίων που αναλύθηκαν δεν επηρεάστηκε από την ένταση της φλεγμονής ($p > 0,05$, σε όλες τις περιπτώσεις). Σχετικά με την ίνωση, παρατηρήσαμε ότι η έκφραση των γονιδίων *TGFB1*, *INHBB* και *SMAD4* εμφανίζει σημαντική συσχέτιση με το βαθμό της ίνωσης, ακολουθώντας ένα

παρόμοιο πρότυπο έκφρασης ($p = 0,039$, $p = 0,006$ και $p = 0,008$, αντίστοιχα). Αξίζει να αναφερθεί ότι κανένας ασθενής με NAFLD δεν παρουσίασε μέτρια ή σοβαρή φλεγμονή ή και ίνωση, ως εκ τούτου, όλοι οι ασθενείς που ανήκουν στα στάδια φλεγμονής I-3 και I-4 και στα στάδια ίνωσης 2-6 αντιστοιχούν σε ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (**Πίνακας 17**)

Τα δεδομένα των συσχετίσεων της έκφρασης των γονιδίων που αναλύθηκαν σε ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (ΧΗΒ/δ, ΧΗΒ/υφ, ΧΗΒ/υπ, ΧΗC) και NAFLD παρουσιάζονται αναλυτικά στους **Πίνακες 20** και **21**, αντίστοιχα. Τέλος, το ιϊκό φορτίο (HBV DNA ορού ή HCV RNA) συσχετίστηκε θετικά με το βαθμό ΗΑΙ ($r = 0,646$ $p < 0,001$) και το στάδιο της ίνωσης ($r = 0,523$, $p < 0,001$), ενώ ο βαθμός ΗΑΙ συσχετίστηκε θετικά με τη σοβαρότητα της ίνωσης ($r = 0,760$, $p < 0,001$).



Εικ. 23 Ηπατική γονιδιακή έκφραση όλων των ασθενών με NAFLD ανάλογα με την ένταση της φλεγμονής και της ίνωσης του ήπατος. Τα θηκογράμματα παρουσιάζουν τη σχετική έκφραση, σε μεταγραφικό επίπεδο, των γονιδίων *TGFBR1/ALK5* (Α), *SMAD7* (Β), *INHBC* (Γ) και *ACVRI/ALK4* (Δ) ανάλογα με την ένταση της φλεγμονής του ήπατος και την έκφραση των γονιδίων *TGFBR1* (Ε), *SMAD7* (ΣΤ) και *INHBB* (Ζ) σύμφωνα με το στάδιο της ίνωσης (η σταδιοποίηση παρουσιάζεται στην ενότητα «Υλικά και μεθοδολογία της Έρευνας- Ιστολογική εξέταση βιοψιών ήπατος»). Η τιμή στατιστικής σημαντικότητας (p) που αναγράφεται σε κάθε διάγραμμα αναφέρεται στη στατιστική δοκιμασία Kruskal-Wallis H.

Πίνακας 20. Αποτελέσματα συσχετίσεων των ασθενών με ΧΗΒ

		ALT ^α	Ιικό φορτίο	TGFB1	TGFB2	TGFB3	ALK5	SMAD2	SMAD3	SMAD4	SMAD7	INHBA	INHBB	INHBC	INHBE	ALK4	CTGF
AST ^β	Συντελεστής συσχέτισης	0.835	0.656	0.057	0.061	-0.239	-0.503	0.106	-0.135	-0.264	-0.345	-0.340	-0.224	-0.388	-0.056	-0.372	-0.112
	ρ^{γ}	<0.001	<0.001	0.681	0.667	0.079	<0.001	0.445	0.324	0.054	0.010	0.017	0.126	0.006	0.703	0.009	0.447
ALT ^α	Συντελεστής συσχέτισης		0.687	0.077	0.058	-0.257	-0.571	0.131	-0.052	-0.218	-0.382	-0.428	-0.306	-0.437	-0.121	-0.404	-0.219
	ρ^{γ}		<0.001	0.578	0.685	0.058	<0.001	0.345	0.705	0.112	0.004	0.002	0.034	0.002	0.409	0.004	0.134
Ιικό φορτίο	Συντελεστής συσχέτισης			0.201	-0.021	-0.066	-0.308	0.310	0.177	0.112	-0.336	-0.266	-0.108	-0.420	-0.200	-0.409	0.115
	ρ^{γ}			0.142	0.883	0.631	0.023	0.022	0.195	0.419	0.012	0.064	0.463	0.003	0.169	0.004	0.435
TGFB1	Συντελεστής συσχέτισης				0.256	0.679	0.393	0.384	0.085	0.337	0.456	0.031	0.259	0.078	0.535	0.064	0.372
	ρ^{γ}				0.067	<0.001	0.003	0.004	0.637	0.013	<0.001	0.835	0.075	0.596	<0.001	0.668	0.009
TGFB2	Συντελεστής συσχέτισης					0.397	0.247	0.108	-0.045	0.077	0.191	0.144	0.122	0.031	0.218	0.089	0.488
	ρ^{γ}					0.004	0.078	0.444	0.752	0.589	0.176	0.323	0.408	0.832	0.133	0.549	0.001
TGFB3	Συντελεστής συσχέτισης						0.708	0.108	0.051	0.332	0.595	0.336	0.459	0.210	0.447	0.286	0.634
	ρ^{γ}						<0.001	0.436	0.711	0.014	<0.001	0.018	0.001	0.148	0.001	0.048	<0.001
ALK5	Συντελεστής συσχέτισης							0.047	0.061	0.246	0.596	0.410	0.363	0.301	0.284	0.292	0.441
	ρ^{γ}							0.735	0.660	0.076	<0.001	0.003	0.011	0.036	0.048	0.044	0.002
SMAD2	Συντελεστής συσχέτισης									0.852	0.372	0.025	0.079	0.312	0.200	-0.001	0.103
	ρ^{γ}									<0.001	0.006	0.858	0.592	0.031	0.167	0.997	0.485
SMAD3	Συντελεστής συσχέτισης										0.266	-0.195	0.228	0.244	0.095	-0.221	0.089
	ρ^{γ}										0.052	0.154	0.116	0.094	0.515	0.127	0.548
SMAD4	Συντελεστής συσχέτισης											0.223	0.225	0.349	0.247	0.014	0.297
	ρ^{γ}											0.104	0.120	0.015	0.087	0.924	0.040
SMAD7	Συντελεστής συσχέτισης												0.285	0.342	0.531	0.491	0.601
	ρ^{γ}												0.047	0.017	<0.001	<0.001	<0.001
INHBA	Συντελεστής συσχέτισης													0.518	0.607	0.295	0.633
	ρ^{γ}													<0.001	<0.001	0.040	<0.001
INHBB	Συντελεστής συσχέτισης														0.489	0.223	0.482
	ρ^{γ}														<0.001	0.127	0.001
INHBC	Συντελεστής συσχέτισης															0.433	0.830
	ρ^{γ}															0.002	<0.001
INHBE	Συντελεστής συσχέτισης																0.434
	ρ^{γ}																0.002
ALK4	Συντελεστής συσχέτισης																
	ρ^{γ}																0.128
																	0.391

^α ALT: τρανσαμινάση της αλανίνης, ^β AST: ασπαραγινική τρανσαμινάση, ^γ Η στατιστική σημαντικότητα (ρ) αναφέρεται στη δοκιμασία συσχέτισης κατά Spearman. Η σκίαση με σκούρο γκρι χρώμα αναφέρεται σε συσχετίσεις των οποίων η στατιστική σημαντικότητα (ρ) είναι < 0.01, ενώ η σκίαση με ανοιχτό γκρι χρώμα αναφέρεται σε συσχετίσεις των οποίων η στατιστική σημαντικότητα (ρ) είναι < 0.05.

Πίνακας 21. Αποτελέσματα συσχετίσεων των ασθενών με NAFLD

		ALT ^α	TGFB1	TGFB2	TGFB3	ALK5	SMAD2	SMAD3	SMAD4	SMAD7	INHBA	INBB	INHBC	INHBE	ALK4	CTGF
AST ^β	Συντελεστής συσχέτισης	0.808	-0.173	0.141	-0.305	-0.427	-0.274	-0.540	-0.473	-0.325	-0.353	-0.296	-0.265	0.122	-0.196	-0.211
	<i>p</i> ^γ	<0.001	.203	0.317	0.022	0.001	0.043	<0.001	<0.001	0.015	0.017	0.051	0.078	0.425	0.207	0.168
ALT ^α	Συντελεστής συσχέτισης		-0.140	0.055	-0.351	-0.438	-0.193	-0.388	-0.405	-0.296	-0.270	-0.256	-0.173	0.190	-0.068	-0.261
	<i>p</i> ^γ		0.304	0.699	0.008	0.001	0.157	0.003	0.002	0.027	0.073	0.093	0.256	0.211	0.664	0.087
TGFB1	Συντελεστής συσχέτισης			0.154	0.803	0.508	0.458	0.134	0.536	0.702	0.116	0.459	0.174	0.419	0.124	0.459
	<i>p</i> ^γ			0.275	<0.001	<0.001	<0.001	0.324	<0.001	<0.001	0.449	0.002	0.254	0.004	0.429	0.002
TGFB2	Συντελεστής συσχέτισης				0.311	0.234	0.061	-0.071	0.118	0.073	0.126	0.032	-0.075	0.104	0.058	0.384
	<i>p</i> ^γ				0.025	0.095	0.670	0.616	0.403	0.609	0.417	0.839	0.629	0.503	0.714	0.010
TGFB3	Συντελεστής συσχέτισης					0.702	0.382	0.218	0.553	0.551	0.365	0.506	0.135	0.340	0.191	0.569
	<i>p</i> ^γ					<0.001	0.004	0.107	<0.001	<0.001	0.014	<0.001	0.377	0.022	0.221	<0.001
ALK5	Συντελεστής συσχέτισης						0.465	0.387	0.400	0.538	0.518	0.488	0.206	0.176	0.174	0.553
	<i>p</i> ^γ						<0.001	0.004	0.003	<0.001	<0.001	0.001	0.174	0.248	0.264	<0.001
SMAD2	Συντελεστής συσχέτισης							0.524	0.478	0.489	0.386	0.587	0.530	0.225	0.554	0.494
	<i>p</i> ^γ							<0.001	<0.001	<0.001	0.009	<0.001	<0.001	0.138	<0.001	0.001
SMAD3	Συντελεστής συσχέτισης								0.215	0.215	0.516	0.380	0.399	0.036	0.481	0.355
	<i>p</i> ^γ								0.115	0.112	<0.001	0.011	0.007	0.815	0.001	0.018
SMAD4	Συντελεστής συσχέτισης									0.513	0.233	0.446	0.260	-0.042	0.227	0.380
	<i>p</i> ^γ									<0.001	0.124	0.002	0.084	0.784	0.143	0.011
SMAD7	Συντελεστής συσχέτισης										0.255	0.438	0.453	0.374	0.327	0.249
	<i>p</i> ^γ										0.091	0.003	0.001	0.011	0.032	0.103
INHBA	Συντελεστής συσχέτισης											0.517	0.554	0.388	0.619	0.298
	<i>p</i> ^γ											<0.001	<0.001	0.008	<0.001	0.052
INHBB	Συντελεστής συσχέτισης												0.548	0.230	0.540	0.446
	<i>p</i> ^γ												<0.001	0.133	<0.001	0.003
INHBC	Συντελεστής συσχέτισης													0.462	0.781	0.204
	<i>p</i> ^γ													0.001	<0.001	0.190
INHBE	Συντελεστής συσχέτισης														0.502	0.267
	<i>p</i> ^γ														0.001	0.083
ALK4	Συντελεστής συσχέτισης															0.333
	<i>p</i> ^γ															0.033

^α ALT: τρανσαμινάση της αλανίνης, ^β AST: ασπαραγινική τρανσαμινάση, ^γ Η στατιστική σημαντικότητα (*p*) αναφέρεται στη δοκιμασία συσχέτισης κατά Spearman. Η σκίαση με σκούρο γκρι χρώμα αναφέρεται σε συσχετίσεις των οποίων η στατιστική σημαντικότητα (*p*) είναι < 0.01, ενώ η σκίαση με ανοιχτό γκρι χρώμα αναφέρεται σε συσχετίσεις των οποίων η στατιστική σημαντικότητα (*p*) είναι < 0.05.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Συσχέτιση της ανοσορρύθμισης με τη φλεγμονή

Η μελέτη μας παρέχει σαφείς αποδείξεις ότι, ανεξάρτητα από την αιτία της ηπατικής βλάβης, η έκφραση του *FOXP3*, και όχι της *IL10* και του *TGFB1*, παρουσίασε μια θεαματική αύξηση που σχετίζεται με την ένταση της φλεγμονής του ήπατος. Επιπλέον, η επαγόμενη από απόπτωση φλεγμονή παρατηρείται σε ένα ευρύ φάσμα των νοσημάτων του ήπατος.

Είναι γνωστό ότι οι ιοί ευαισθητοποιούν τα ηπατοκύτταρα σε απόπτωση, ενώ είναι επίσης ικανοί να την αναστέλλουν, προκειμένου να επιτραπεί η επιβίωση των μολυσμένων κυττάρων-ξενιστών.³¹³ Επιπλέον, στη χρόνια ιογενή ηπατίτιδα παρατηρείται αυξημένη έκφραση των *Fas/FasL*.^{256,257, 314, 315, 316, 317} Ωστόσο, στη βιβλιογραφία υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά τη σχέση των παραπάνω μορίων με τη φλεγμονή (βαθμός HAI) και με τα επίπεδα της ALT.^{316,317,318} Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η έκφραση των γονιδίων *FAS* και *TRAIL* αυξάνεται σημαντικά στα πρώτα στάδια της ηπατικής φλεγμονής, γεγονός που θα μπορούσε να συμβάλει στην επαγωγή της. Καθώς η φλεγμονή επιδεινώνεται και η ίνωση (κίρρωση) εγκαθίσταται, η έκφραση αυτών των μεσολαβητών της απόπτωσης μειώνεται. Αυτό το εύρημα μπορεί να αποδοθεί στην εξέλιξη της ηπατικής βλάβης που ακολουθείται από την καταστροφή των ηπατοκυττάρων και τη συσσώρευση διηθούντων λεμφοκυττάρων. Ως εκ τούτου, μπορούν να δικαιολογηθούν και τα αυξημένα επίπεδα του *FASL*, που εκφράζεται κυρίως από τα CTL, παρά το γεγονός ότι δεν παρατηρείται παράλληλη αύξηση της έκφρασης του μορίου *TRAIL*, όπως αναμενόταν.

Από τα ευρήματα της εργασίας προκύπτει το εξαιρετικά ενδιαφέρον γεγονός ότι η απόπτωση όχι μόνο λαμβάνει χώρα στην NAFLD, αλλά μπορεί να είναι εξίσου υπεύθυνη για την επαγωγή της φλεγμονής, η οποία έως τώρα θεωρείται ότι συνδέεται με τη σχετιζόμενη με λιπίδια ενεργοποίηση του NFκB.^{318,319} Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στα περιστατικά αυτοάνοσης ηπατίτιδας, PBC και MTX-σχετιζόμενης ηπατοτοξικότητας που εξετάστηκαν, αν και ο αριθμός τους ήταν περιορισμένος. Μέχρι τώρα, υπάρχουν μόνο λιγοστά στοιχεία που να υποδεικνύουν ότι η αυξημένη έκφραση των μεσολαβητών της απόπτωσης *Fas/FasL* συνοδεύει την NAFLD.^{320, 321, 322, 323} Η συσχέτιση των μεσολαβητών της απόπτωσης με τη φλεγμονή που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με NAFLD υποστηρίζει τα δεδομένα των Feldstein και συν., τα οποία συσχετίζουν τη φλεγμονή με TUNEL-θετικά κύτταρα στο ίδιο νόσημα.³²²

Όπως προαναφέρθηκε, καταδείχθηκε υψηλή ηπατική έκφραση του γονιδίου *TRAIL*, που αποτελεί ακόμα ένα συνδέτη θανάτου, ο οποίος προκαλεί την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και κατ' επέκταση την απόπτωση. Αν και το *TRAIL* επάγει την απόπτωση, ως επί το πλείστον μετασχηματισμένων κυττάρων, πρόσφατες *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι προκαλεί στεάτωση και μαζική απόπτωση σε εκφυτεύματα ήπατος ασθενών με ιογενή ηπατίτιδα ή λιπώδες ήπαρ.^{324,325,326,327} Η αυξημένη έκφραση του *TRAIL* που παρατηρήθηκε ακολουθούσε το μοτίβο της έκφρασης του *FAS*, υποδηλώνοντας το σημαντικό ρόλο που μπορεί να διαδραματίζει αυτό το μόριο στην ηπατική φλεγμονή, ανεξάρτητα από την αιτία που την προκαλεί. Η φύση (διαλυτό ή διαμεμβρανικό) και η πηγή (ανοσοκύτταρα ή ηπατοκύτταρα) του *TRAIL*, καθώς και τα μόρια που δρουν αργότερα στο μονοπάτι (υποδοχείς και μεσολαβητές) και ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της σηματοδότησης στα ηπατοκύτταρα ή τα αστεροειδή κύτταρα μένει να καθοριστούν.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έντασης της χρόνιας φλεγμονής του ήπατος και των επιπέδων έκφρασης της *IL1B*, καθώς επίσης ότι τα μεταγραφικά επίπεδα της ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με ΧΗΒ και ΧΗC συγκριτικά με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση της έκφρασης των φλεγμονωδών κυτταροκινών *IL1B* και *TNFA*. Τα ευρήματα της μελέτης σχετικά με την έκφραση των φλεγμονωδών κυτταροκινών σε ηπατικά νοσήματα έρχονται σε συμφωνία με αυτά των Bortolami και συν., οι οποίοι περιέγραψαν χαμηλότερη έκφραση της *IL-1β* σε ασθενείς με ΧΗΒ και ΧΗC σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες.³²⁸ Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η συσσώρευση των διηθούντων λεμφοκυττάρων που παρατηρείται στη χρόνια ιογενή ηπατίτιδα, με αποτέλεσμα την αλλαγή των κυτταρικών πληθυσμών στο ήπαρ και την ύπαρξη χαμηλής αναλογίας κυττάρων που παράγουν τις προαναφερθείσες κυτταροκίνες. Από την άλλη πλευρά, δεν μπορεί να αποκλειστεί η χαμηλή παραγωγή των παραπάνω φλεγμονωδών κυτταροκινών στη χρόνια ιογενή φλεγμονή. Η *IL-1β* και ο *TNF-α* είναι κυτταροκίνες που ασκούν πλειοτροπικές δράσεις σε μια ποικιλία κυττάρων, παίζοντας θεμελιώδη ρόλο στις οξείες και χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις.^{329,330} Ο ρόλος τους στα αρχικά στάδια της τοπικής και συστηματικής φλεγμονής, ενεργοποιώντας ένα σύνθετο δίκτυο σηματοδοτικών μορίων, είναι αδιαμφισβήτητος και καλά χαρακτηρισμένος.^{329,330} Επιπλέον, μια σταθερά αυξημένη έκφραση της *IL-1β* και του *TNF-α* έχει αναφερθεί σε αρκετές περιπτώσεις χρόνιας τοπικής φλεγμονής, όπως στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και σε φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου, όπου η θεραπεία έναντι κυτταροκινών είναι πολύ αποτελεσματική, μειώνοντας τα συμπτώματα και επιβραδύνοντας ή σταματώντας την ιστική βλάβη.³³¹ Ωστόσο, σε περιπτώσεις σοβαρής συστηματικής φλεγμονής έχουν αναφερθεί μειωμένα επίπεδα του mRNA των φλεγμονωδών κυτταροκινών *IL-1β* και

TNF- α που παράγονται από το ήπαρ και τα κύτταρα του αίματος.^{331,332} Ως αποτέλεσμα, η θεραπεία έναντι των κυτταροκινών σε αυτούς τους ασθενείς είναι επιζήμια.³³¹ Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης φαίνεται να δείχνουν ότι ένα παρόμοιο φαινόμενο παρατηρείται στη χρόνια ηπατική φλεγμονή, ιδίως σε περιπτώσεις χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας. Λαμβάνοντας υπόψη τα σταθερά χαμηλά επίπεδα των φλεγμονωδών κυτταροκινών σε ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα, καθώς και το γεγονός ότι η έναντι κυτταροκινών θεραπεία για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και τα φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου μπορεί να οδηγήσει σε επανενεργοποίηση των HBV ή HCV λοιμώξεων,³³³ η συμβολή μιας αδόκιμης φλεγμονώδους αντίδρασης ως αίτιο της χρονιότητας των ιογενών λοιμώξεων θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και παραμένει να προσδιοριστεί.

Από τα αποτελέσματα σχετικά με την έκφραση του *FOXP3*, της *IL10*, και του *TGFB1*, συνεπάγεται ότι τα tTregs και FOXP3⁺ pTregs, και όχι τα Tr1 και Th3 pTregs, θα μπορούσαν να συμβάλουν με άγνωστες προς το παρόν μεθόδους στη φλεγμονώδη νόσο του ήπατος. Πολύ ενδιαφέρουσα είναι η διαπίστωση ότι η αυξημένη έκφραση του *FOXP3*, και ως εκ τούτου η συσσώρευση των FOXP3⁺ Tregs στο ήπαρ, χαρακτηρίζει όχι μόνο την ιογενή ηπατίτιδα, αλλά και την NAFLD, καθώς και την αυτοάνοση ηπατίτιδα, την PBC και την ηπατοτοξικότητα που σχετίζεται με τη λήψη MTX. Μέχρι τώρα, η αύξηση της συχνότητας των tTregs στο περιφερικό αίμα ή και η συσσώρευσή τους στο ήπαρ των ασθενών με ΧΗΒ ή ΧΗC έχει αποδοθεί στην έκπτυξη των Tregs για τη ρύθμιση της λειτουργίας των ειδικών έναντι του ιού T-κυττάρων.^{138,215, 334, 335, 336} Επιπλέον, έχει προταθεί ότι οι ιοί συμβάλλουν στην παραγωγή των ειδικών έναντι του ιού Tregs, καταστέλλοντας τους ειδικούς T-κυτταρικούς κλώνους επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη διατήρηση των ιικών λοιμώξεων.^{137,138,335,337} Ωστόσο, τα στοιχεία που υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση παραμένουν ασαφή. Αντιθέτως, έχει περιγραφεί ότι η ελάττωση των tTregs σε ποντίκια οδηγεί σε ανοσοπαθολογία και επιδείνωση λοιμωδών νοσημάτων που προκαλούνται από διάφορα παθογόνα.^{338,339} Πράγματι, η ομάδα των Wei και συν., μελετώντας πρόσφατα ένα μοντέλο ηπατικής φλεγμονής (προκαλούμενης από con-A) σε ποντίκια, διαπίστωσαν ότι η μείωση των FOXP3⁺ Tregs είχε ως αποτέλεσμα την επιδείνωση της φλεγμονής.²⁷⁰ Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η επίμονη φλεγμονή του ήπατος, ανεξαρτήτως αιτιολογίας, φαίνεται να αποτελεί ένα βασικό παράγοντα που συμβάλλει στην έκπτυξη των Tregs. Σε μια τέτοια περίπτωση, η περιγραφόμενη καταστολή των ειδικών έναντι του ιού T-κυττάρων θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μία παράπλευρη δράση (bystander effect) των Tregs που έχουν εκπτυχθεί λόγω της παρατεταμένης επαγόμενης από απόπτωση φλεγμονής.

Συνολικά, τα αποτελέσματα μας είναι σε συμφωνία με την ελκυστική άποψη των Zheng και Rudensky οι οποίοι υποστηρίζουν ότι τα Tregs «παίζουν ζωτικό ρόλο στην πρόληψη της αυτοανοσίας και την παθολογία που προκαλείται από τις ανεξέλεγκτες ανοσιακές απαντήσεις στις λοιμώξεις». ³⁴⁰ Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα που παρέχονται από τη συγκεκριμένη μελέτη θα μπορούσαν να ενσωματωθούν σε ένα ενιαίο μοντέλο των ρυθμιστικών κυττάρων σχετικό με την ιστική βλάβη λόγω φλεγμονής προκαλούμενης από αυξημένη απόπτωση, όπως περιγράφεται παρακάτω. **Η υπερβολική απόπτωση που επάγεται από διάφορα ιστικά ερεθίσματα (tissue insults) μπορεί να ξεπεράσει την ικανότητα των μακροφάγων για ασφαλή κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων. Κατά συνέπεια, η εμφάνιση της φλεγμονής δεν μπορεί να παρεμποδιστεί από την έκκριση των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μακροφάγα. Παράλληλα, η υπερβολική παρουσίαση αυτοαντιγόνων που λαμβάνει χώρα οδηγεί στην ενεργοποίηση αυτοδραστικών T-κυττάρων. Επομένως, προκαλείται έκπτυξη των ήδη υπάρχοντων κλώνων Tregs, ώστε να επιτευχθεί η παρεμπόδιση πιθανής καταστροφικής αυτοανοσίας στον προσβεβλημένο ιστό από αυτοδραστικούς T-κλώνους (Εικ. 24).**



Εικ. 24 Υποθετικό μοντέλο λειτουργίας των ρυθμιστικών κυττάρων σχετικό με την ιστική βλάβη λόγω φλεγμονής προκαλούμενης από αυξημένη απόπτωση.

Πρόσφατες μελέτες τόσο σε ζωικά μοντέλα όσο και στον άνθρωπο έδειξαν αύξηση των Tregs στον ηπατικό ιστό σε αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, ^{341,342} λαμβάνοντας επίσης υπόψη ότι στην ΑΗ βρέθηκε μικρότερος αριθμός αυτών των κυττάρων σε σχέση με την ΡΒC, όπως αυτοί υπολογίστηκαν με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους. ³⁴¹ Παρά το γεγονός ότι η παρούσα μελέτη παρέχει περιορισμένα μεν, αλλά σύμφωνα δεδομένα

σχετικά με την αυτοάνοση ηπατίτιδα/κίρρωση και την PBC, μπορεί να θεωρηθεί ότι σε αυτές τις περιπτώσεις, η επαγόμενη από απόπτωση φλεγμονή μπορεί να είναι το αποτέλεσμα και όχι η αιτία της αυτοάνοσης βλάβης, η οποία θα μπορούσε να έχει ξεκινήσει λόγω ελαττωματικής λειτουργίας των Tregs. Σε αυτήν την περίπτωση, τα γεγονότα που περιγράφονται παραπάνω θα μπορούσαν να ξεκινούν και να διαιωνίζουν ένα φαύλο κύκλο που οδηγεί στην καταστροφή του ιστού. Με άλλα λόγια, το περιγραφέν μοντέλο δείχνει ότι τα Tregs θα μπορούσαν να είναι ο συνδετικός κρίκος για την υπόθεση της «διάθεσης των αποβλήτων» (waste disposal theory) της αυτοανοσίας.³⁴³

4.2 Ανοσορρύθμιση και απάντηση σε θεραπεία

Η παρούσα μελέτη παρέχει σαφείς αποδείξεις ότι στο αρνητικό για το αυστραλιανό αντιγόνο (HBeAg) μοντέλο της ΧΗΒ, η έκφραση του *FOXP3* (που χαρακτηρίζει κυρίως τα tTregs), καθώς και εκείνη της *IL10* και του *TGFB1* (που χαρακτηρίζουν τα Tr1 και Th3 pTregs),³⁴⁴ ανευρίσκεται μειωμένη στο ήπαρ των ασθενών σε διατηρούμενη, έπειτα από θεραπεία, μακροχρόνια ύφεση συγκριτικά με τις περιπτώσεις των ασθενών που παρουσιάζουν ιστολογικά, βιοχημικά και ιολογικά ενεργή νόσο κατά τη διάγνωση, πριν λάβουν οποιαδήποτε θεραπεία. Ταυτόχρονη μείωση παρατηρείται και στα ηπατικά επίπεδα του mRNA των *FASL* και *PD1* (που εκφράζονται κυρίως από CTL, τα οποία χαρακτηρίζονται επίσης από την έκφραση του CD8) και του *PDL1* (που αποδίδεται κυρίως σε μολυσμένα ηπατοκύτταρα και διηθούντα λεμφοκύτταρα) στους ασθενείς που βρίσκονται σε μακροχρόνια διατηρούμενη ύφεση. Ωστόσο, η μείωση του *CD8*, χωρίς παράλληλη αύξηση της *IL2* και της *IFNG*, δε συνηγορεί υπέρ της αποκατάστασης της ανοσιακής απάντησης μέσω των T-κυττάρων, αλλά μάλλον αντικατοπτρίζει τη μείωση των CTL και την κυτταρόλυση των ηπατοκυττάρων όταν η φλεγμονή του ήπατος υποχωρεί λόγω της μακροχρόνιας αντι-ιϊκής θεραπείας. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζονται επίσης σε πρωτεϊνικό επίπεδο από τα αποτελέσματα των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων που πραγματοποιήθηκαν για τα μόρια FOXP3, PD1, PDL1, CD4 και CD8. Όπως προαναφέρθηκε, η μείωση της έκφρασης του *FOXP3* δεν ακολουθήθηκε από ανάλογη μείωση των επιπέδων mRNA του *CD4* στον ηπατικό ιστό. Προφανώς, αυτό μπορεί να αντανακλά το γεγονός ότι CD4⁺ κύτταρα δεν είναι μόνο τα Tregs αλλά κι άλλοι υποπληθυσμοί των T-κυττάρων, όπως τα Th17 κύτταρα.³⁴⁴ Ωστόσο, δεν ήταν δυνατή η πραγματοποίηση μιας πιο συγκεκριμένης ανάλυσης των υποπληθυσμών των T-κυττάρων με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής στους διαθέσιμους ηπατικούς ιστούς κι αυτό αποτελεί έναν από τους περιορισμούς της παρούσας μελέτης. Κατά συνέπεια, οι μεταβολές της συχνότητας των CD4⁺ T-κυττάρων

που παρατηρούνται δεν μπορούν με βεβαιότητα να αποδοθούν σε κάποιο συγκεκριμένο υποπληθυσμό των T-κυττάρων.

Τα δεδομένα που προκύπτουν από τη μελέτη υποστηρίζουν περαιτέρω την αντίληψη ότι το μονοπάτι των PD1/PDL1 (τα αυξημένα επίπεδα του PD1 στα T-κύτταρα και η αυξημένη έκφραση του PDL1 στα ηπατοκύτταρα) σχετίζεται με τη δυσλειτουργία των T-κυττάρων στις χρόνιες HBV και HCV λοιμώξεις.³⁴⁵ Στο πλαίσιο αυτό, έχει προταθεί ότι η παρεμπόδιση του μονοπατιού αυτού αποτελεί μια λογική θεραπευτική στρατηγική για τη «διάσωση» των δυσλειτουργικών T-κυττάρων, με στόχο την αποκατάσταση των ειδικών έναντι των HBV και HCV T-κυτταρικών απαντήσεων. Οι Fiscaro και συν.,³⁴⁶ έπειτα από *ex vivo* μελέτες που διεξήγαγαν σε πειραματικά μοντέλα ΧΗΒ, διαπίστωσαν πως ο αποκλεισμός (blockade) του μονοπατιού PD1/PDL1 οδηγεί σε λειτουργική ανάκαμψη των αντι-HBV T-κυττάρων. Επιπρόσθετα, αυτά τα ειδικά T-κύτταρα του ήπατος παρουσίασαν καλύτερη αποκατάσταση των λειτουργιών τους συγκριτικά με τα T-κύτταρα του περιφερικού αίματος, η οποία χαρακτηριζόταν από τον πολλαπλασιασμό των CD8⁺ κυττάρων και την παραγωγή της IFN- γ και της IL-2 από τα ενδοηπατικά λεμφοκύτταρα. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη βέβαιο εάν η έκφραση του PDL1 στα ηπατοκύτταρα συμβάλλει πραγματικά στην ανάπτυξη της εξάντλησης των T-κυττάρων ή αν αποτελεί έναν ομοιοστατικό μηχανισμό που μειώνει τη φλεγμονώδη αντίδραση.³⁴⁵ Οι Kassel και συν., ανέφεραν ότι η ηπατική έκφραση των μορίων PD1/PDL1 συνδέεται πιο άμεσα με το βαθμό της φλεγμονής παρά με την υποκείμενη αιτιολογία της ηπατικής βλάβης, συμπεραίνοντας ότι η οδός PD1 μπορεί να βοηθήσει το ήπαρ να προστατευθεί από ανοσομεσολαβούμενη καταστροφή.³⁴⁷ Δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση των μορίων *CD4*, *IL2* και *IFNG*, τα ευρήματά μας δεν υποστηρίζουν τη λειτουργική αποκατάσταση των T_H17 στη μακροπρόθεσμα διατηρούμενη ύφεση της χρόνιας HBV λοίμωξης. Είναι ενδιαφέρον ότι οι ανωτέρω διαπιστώσεις αναφορικά με τη λειτουργία των T_H17 στην ύφεση είναι σύμφωνες με τα ευρήματα των Nan και συν., τα οποία υποδηλώνουν ότι οι εξασθενημένες ανοσιακές αποκρίσεις των ασθενών με ΧΗΒ δεν αποκαθίστανται πλήρως από τη θεραπεία, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην έκφραση της IFN- γ .³⁴⁸ Από την άλλη πλευρά, οι εκφράσεις των *PD1* και *PDL1* συσχετιζόνταν σημαντικά με την ένταση της φλεγμονής του ηπατικού ιστού. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν περαιτέρω τα συμπεράσματα των Kassel και συν., που υποστηρίζουν πως η μειωμένη έκφραση των μορίων PD1 και PDL1 που παρατηρείται κατά τη διατηρούμενη ύφεση αποτελεί ένα επιφανόμενο, είτε συμβάλλοντας στη λύση της ενεργού ηπατικής φλεγμονής είτε προκύπτοντας από αυτή.³⁴⁷

Επιπλέον, παρατηρήσαμε μια αρνητική ρύθμιση της έκφρασης (down-regulation) των μεσολαβητών απόπτωσης *FAS* και *FASL* σε καταστάσεις μακροχρόνιας ύφεσης σε

ασθενείς με ΧΗΒ. Λαμβάνοντας υπόψη ότι προηγούμενες μελέτες, συμπεριλαμβανομένης και της δική μας, καταδεικνύουν τη μεγάλη σημασία της συμβολής της οδού Fas/FasL στη ΧΗΒ, η οποία φαίνεται να είναι στενά σχετιζόμενη με το βαθμό της φλεγμονής του ήπατος,^{317,349} τα ευρήματά μας επιβεβαιώνουν περαιτέρω τη θεωρία ότι αντιπροσωπεύει την πιο κοινή και αποτελεσματική οδό για το θάνατο των μολυσμένων με ιό κυττάρων στο ήπαρ.³⁵⁰ Από την άλλη πλευρά, παρατηρήσαμε μία απροσδόκητη αρνητική συσχέτιση της έκφρασης του *TRAIL* με την ένταση της ηπατικής φλεγμονής και το στάδιο της νόσου (ενεργή νόσος έναντι ύφεσης της νόσου), αφού οι ασθενείς που βρίσκονταν σε μακροχρόνια ύφεση του νοσήματος εμφάνισαν αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα του μορίου στο ήπαρ. Το *TRAIL* είναι ένα προσφάτως χαρακτηρισμένο μέλος της υπερικογενείας TNF, ικανό να ενεργοποιεί την απόπτωση σε διάφορα καρκινικά ή και μολυσμένα από ιούς κύτταρα, μέσω της πρόσδεσής του σε ορισμένους υποδοχείς θανάτου, όπως είναι οι DR4 και DR5.^{324,351,352} Ωστόσο, το *TRAIL* μπορεί επίσης να συνδεθεί με τους υποδοχείς-δολώματα DcR1, εξουδετερώνοντας τη δράση του, και DcR2 που προκαλεί την ενεργοποίηση του NFκB, οδηγώντας σε μεταγραφή γονιδίων που είτε ανταγωνίζονται το μονοπάτι σηματοδότησης θανάτου ή και προωθούν τη φλεγμονή.^{353,354} Από τη άλλη μεριά, τα αυξημένα επίπεδα του *TRAIL* είναι ικανά όχι μόνο να επάγουν την απόπτωση αλλά και να μειώσουν τη φλεγμονή, όπως έχει ήδη καταδειχθεί από μελέτες σε ζωικά μοντέλα φλεγμονώδους αρθρίτιδας του γόνατος.³⁰² Λαμβάνοντας υπόψη ότι δεν έχουν διερευνηθεί οι καταρράκτες ενεργοποίησης του *TRAIL* στο μοντέλο της νόσου που μελετάμε, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος αυτού του μορίου στην παθογένεια ή και την αποκατάσταση της φλεγμονής του ήπατος.

Επιπρόσθετα, παρατηρήσαμε μια σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA γονιδίων ενδεικτικών της ανοσοκαταστολής που επάγεται μέσω των T-κυττάρων. Τέτοια γονίδια είναι το *FOXP3*, η *IL10* και ο *TGFB1*. Το πρότυπο, μάλιστα, της έκφρασης του *FOXP3* ήταν ταυτόσημο με αυτά των γονιδίων *PD1* και *PDL1*, ενώ χαρακτηριζόταν από σημαντική θετική συσχέτιση με την ένταση της ηπατικής φλεγμονής. Παρά το γεγονός ότι τα Foxp3⁺ Tregs φαίνεται να προστατεύουν το ήπαρ από την ανοσιακή βλάβη και να εκθέτουν σε κίνδυνο τον έλεγχο του ιού κατά τη διάρκεια της πειραματικά επαγόμενης οξείας HBV λοίμωξης,^{346, 355} ο ρόλος τους στις χρόνιες ιογενείς λοιμώξεις, που προκαλούνται τόσο από τον HBV όσο και από τον HCV, έχει περιγραφεί να κυμαίνεται από την καταστολή των T-κυτταρικών απαντήσεων έναντι των ιών έως την αρνητική ρύθμιση των ανοσιακών απαντήσεων που προκαλούν τη βλάβη του ήπατος.³⁴⁶ Έτσι, το αρχικό στάδιο της έκπτυξης της προσαρμοστικής ανοσιακής απάντησης έναντι ιών ακολουθείται από ένα στάδιο συστολής (contraction), κατά το οποίο τα Tregs θα μπορούσαν να διαδραματίσουν έναν εξέχοντα ρόλο στη διατήρηση μια λεπτής

ισορροπίας ανάμεσα σε μια ισχυρή ανοσιακή απόκριση για την κάθαρση της λοίμωξης και τις συνέπειες της παρατεταμένης ανοσιακής ενεργοποίησης και φλεγμονής.³⁴⁶

Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι τα CD4⁺CD25⁺ Tregs διαδραματίζουν ενεργό ρόλο στη ΧΗΒ, όχι μόνο ρυθμίζοντας τους τελεστές της ανοσιακής απάντησης κατά του ΗΒV, αλλά επίσης επηρεάζοντας την πρόγνωση της νόσου. Διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν περιγράψει αυξημένη συχνότητα των Foxp3⁺ Tregs στο ήπαρ ασθενών με σοβαρή ΧΗΒ συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες,^{138,215,216,335,346,356,357,358,359} ενώ η συχνότητά τους στο περιφερικό αίμα έχει συσχετιστεί με το ιϊκό φορτίο που ανευρίσκεται στον ορό των ασθενών.^{215,356} Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η εξάντληση των κυκλοφορούντων Tregs σε τέτοιους ασθενείς οδηγεί στην αύξηση της IFN-γ που παράγεται από μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (ΜΚΠΑ) που έχουν διεγερθεί με αντιγόνα του ΗΒV (HBV antigens, HBV-Ag). Επιπλέον, τα CD4⁺CD25⁺ Tregs ήταν ικανά να καταστείλουν τον πολλαπλασιασμό των αυτόλογων ΜΚΠΑ που προκαλείται από ΗΒV-Ag, πιθανόν αντανάκλωντας την παραγωγή ειδικών αντι-ΗΒV-Ag Tregs (ιστικών αλλά και κυκλοφορούντων).²¹⁵ Σε αυτό το πλαίσιο, οι Stross και συν. απέδειξαν πρόσφατα ότι τα Tregs καθυστερούν σημαντικά την κάθαρση του ΗΒV από το αίμα και τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα σε ένα μοντέλο οξείας λοίμωξης με ΗΒV σε επίμυες, μειώνοντας την αντι-ιϊκή δράση των Tregs μέσω του περιορισμού της παραγωγής κυτταροκινών καθώς και της κυτταροτοξικότητας.³⁵⁵

Επιπρόσθετα, παρατηρήσαμε ότι η συσσώρευση των Foxp3⁺ Tregs λαμβάνει χώρα σε ασθενείς με χρόνια ηπατική φλεγμονή (ανεξάρτητα από τον αρχικό επαγωγέα της ηπατικής βλάβης) και συσχετίζεται με την αυξημένη έκφραση μεσολαβητών της απόπτωσης, δεδομένα που μας οδήγησαν στη διατύπωση ενός υποθετικού μοντέλου για τη δράση των Tregs στη χρόνια φλεγμονή.³⁴⁹ Υποθέτοντας πως ισχύει αυτό μοντέλο, ότι δηλαδή η έκπτυξη των Tregs στη χρόνια ηπατική φλεγμονή προστατεύει από την ιστική βλάβη και την πιθανή καταστροφική παθολογία, τότε **η περιγραφείσα καταστολή των ειδικών έναντι του ιού T-κυττάρων θα μπορούσε να θεωρηθεί ως συνέπεια των tTregs** (τα οποία έχουν εκπτυχθεί λόγω της εμμένουσας επαγόμενης από απόπτωση φλεγμονής). Πρόσφατα, οι Peiseler και συν., περιέγραψαν την παρουσία φυσιολογικών συχνοτήτων και τη σωστή λειτουργία των Tregs σε ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1, ενισχύοντας την υπόθεσή μας.³⁶⁰ Πράγματι, βρήκαν υψηλότερες συχνότητες των Tregs στο αίμα και τον ηπατικό ιστό ασθενών που είχαν ενεργή νόσο, οι οποίες συσχετιζόνταν με την φλεγμονώδη δραστηριότητα του ήπατος, σε σύγκριση με το στάδιο της ύφεσης.³⁶⁰ Επιπλέον, οι Otano και συν., μελετώντας αρκτόμυες που έπασχαν από χρόνια λοίμωξη από ιό ηπατίτιδας (Woodchuck Hepatitis Virus, WHV), κατέδειξαν αύξηση των ηπατικών Tregs, η οποία συνοδευόταν από σημαντικά υψηλή έκφραση αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο

TGF-β1 και η IL-10 και ανοσοκατασταλτικών μορίων, όπως τα PD1/PDL1.³⁶¹ Παρόμοια λοιπόν με τη χρόνια λοίμωξη από HBV, η εμμένουσα λοίμωξη από WHV σχετίζεται με ένα ισχυρά ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον εντός του ήπατος. Θεωρούμε ότι τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ, τα οποία περιλαμβάνουν τη μελέτη της οδού PD1/PDL1, αν και βασίζονται κυρίως σε συσχετίσεις, παρέχουν περαιτέρω στήριξη στο παραπάνω περιγραφέν προτεινόμενο μοντέλο.

Όπως προαναφέρθηκε, οι HBeAg-αρνητικοί ΧΗΒ ασθενείς της μελέτης, οι οποίοι βρίσκονταν σε μακροχρόνια διατηρούμενη ύφεση ύστερα από θεραπεία, εμφάνισαν μειωμένη ηπατική έκφραση των γονιδίων *FOXP3*, *PD1* και *PDL1* που επίσης συσχετίστηκε με ελαχίστης έντασης ηπατική φλεγμονή. Ωστόσο, οι ασθενείς αυτοί δεν παρουσίασαν φαινόμενα ανοσιακής αποκατάστασης τα οποία είναι εμφανή κατά την *ex vivo* λοίμωξη από HBV στον άνθρωπο,^{346,362} καθώς και στα ζωικά μοντέλα οξέων³⁵⁵ και χρόνιων ηπατικών ιογενών λοιμώξεων.³⁶¹ Ως εκ τούτου, η στόχευση των Tregs ή και της οδού PD1/PDL1 στην οξεία ή πρώιμα στο περιβάλλον μιας χρόνιας HBV λοίμωξης, θα πρέπει να εξεταστεί προσεκτικά ως θεραπευτική στρατηγική, δεδομένου ότι η εξάλειψή τους μπορεί να προκαλέσει αυτοάνοσα φαινόμενα ή να αυξήσει την ανοσομεσολαβούμενη ηπατική βλάβη.

Εν κατακλείδι, τα δεδομένα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι στο HBeAg-αρνητικό μοντέλο της ΧΗΒ, το ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον του ήπατος μειώνεται στη μακροχρόνια διατηρούμενη ύφεση του νοσήματος, σε σύγκριση με τις περιπτώσεις που εμφανίζουν ιστολογικά, βιοχημικά και ιολογικά ενεργή νόσο κατά τη διάγνωση, πριν από οποιαδήποτε θεραπεία. Επιπρόσθετα, η μείωση των ανασταλτικών οδών, όπως μετράται από τη μείωση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των αντιπροσωπευτικών μορίων τους στο ήπαρ κατά τη μακροχρόνια ύφεση, είναι πιθανώς συνέπεια της ελάττωσης της ηπατικής φλεγμονής, αφού υπερ-εκφράζονται, προκειμένου να αντισταθμίσουν τη δράση αλλο- ή και αυτο-δραστικών κλώνων Tregs.

4.4 Ανοσορρύθμιση στον αρθρικό υμένα ασθενών με οστεοαρθρίτιδα

Τα τελευταία χρόνια, η φλεγμονή του αρθρικού υμένα (ΑΥ) και το ανοσιακό σύστημα, μέσω της συμμετοχής τόσο της έμφυτης όσο και της προσαρμοστικής ανοσίας, θεωρούνται βασικοί παράγοντες για την ανάπτυξη και την εξέλιξη του νοσήματος της οστεοαρθρίτιδας.^{285, 363, 364, 365, 366, 367} Επιπλέον, η απόπτωση που παρατηρείται στην ΟΑ έχει αναδειχθεί ως κρίσιμος παράγοντας που ενέχεται στην παθογένεια του νοσήματος.^{292, 293, 294, 295, 296, 297, 363}

Έχοντας καταδειχθεί η συσχέτιση της ανοσορρύθμισης και της απόπτωσης με τη χρόνια φλεγμονή σε προγενέστερες αλλά και στην παρούσα μελέτη^{317,349, 368} και δεδομένου του ρόλου της απόπτωσης στην ΟΑ, καθώς και της αδιευκρίνιστης σχέσης των παραπάνω μηχανισμών στο παρόν νόσημα, διερευνήθηκε ο ρόλος της ανοσορρύθμισης στην επαγόμενη από απόπτωση άσηπτη φλεγμονή του ΑΥ.

Μολονότι δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων *FOXP3*, *FAS*, *FASL* και *TRAIL* μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου, εντούτοις, αναδείχθηκαν σημαντικές θετικές συσχετίσεις της έκφρασης του *FOXP3* με αυτή των κύριων μεσολαβητών της απόπτωσης *FAS*, *FASL* και *TRAIL*. Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν περαιτέρω τα ευρήματά μας από τη μελέτη στον ηπατικό ιστό, τα οποία συσχετίζουν ισχυρά την έκφραση των κύριων μεσολαβητών της απόπτωσης με την έκφραση του *FOXP3* στο χρόνια φλεγμαίνοντα ηπατικό ιστό.^{349,368} Αυτή η συσχέτιση που παρατηρείται μπορεί να αποτελεί έναν ισχυρό προστατευτικό μηχανισμό του ανοσιακού συστήματος μέσω της έκπτυξης των Foxp3⁺ Tregs (φυσικών και περιφερικά επαγόμενων) για την παρεμπόδιση της παράπλευρης βλάβης υγιούς ιστού και πιθανής καταστροφικής παθολογίας. Σ' αυτό το πλαίσιο, οι Υudoη και συν., έχουν επίσης αναφέρει αυξημένη παρουσία των κυττάρων Tr1 στον ΑΥ της ΟΑ συγκριτικά με αυτόν της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, καταδεικνύοντας έναν προστατευτικό ρόλο (έναντι επιβλαβών υπέρμετρων ανοσιακών απαντήσεων) που μπορεί να διαδραματίζουν αυτά τα κύτταρα στην παθογένεια της ΟΑ.³⁶⁹

Κατά το διαχωρισμό των ασθενών με ΟΑ ανάλογα με το μακροσκοπικό φαινότυπο της πάσχουσας άρθρωσης προέκυψαν τρεις υποομάδες: μία με ατροφικό φαινότυπο, μία με υπερτροφικό φαινότυπο και μία με «φυσιολογικό» φαινότυπο ΟΑ (ΑΦ, ΥΦ και ΦΦ, αντίστοιχα). Παρά το γεγονός ότι δε βρήκαμε καμία σημαντική διαφορά της γονιδιακής έκφρασης στο σύνολο των ασθενών με ΟΑ συγκριτικά με την ομάδα μαρτύρων, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της μεταγραφικής έκφρασης του *TRAIL* στην υποομάδα των ασθενών με ΥΦ σε σύγκριση με τις υποομάδες με ΑΦ και ΦΦ, καθώς και με την ομάδα ελέγχου.

Το μόριο *TRAIL* είναι ένα μέλος της υπεροικογένειας *TNF* που εκφράζεται από πολλούς τύπους κυττάρων.^{370,371} Εκτός από την επαγωγή της απόπτωσης, διαδραματίζει πολλούς ακόμα ρόλους, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης της φυσικής ανοσίας.³⁷² Αναφορικά με την απόπτωση, η σηματοδότηση μέσω του *TRAIL* μεσολαβείται από δύο τύπους υποδοχέων, οι οποίοι διαφέρουν στην ικανότητά τους είτε να επάγουν είτε να αναστέλλουν την απόπτωση.³⁷³ Οι υποδοχείς *TRAIL-R1* και *TRAIL-R2* επάγουν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, ενώ το δεύτερο είδος υποδοχέων *TRAIL*, δηλαδή οι *TRAIL-R3*, *TRAIL-R4* και η οστεοπροτεγερίνη (*osteoprotegerin*, *OPG*) δρουν ως υποδοχείς δολώματα.³⁷⁴ Σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, οι

Dharmaratni και συν., δεν παρατήρησαν διαφορές στην έκφραση του TRAIL, ωστόσο αναφέρουν αυξημένα επίπεδα TRAIL-R1 στον ΑΥ σε ασθενείς με ΟΑ. Εντούτοις, αξίζει να αναφερθεί ότι δε διεξήχθη περαιτέρω ανάλυση των διαφόρων υποομάδων της ΟΑ, ομοίως με αυτή της μελέτης μας.³⁷⁵

Προφανώς, σε αυτό το σημείο θα πρέπει κανείς να εξακριβώσει την προέλευση αυτής της αυξημένης έκφρασης του TRAIL στον ΑΥ ασθενών με ΥΦ. Λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο αριθμό των μακροφάγων που διηθούν το φλεγμαίνοντα ΑΥ στην ΟΑ, η αυξημένη έκφραση TRAIL θα μπορούσε να αποδοθεί σε αυτόν τον κυτταρικό πληθυσμό^{285,364,375,376} και αυτό αποτελεί ένα σημείο που θα πρέπει να διερευνηθεί σε μελλοντικές μελέτες. Γνωρίζοντας επίσης ότι η σηματοδότηση του TRAIL μπορεί να προκαλέσει είτε επαγωγή είτε αναστολή της απόπτωσης, ανάλογα με τον υποδοχέα στον οποίο δεσμεύεται, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω μελετών που να επικεντρώνονται στην έκφραση και την πρόσδεση των υποδοχέων, προκειμένου να διευκρινιστεί η επίδραση της αύξησης του TRAIL στον αρθρικό υμένα.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν πρόσφατες μελέτες σε ζωικά μοντέλα που έχουν δείξει ότι η ενδο-αρθρική γονιδιακή μεταφορά του TRAIL μέσω αδενοϊού [adenoviral, (Ad)-TRAIL] και η έγχυση ανασυνδυασμένης (recombinant) πρωτεΐνης TRAIL (rTRAIL) είναι ικανές να επάγουν την απόπτωση στις αρθρώσεις ενός ζωικού μοντέλου αρθρίτιδας κουνελιών μειώνοντας τη φλεγμονή.^{301,302} Σύμφωνα με τα παραπάνω ευρήματα αλλά και με αυτά της παρούσας μελέτης, φαίνεται πως χρειάζεται να πραγματοποιηθούν επιπλέον μελέτες ώστε να διαλευκάνουν τον ακριβή ρόλο που διαδραματίζει αυτό το μόριο στην παθογένεια ή και στην εξέλιξη της φλεγμονής που παρατηρείται στην ΟΑ, καθώς και η πιθανή δυνατότητά του να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο ή παράγοντα ο οποίος θα περιορίζει τη φλεγμονή του ιστού.

Εν κατακλείδι, τα ευρήματά μας, αν και προκύπτουν κυρίως από συσχετίσεις, υποστηρίζουν περαιτέρω την ιδέα ότι **η ανοσορρύθμιση συνδέεται στενά με την εμμένουσα απόπτωση**. Το TRAIL, με τη σειρά του, φαίνεται ότι συμβάλλει στη φλεγμονή του αρθρικού υμένα και ίσως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιολογικός δείκτης του φαινοτύπου του νοσήματος.

4.3 Ο προστατευτικός ρόλος του SMAD7 στην ηπατική ίνωση

Τα αποτελέσματά μας παρέχουν σαφείς ενδείξεις ότι το μόριο SMAD7, που αποτελεί τον κύριο αναστολέα της οδού σηματοδότησης TGF-β/Ακτιβινών, παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα κατά τη λύση της χρόνιας ηπατικής φλεγμονής, δεδομένου ότι οι ασθενείς με ΧΗΒ σε ύφεση (ΧΗΒ/υφ) υπερεκφράζουν SMAD7 σε σύγκριση με τους

ασθενείς στη διάγνωση (XHB/δ). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι το μοτίβο έκφρασης του *SMAD7* στη XHB παρομοιάζει με αυτό που παρατηρείται στην NAFLD. Η NAFLD αποτελεί μία νοσολογική οντότητα που χαρακτηρίζεται από χαμηλή συχνότητα εμφάνισης σοβαρών επιπλοκών στο ήπαρ και εξέλιξης σε ίνωση, υποδεικνύοντας ότι η αύξηση του *SMAD7* μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό που συμμετέχει στον περιορισμό της ίνωσης.

Η πιθανή συμβολή του Smad7 στην εξέλιξη ή και τη λύση της φλεγμονής έχει μελετηθεί σε αρκετά ζωικά μοντέλα με αντικρουόμενα αποτελέσματα.^{377, 378, 379, 380, 381} Ωστόσο, σε περιπτώσεις φλεγμονής και ίνωσης του ήπατος, το Smad7 φαίνεται να έχει αντι-φλεγμονώδεις επιδράσεις, αφού η ιστο-ειδική εξάλειψή του σε ποντικούς οδηγεί σε αυθόρμητη ηπατική δυσλειτουργία και επιδεινώνει την ηπατική βλάβη που προκαλείται από αλκοόλη.³⁷⁹ Σε αυτό το πλαίσιο, οι Dooley και συν., έδειξαν ότι η υπερέκφραση του Smad7 (με τη βοήθεια αδενοϊού) αναστέλλει τη σηματοδότηση μέσω του TGF-β και εμποδίζει τη δημιουργία ίνωσης στο ήπαρ,³⁸² ενώ οι Tahashi και συν., διαπίστωσαν ότι το Smad7 αυξάνει στην οξεία και μειώνεται στη χρόνια πειραματικά επαγόμενη ηπατική βλάβη σε επίμους.³⁸³ Αυτή η άποψη υποστηρίζεται περαιτέρω από τα αποτελέσματα μας, αφού παρατηρήθηκε ότι προϊούσης της σοβαρότητας της φλεγμονής η έκφραση του *SMAD7* μειώνεται φτάνοντας σε επίπεδα χαμηλότερα από εκείνα των ασθενών με στάδιο φλεγμονής I-0 (δηλαδή χωρίς μακροσκοπική ένδειξη φλεγμονής).

Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι η TGF-β σηματοδότηση μέσω των ενδοκυττάρων μεσολαβητών Smad2/3 και Smad4 προκαλούν αύξηση της έκφρασης του Smad7.^{384, 385} Εν συνεχεία, το Smad7 είναι σε θέση είτε να παρεμποδίζει τη σύνδεση του υποδοχέα TGF-βRI με τα Smad2/3,³⁸⁶ είτε να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Smurf2 για να σχηματίσει μία E3 λιγάση ουβικιτίνης με αποτέλεσμα την αυξημένη αποικοδόμηση του TGF-βRI.³⁸⁷ Κατά συνέπεια, το Smad7 αποτελεί τον κυριότερο αναστολέα της TGF-β σηματοδότησης. Επιπλέον, η σηματοδότηση μέσω του TGF-β και οι ακόλουθες ινωτικές επιδράσεις του φαίνεται να μπορούν να ανασταλούν ως απάντηση σε θεραπεία με IFN-γ, δεδομένου ότι η IFN-γ και ο TNF-α μπορούν να αναστείλουν τη σηματοδότηση της οδού μέσω της επαγωγής της έκφρασης του Smad7.^{388,389}

Τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί εκτενώς ο ρόλος της TGF-β σηματοδότησης στη χρόνια ηπατική βλάβη ή και κίρρωση. Η κίρρωση του ήπατος, εκτός από σοβαρή ίνωση, χαρακτηρίζεται από αλλοιώσεις του ηπατικού παρεγχύματος που σχετίζονται με σχηματισμό οζιδίων, αγγειακές αλλαγές και κίνδυνο ηπατικής ανεπάρκειας. Αν και δεν υπάρχει αμφιβολία ότι μπορεί να επισυμβεί λύση της ηπατικής ίνωσης,³⁹⁰ εξακολουθεί να παραμένει αμφιλεγόμενη η αντιστρεψιμότητα της κίρρωσης.³⁹¹ Όπως αναφέρουν οι Dooley και συν., βασίζόμενοι σε στοιχεία που προκύπτουν κυρίως από μελέτες σε ζωικά

μοντέλα, μπορούν να εξαχθούν ορισμένα συμπεράσματα: α) το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβη των ηπατοκυττάρων και ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer και HSC με αποτέλεσμα τη δημιουργία ηπατικής ίνωσης, β) ο TGF-β είναι απαραίτητος για την επαγωγή της ίνωσης στο ήπαρ και γ) η παρεμπόδιση της σηματοδότησης μέσω του TGF-β καταστέλλει την ίνωση.³⁹² Κατά συνέπεια, τα δεδομένα μας στηρίζουν την άποψη **ότι η υπερέκφραση του Smad7 μπορεί να αποτελεί έναν επαρκή μηχανισμό για τον περιορισμό της ινωτικής επίδρασης του TGF-β.**^{382,393}

Επιπρόσθετα, παρατηρήσαμε ότι οι ασθενείς με NAFLD παρουσιάζουν σημαντική αύξηση της ηπατικής έκφρασης του *SMAD7* σε σύγκριση με τους ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα που είτε δεν έχουν λάβει θεραπεία, είτε δεν έχουν ανταποκριθεί σε αυτή. Επιπλέον, οι ασθενείς με NAFLD έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των μορίων *TGFB1*, *TGFB3*, *INHBC*, *TGFBRI/ALK5* και *SMAD4*, υποδεικνύοντας ότι η σηματοδοτική οδός TGF-β είναι ενεργοποιημένη με αποτέλεσμα την επακόλουθη επαγωγή της έκφρασης του αναστολέα *SMAD7*. Από την άλλη μεριά, οι ασθενείς με ΧΗΒ σε ύφεση, εμφανίζουν επίσης σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του *SMAD7* συγκριτικά με ασθενείς ΧΗΒ στη διάγνωση, αλλά χωρίς ταυτόχρονη ενεργοποίηση της οδού, δεδομένου ότι έχουν μειωμένα επίπεδα των *TGFB1*, *CTGF* και *SMADs*. Αυτό σημαίνει ότι η αυξημένη έκφραση του γονιδίου *SMAD7* εμμένει ακόμα και μετά τη μείωση της TGF-β σηματοδότησης που επάγεται από την επιτυχή μακροχρόνια (> 5 έτη) αντι-ϊική θεραπεία.

Μελετώντας την επίδραση της επιτυχούς αντι-ϊικής θεραπείας σε ασθενείς με ΧΗΒ, παρατηρήσαμε ότι η έκφραση των μορίων *FOXP3*, *IL10*, *TGFB1*, *PD1*, *PDL1*, *FASL* και *CD8* είναι μειωμένη στους ασθενείς σε μακροχρόνια ύφεση. Σε αντίθεση, η ηπατική έκφραση των *IL2*, *IL1B*, *TNFA* και *IFNG* δεν παρουσιάζει μεταβολές.³⁶⁸ Ως εκ τούτου, θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι οι ανοσιακές οδοί που επάγονται, όπως μέσω της IFN-γ και του TNF-α, δεν φαίνεται να συμβάλουν στην αύξηση της έκφρασης του *SMAD7* που παρατηρείται στην παρούσα μελέτη. Στο πλαίσιο αυτό, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης Smad7 διαμορφώνονται από μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς. Ειδικότερα, τα υψηλά επίπεδα του microRNA-21 (miR-21) μπορούν να οδηγήσουν στην αναστολή των αρνητικών μηχανισμών ανάδρασης της TGF-β σηματοδότησης μέσω στόχευσης και καταστολής της μετάφρασης του mRNA του *Smad7*, με αποτέλεσμα την αυξημένη ενεργοποίηση της οδού με τις επακόλουθες ινωτικές επιδράσεις.^{394,395} Ως εκ τούτου, είναι φανερό ότι θα πρέπει να διερευνηθεί η συμβολή της έκφρασης του miR-21 σε ασθενείς με ΧΗΒ/υφ σε μελλοντικές μελέτες.

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα του *CTGF* σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΧΗΒ συγκριτικά με φυσιολογικούς μάρτυρες και με ασθενείς σε ύφεση, αλλά καμία σημαντική μεταβολή σε ασθενείς με

NAFLD. Ο CTGF στο ήπαρ συντίθεται κυρίως από ηπατοκύτταρα και υπερεκφράζεται στον ινωτικό ηπατικό ιστό ενισχύοντας τη δράση του TGF-β.^{396,397} Αντίθετα, στα HSC δεν παρατηρείται αλληλεξάρτηση μεταξύ της λειτουργίας του TGF-β και της έκφρασης του CTGF.³⁹⁸ Πρόσφατα δεδομένα έχουν καταστήσει σαφή την κλινική σημασία του CTGF στη ΧΗΒ.^{399, 400} Επιπρόσθετα, μελέτες του λιπώδους ήπατος στον άνθρωπο αναφέρουν είτε απουσία αλλαγών στην έκφραση του CTGF σε περιπτώσεις απλής στεάτωσης, είτε σημαντική αύξηση σε περιπτώσεις στεατοηπατίτιδας (NASH).⁴⁰¹ Ωστόσο, πρέπει να έχουμε κατά νου ότι ο CTGF ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η αδιπονεκτίνη, ο TNF-α, η IL-6 και τα επίπεδα γλυκόζης, οι οποίοι επηρεάζονται στην NAFLD. Ως εκ τούτου, τα επίπεδα του CTGF στο ήπαρ προκύπτουν από τη συντονισμένη δράση πολλαπλών ρυθμιστικών οδών/μηχανισμών.^{396,401,402}

4.5 Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε στο πλαίσιο της έλλειψης εμπειριστατωμένων στοιχείων που αφορούν τη σχέση των χρόνιων λοιμώξεων με την πρόκληση φλεγμονής (διαφόρων οργάνων και ιστών) με τους ανοσορρυθμιστικούς μηχανισμούς. Δεδομένου του γενικότερου ενδιαφέροντος που υπάρχει παγκοσμίως σχετικά με την αποκάλυψη θεραπευτικών προσεγγίσεων με στόχο τα ρυθμιστικά κύτταρα (π.χ. μοριακή στόχευση του γονιδίου *FOXP3*) διερευνήθηκε ο ρόλος της ανοσορύθμισης στην επαγόμενη από την απόπτωση φλεγμονή. Τα δεδομένα που προκύπτουν προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες, χρήσιμες για την αποσαφήνιση των παραπάνω μηχανισμών που θα πρέπει να ληφθούν υπόψη στο σχεδιασμό θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Μελετώντας το μοντέλο χρόνιας ηπατικής φλεγμονής ιογενούς αιτιολογίας στον άνθρωπο (χρόνια ιογενής ηπατίτιδα/κίρρωση) παρατηρήσαμε κινητοποίηση των Tregs στο ήπαρ ανάλογα με το στάδιο της φλεγμονής και της έκφρασης μεσολαβητών της απόπτωσης. Τα δεδομένα αυτά θα μπορούσαν να ενταχθούν σε ένα ενιαίο μοντέλο λειτουργίας των Tregs, σχετικό με την ιστική βλάβη λόγω φλεγμονής προκαλούμενης από αυξημένη απόπτωση. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, οξεία ή χρόνια ιστική βλάβη, ανεξαρτήτως αιτιολογίας, προκαλεί αυξημένη απόπτωση των ιστών, η οποία οδηγεί σε αυξημένη φαγοκυττάρωση και αντιγονοπαρουσίαση αυτο-αντιγόνων. Συνακόλουθη συσσώρευση των Tregs μπορεί αποσκοπεί στην παρεμπόδιση πιθανής καταστροφικής αυτοανοσίας στον προσβεβλημένο ιστό από αυτοδραστικούς T-κλώνους.

Τα φαινόμενα αυτά φαίνεται να καταστέλλονται σε ασθενείς με ΧΗΒ έπειτα από επιτυχημένη αντι-ϊική θεραπευτική αγωγή και μακροχρόνια ύφεση του νοσήματος. Τα ευρήματά μας καταδεικνύουν ότι στη ΧΗΒ, το ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον του ήπατος ελαττώνεται στη διατηρούμενη (έπειτα από θεραπεία) μακροχρόνια ύφεση, σε

σύγκριση με τις περιπτώσεις που είναι ιστολογικά, βιοχημικά και ιολογικά ενεργές κατά τη διάγνωση, πριν οποιαδήποτε θεραπεία. Επιπλέον, η μείωση των ανασταλτικών οδών είναι πιθανώς συνέπεια της μείωσης της ηπατικής φλεγμονής, αφού νωρίτερα έχουν υπερεκφραστεί, προκειμένου να εξισορροπήσουν την υπερβολική παρουσία αλλο- ή και αυτο-δραστικών T-κυτταρικών κλώνων. Αν και παρατηρείται μείωση της ανοσιακής καταστολής κατά την επιτυχημένη θεραπευτική παρέμβαση, ωστόσο, δεν παρατηρούνται φαινόμενα ανοσιακής αποκατάστασης.

Μελετώντας την ορθότητα του προτεινόμενου υποθετικού μοντέλου λειτουργίας των Tregs (σχετικού με την ιστική βλάβη λόγω επαγόμενης από απόπτωση φλεγμονής) στην περίπτωση της άσηπτης φλεγμονής (μη μικροβιακής αιτιολογίας) που παρατηρείται στην οστεοαρθρίτιδα, επιβεβαιώθηκαν οι ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ των μεσολαβητών της απόπτωσης με την ανοσορρύθμιση που είχαν νωρίτερα αναδειχθεί στα χρόνια ηπατικά νοσήματα. Επιπρόσθετα, επιβεβαιώθηκε η άποψη που προσδιορίζει την οστεοαρθρίτιδα ως μια ομάδα αλληλεπικαλυπτόμενων παθήσεων, αφού παρατηρούνται διαφορές στο προφίλ της γονιδιακής έκφρασης ανάλογα με το μικροσκοπικό φαινότυπο της πάσχουσας άρθρωσης. Παράλληλα, αναδείχθηκε η συμμετοχή του *TRAIL* στη φλεγμονή του αρθρικού υμένα και η πιθανή χρήση του ως βιοδείκτη του φαινοτύπου του νοσήματος.

Τα ευρήματά μας συνηγορούν υπέρ του προστατευτικού ρόλου των Tregs σε διαφορετικούς τύπους επαγόμενης από απόπτωση φλεγμονής, ενισχύοντας την άποψη ότι η προτεινόμενη στόχευση της απόπτωσης,²⁵⁴ αντί των ρυθμιστικών κυττάρων, θα μπορούσε να αποδειχθεί μία περισσότερο υποσχόμενη θεραπευτική παρέμβαση. Τα δεδομένα που παρέχει η παρούσα μελέτη και το παθοφυσιολογικό μοντέλο που προτείνουμε υποστηρίζουν ότι τα Tregs, με την πιθανή εξαίρεση της αυτοανοσίας, αντιπροσωπεύουν έναν προστατευτικό μηχανισμό του οποίου η διαχείριση θα πρέπει να εξεταστεί προσεκτικά. Ωστόσο, απαιτούνται επιπλέον μελέτες για την αποσαφήνιση των υποκείμενων σχέσεων, με σκοπό να διευκρινιστεί εάν τα ευρήματά μας υποδηλώνουν την ύπαρξη ενός ενιαίου Treg-μεσολαβούμενου ρυθμιστικού μηχανισμού της επαγόμενης από απόπτωση φλεγμονής.

Τέλος, η υπερέκφραση του αναστολέα της σηματοδοτικής οδού TGF-β/Ακτιβινών, *SMAD7*, που παρατηρείται στις περιπτώσεις χαμηλού σταδίου ίνωσης, συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι η επαγωγή της έκφρασής του μπορεί να αποτελέσει στόχο για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις, αφού φαίνεται να είναι ένας μηχανισμός ικανός να περιορίσει την δράση του TGF-β που ευνοεί την ανάπτυξη ίνωσης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Νικολέττα Αργέντου

Ανοσορρύθμιση και επαγόμενη από απόπτωση φλεγμονή

Εργαστήριο Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας

Τμήμα Ιατρικής – Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

(Διευθυντής: Καθ. Α.Ε. Γερμενής)

Η μελέτη επιχείρησε να διερευνήσει τη συσχέτιση της ανοσορρύθμισης με παράγοντες της φλεγμονής και της απόπτωσης. Συλλέχθηκαν βιοψίες ήπατος 101 ασθενών με χρόνιες ηπατοπάθειες (ΧΗΒ προ θεραπείας, σε υποτροπή και ύφεση, ΧΗC, NAFLD και αυτοάνοσα νοσήματα), και δείγματα αρθρικού υμένα (ΑΥ) 27 ασθενών με οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) γόνατος και ισχίου. Με real-time PCR προσδιορίστηκε η mRNA έκφραση των:

-*FOXP3*, *IL10*, *TGFB* (δείκτες Tregs) και *CD4*, *CD8* (δείκτες T-κυττάρων)

-*IL1B*, *TNFA* (φλεγμονώδεις κυτταροκίνες)

-*FAS*, *FASL*, *TRAIL* (μεσολαβητές απόπτωσης)

-*PD1*, *PDL1*, *PDL2* και *IL2*, *IFNG* (δείκτες εξάντλησης και αποκατάστασης T-κυττάρων)

-*TGFB1*, *-B2*, *-B3*, *INHBA*, *INHBB*, *INHBE*, *ALK4*, *ALK5*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD7*, *CTGF* (οδός TGFB/Ακτιβινών).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνικός εντοπισμός μορίων με σημαντικές διαφορές έκφρασης με Western blot και ανοσοϊστοχημεία.

Οι ασθενείς με χρόνιες ηπατοπάθειες παρουσίασαν θεαματική αύξηση του *FOXP3* σε σχέση με τους μάρτυρες (που συσχετιζόταν με το στάδιο της φλεγμονής) με παράλληλη αύξηση των *FAS*, *FASL* και *TRAIL*. Στη μακροχρόνια ύφεση της ΧΗΒ υπήρξε μείωση των *FOXP3*, *IL10*, *TGFB1*, *PD1*, *PDL1*, *FASL* και *CD8* συγκριτικά με ασθενείς στη διάγνωση, ενώ η έκφραση των *FOXP3*, *PD1*, *PDL1* και *CD8* σχετιζόταν με το στάδιο της φλεγμονής. Η έκφραση του *FOXP3* επίσης συσχετίστηκε ισχυρά με τα *FAS*, *FASL* και *TRAIL* στους ασθενείς με ΟΑ. Επιπλέον, το *TRAIL* υπερεκφραζόταν σε ασθενείς με υπερτροφικό φαινότυπο ΟΑ. Τέλος, παρατηρήθηκε υπερέφραση του αναστολέα *SMAD7*, που συσχετίστηκε με τη φλεγμονή, με ταυτόχρονη μείωση των *TGFB1*, *SMAD2*, *SMAD3* και *CTGF* σε ασθενείς με ΧΗΒ σε ύφεση σε σχέση με ασθενείς στη διάγνωση. Οι ασθενείς με NAFLD εμφάνισαν αντίστοιχη αύξηση του *SMAD7* αλλά με αύξηση των *TGFB1*,

TGFB3, *TGFBR1*, *SMAD2* και *SMAD4* συγκριτικά με ασθενείς με ΧΗC και ΧΗΒ προ θεραπείας και σε υποτροπή.

Παρατηρήθηκε αύξηση των Tregs στις χρόνιες ηπατοπάθειες, που ακολουθεί ένα πρότυπο ανάλογα με το στάδιο της φλεγμονής και τους μεσολαβητές της απόπτωσης. Η ισχυρή συσχέτιση της απόπτωσης με το FOXP3 επιβεβαιώθηκε και στην ΟΑ. Η μείωση της ανοσοκαταστολής στη μακροχρόνια ύφεση της ΧΗΒ είναι μάλλον συνέπεια της μειωμένης ηπατικής φλεγμονής. Τα δεδομένα ενισχύουν το μοντέλο λειτουργίας των Tregs σχετικά με την ιστική βλάβη λόγω φλεγμονής προκαλούμενης από αυξημένη απόπτωση, συνηγορώντας υπέρ του προστατευτικού ρόλου τους σε τέτοιες καταστάσεις. Τέλος, η υπερέκφραση του *SMAD7* σε περιπτώσεις χαμηλού βαθμού ίνωσης φαίνεται ικανή να μειώσει την ινωτική δράση του TGFβ καθιστώντας το μόριο πιθανό θεραπευτικό στόχο.

ABSTRACT

Immune regulation and apoptosis-induced inflammation

Nikoletta Argentou

Department of Immunology - Histocompatibility

School of Medicine – University of Thessaly

(Director: Prof. A.E. Germenis)

The present study was designed to explore the relationship of immune regulation with apoptotic pathways and inflammation. Liver biopsy specimens from 101 patients with liver diseases [as CHB (before treatment, on relapse and on longterm remission), CHC, NAFLD, autoimmune diseases] and synovium specimens from 27 patients with osteoarthritis (OA) of knee and hip were evaluated. The mRNA expression levels of the following genes were assessed by Real-time PCR:

-*FOXP3*, *IL10*, *TGFB* and *CD4*, *CD8* (Tregs and T-cell markers)

-*IL1B*, *TNFA* (pro-inflammatory cytokines)

-*FAS*, *FASL*, *TRAIL* (apoptosis mediators)

-*PD1*, *PDL1*, *PDL2* and *IL2*, *IFNG* (markers of T-cell exhaustion and restoration)

-*TGF-B1,B2,B3*, *INH-B-A,B,C,E*, *ALK4*, *ALK5*, *SMAD2,3,4,7*, CTGF (TGFB/Activins pathway).

Protein expression of molecules with significant expression alterations were assessed by Western blot and immunohistochemistry.

Significant increase of *FOXP3* was observed in all hepatic disease groups compared to controls, which was positively correlated with inflammation intensity. *Fas*, *FasL*, and *TRAIL* expression was also significantly elevated. On CHB remission state the expression of *FOXP3*, *IL10*, *TGFB1*, *PD1*, *PDL1*, *FASL*, and *CD8* was reduced, while *FOXP3*, *PD1*, *PDL1*, and *CD8* transcripts were positively correlated to liver inflammatory stage. *FOXP3* expression was also strongly correlated with the expression of *FAS*, *FASL*, and *TRAIL* in OA synovium, whilst *TRAIL* was elevated in cases with hypertrophic OA. Finally, *SMAD7* was significantly elevated and *TGFB1*, *SMAD2*, *SMAD3*, and *CTGF* expression was reduced in patients with CHB on remission compared to those at diagnosis. NAFLD patients also exhibited increased *SMAD7* compared to untreated chronic viral hepatitis patients and non-responders. *SMAD7* expression was correlated with the severity of inflammation.

The observed mobilization of Tregs in the liver followed a certain pattern, depending upon the inflammatory stage and the expression of apoptosis mediators. The strong correlations between apoptosis mediators and immunoregulation were also confirmed in chronically inflamed OA synovium. The down-regulation of immunosuppressive liver environment observed in the longterm remission state suggests that the contraction of the inhibitory pathways is possibly a mere consequence of the diminution of liver inflammation. Finally, overexpression of **SMAD7** in cases of low-grade fibrosis seems to be able to suppress the TGFB fibrotic effect rendering SMAD7 as a potent therapeutic target.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Research Article

Foxp3 Expression in Liver Correlates with the Degree but Not the Cause of Inflammation

Matthaios Speletas,¹ Nikoletta Argentou,¹ Georgios Germanidis,² Themistoclis Vasiliadis,³ Konstantinos Mantzoukis,² Kalliopi Patsiaoura,⁴ Pavlos Nikolaidis,² Vaios Karanikas,¹ Konstantinos Ritis,⁵ and Anastasios E. Germanis¹

¹ Department of Immunology and Histocompatibility, Medical School, University of Thessaly, Biopolis 41110 Larissa, Greece

² First Department of Internal Medicine, AHEPA Hospital, Aristotle University of Thessaloniki, 54636 Thessaloniki, Greece

³ Gastroenterology and Hepatology Division, Hippokraton Hospital, Aristotle University of Thessaloniki, 54642 Thessaloniki, Greece

⁴ Department of Pathology, Hippokraton Hospital, 54635 Thessaloniki, Greece

⁵ First Department of Internal Medicine, Medical School, Democritus University of Thrace, 68100 Alexandroupolis, Greece

Correspondence should be addressed to Matthaios Speletas, maspel@med.uth.gr

Received 14 December 2010; Accepted 21 February 2011

Academic Editor: Giamila Fantuzzi

Copyright © 2011 Matthaios Speletas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Patients with chronic viral hepatitis display increased expression of *Foxp3* in liver, suggesting that Tregs expansion contributes to persistent infection. The purpose of this study was to elucidate whether the expression of *Foxp3* relates not to the viral infection but to the resulting liver inflammation. Liver biopsies obtained from 69 individuals (26 chronic HBV hepatitis, 14 chronic HCV hepatitis, 11 nonalcoholic fatty liver disease, 8 autoimmune diseases, 2 methotrexate-related toxicity, and 8 controls) were examined, by qRT-PCR, for the mRNA expression of *Foxp3*, *IL-10*, *TGF- β 1*, *Fas*, *FasL*, *TRAIL*, *caspase-3*, *TNF- α* , *IFN- γ* , and *IL-1 β* . Significant increase of *Foxp3* was observed in all disease groups compared to controls, which was positively correlated with the intensity of inflammation. The expression of the apoptosis mediators *Fas*, *FasL*, and *TRAIL*, but not of *IL-10* and *TGF- β 1*, was also significantly elevated. Our findings indicate that, independently of the initial inducer, liver inflammation is correlated with elevated expression of apoptosis mediators and is followed by local Treg accumulation. Further research towards the elucidation of the underlying casual relationships is required, in order to clarify whether our results signify the existence of a uniform Treg-mediated regulatory mechanism of apoptosis-induced inflammation.

1. Introduction

T regulatory cells (Tregs) are important mediators of immune suppression, and their presence prevents reactions against self by inducing regulatory signals to antigen presenting cells (APCs) and/or effector T cells [1, 2]. Their ablation increases the risk of autoimmunity [3] whilst, on the contrary, their signals could also affect nonautoreactive clones, leading to inhibition of antineoplastic, antimicrobial, antiparasitic, and antiviral immune responses [1, 4, 5]. Accumulating evidence indicates that patients with chronic viral hepatitis display increased numbers of Tregs (both natural and inducible) in peripheral blood [6–8] or liver [9–11], which in turn exert a suppressive function against specific hepatitis C virus-

(HCV-) or hepatitis B virus- (HBV-) T effector clones in vitro [6–10]. Thus, it has been suggested that the expansion of Tregs during viral hepatitis may contribute to an inadequate immune response, causing persistent viral infection. However, the precise role of Tregs in the pathogenesis of chronic hepatitis is the subject of intense debate, since it has been demonstrated that Tregs suppress the function and the expansion of virus-specific T effector cells *ex vivo*, irrespective of the patients having chronic or resolved virus infection [11, 12].

Herein, we describe an mRNA expression study in biopsy material scheduled to further elucidate the role of Tregs in the pathogenesis of liver damage in chronic viral HBV and HCV hepatitis. Bearing in mind that recent structural and

TABLE 1: Clinicopathological and serological data of the patients of the study.

	Normals	Chronic HBV hepatitis		Chronic HCV hepatitis	NAFLD ^a	Autoimmune diseases ^b	MTX-related toxicity ^c
		Diagnosis	Relapse				
No.	8	19	7	14	11	8	2
Sex (M/F) ^d	5/3	9/10	4/3	11/3	6/5	2/6	0/2
Age (years) (mean, range)	53.3 (27–67)	49.3 (24–64)	48.6 (22–65)	39.6 (27–50)	41.9 (21–66)	56.8 (37–73)	66 (60–72)
AST (U/ μ L) ^e (mean, range)	46.6 (42–56)	185 (17–1969)	76.6 (31–277)	69.5 (24–218)	34.9 (19–63)	66.5 (30–225)	32.5 (24–41)
ALT (U/ μ L) ^f (mean, range)	55 (48–70)	193 (15–1478)	102 (32–332)	91.2 (32–213)	58.8 (15–141)	65.5 (31–212)	28.5 (17–40)
Inflammation grade ^g							
I-0	8	—	—	—	3	—	—
I-1	—	4	—	2	3	—	2
I-2	—	8	6	6	5	—	—
I-3	—	5	1	6	—	3	—
I-4	—	2	—	—	—	1	—
Fibrosis ^h (mean, range)	0	3.4 (0–6)	3.4 (1–5)	2.3 (1–4)	0.5 (0–2)	2.8 (0–6)	1 (1–1)
HAI score (mean, range)		7.52 (1–15)	7.57 (5–11)	7.21 (2–12)			
Viral load (mean, range)		79.8 Meq/mL (<0.01–21)	6.39 Meq/mL (<0.01–4.5)	1.16 \times 10 ⁶ IU/mL (0.06–6.2)			

^aNAFLD: nonalcoholic fatty liver disease; ^bautoimmune diseases refers to autoimmune hepatitis (4 patients) and primary biliary cirrhosis (4 patients); ^cMTX: methotrexate; ^dM: male; F: female; ^eAST: aspartate aminotransferase; ^fALT: alanine aminotransferase; ^ginflammation grade (I-0: without inflammation, I-1: minimal, I-2: mild, I-3: moderate, and I-4: marked) and fibrosis stage were assessed as presented in Section 2.

molecular studies suggest apoptosis, rather than necrosis, being the mechanism of liver cell death in chronic viral hepatitis [13, 14], the expressions of forkhead box P3 (*Foxp3*) gene, characterizing naturally occurring CD4⁺ Tregs (nTregs) [1], as well as that of interleukin-10 (*IL-10*) and transforming growth factor- β 1 (*TGF- β 1*), characterizing Tr1 and Th3 inducible Tregs (iTregs) [15], respectively, were examined in relation to the expression of major apoptosis mediators, namely, *Fas*, Fas Ligand (*FasL*), tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (*TRAIL*). Furthermore, in order to clarify whether the expansion of Tregs is a characteristic finding of chronic viral hepatitis, we examined *Foxp3* expression in liver biopsies of patients with other hepatic diseases, including nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, and liver-toxicity induced by methotrexate. Correlations with the grade of inflammation and fibrosis were also investigated in order to identify its possible interaction with the above factors towards the progression of liver damage.

2. Material and Methods

2.1. Patients. Liver biopsy specimens obtained from 26 patients with chronic HBV hepatitis (CHB) (4 with cirrhosis) and 14 with chronic HCV hepatitis (CHC) were examined.

Amongst CHB patients, 19 were newly diagnosed and 7 were responders under treatment for 48 weeks with Peg-IFN α 2a or antivirals and relapse after treatment withdrawal for 24 weeks. No patient presented with coinfection with other hepatitis viruses (types A, D, and E) or superinfection with HIV. Results were compared with those obtained from the examination of biopsies from 11 patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Liver biopsies from 8 patients with autoimmune hepatic diseases (4 with autoimmune hepatitis and cirrhosis and 4 with primary biliary cirrhosis, PBC) and 2 patients with rheumatoid arthritis and methotrexate-(MTX-) related hepatotoxicity were also analyzed. None of the patients were receiving antiviral or immunomodulatory treatment during the last 3 months prior to liver sampling, except for the 2 patients with rheumatoid arthritis who were receiving MTX. Eight individuals submitted to liver biopsy due to a mild increase of aminotransferases but without liver necroinflammatory and architecture changes (histology negative for disease) served as controls. HBV DNA and HCV RNA quantification was performed by the use of the bDNA assay V2.0 (Bayer, Siemens) and the Cobas Amplicor system (Roche Molecular Systems), respectively. Demographic, clinicopathologic and serologic data of the 69 analyzed subjects are summarized in Table 1.

Each liver biopsy specimen was separated into two parts. One of them was immediately fixed in 10% formalin

solution for diagnostic histological examination, and the other was snap frozen and stored at -80°C until further use. Formalin-embedded sections were stained by haematoxylin-eosin and Masson's trichrome. Two independent pathologists assessed and scored each biopsy, and discrepancies were further evaluated by an expert pathologist. In patients with viral hepatitis, the histological activity index (HAI) and the staging of fibrosis (0–6) in formalin-fixed tissues were assessed according to the modified HAI scoring by Ishak et al. [16]. In patients with NAFLD, the necroinflammatory grade and the fibrosis score (0–4) were assessed according to the scoring by Brunt et al. [17]. According to the intensity of liver inflammation biopsies, patients were classified as I-0 (absent inflammation), I-1 (minimal, HAI score 1–4 and mild grade inflammation for NAFLD), I-2 (mild, HAI score 5–8 and moderate-I grade with minimal portal inflammation for NAFLD), I-3 (moderate, HAI score 9–12 and moderate-II grade with marked portal inflammation for NAFLD), and I-4 (marked, HAI score 13–18 and severe grade for NAFLD) (Table 1). For patients with autoimmune hepatitis, the inflammation grade and fibrosis stage were estimated by morphological criteria similar with CHB and CHC patients and stratified accordingly, while, for patients with MTX-related hepatotoxicity, the inflammation grade and fibrosis stage were assessed and stratified similar to the patients with NAFLD (Table 1). However, patients with PBC, two of them with stage 1 and two with stage 3, according to Ludwig et al. [18] and Scheuer [19], were not estimated in the above stratification grades, because of the distinct pathological findings of the disease.

Informed consent was obtained by all participants, and the study was approved by the Institutional Review Board.

2.2. Quantitative Real-Time Reverse-Transcriptase PCR (qRT-PCR). Total RNA was isolated from stored liver samples after homogenization, using TRI (Ambion, Austin, USA), according to manufacturer's instructions. cDNA was reversed transcribed from 1 μg of the RNA, using a random 6-mer oligonucleotide primer (50 pmol/ μL) (Roche, USA) and M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, UK), according to manufacturer's instructions.

The mRNA levels of ten genes, namely, *Foxp3*, *Fas*, *FasL*, *TRAIL*, *caspase-3*, *IL-10*, *TGF- β 1*, *TNF- α* , interferon-gamma (*IFN- γ*), and interleukin-1beta (*IL-1 β*), were determined in a qRT-PCR reaction using Platinum-SYBR-Green PCR Supermix (Invitrogen, UK), in the automated thermocycler RotorGene 6000 (Corbett Life Science, Sydney, Australia). The beta-2-microglobulin (*B2M*) gene was used as an endogenous control for sample normalization (reference gene). An 1/20 aliquot of the cDNA reaction product was used in duplicate qRT-PCR reactions, and all measurements were averaged. Primers were commercially obtained by SABiosciences (Frederick, MD, USA). Thermocycler conditions for the *Foxp3*, *TGF- β 1*, *caspase-3*, *TNF- α* , and *B2M* genes included an initial holding at 50°C for 2 min and subsequently at 95°C for 2 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 60 sec. For the *Fas*, *FasL*, *IL-10*, and *IFN- γ* genes, three-step PCR was performed with annealing at 55°C (for *Fas*, *FasL*, and *IL-10*) or 58°C

(for *IFN- γ*) for 15 sec and extension at 72°C for 30 sec (denaturation and cycles were similar as for the other genes). The efficiency of each qRT-PCR reaction ranged between 0.9 and 1.05. In order to verify the specificity of the PCR products, melting curve analysis was performed from 65°C to 95°C with $0.1^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ intervals and stepwise fluorescence acquisition. Relative quantification and calculation of the range of confidence were performed using the comparative $\Delta\Delta\text{Ct}$ method, as described in [20]. The relative expression of each gene is presented as a multiple of the respective gene expression in the sample of a normal control, who presented with the lowest levels of aminotransferases. Expression data of this patient (expression = 1, for all genes) were, therefore, excluded from the statistical analysis.

2.3. Western Blot Analysis. The FOXP3 protein expression was determined in randomly selected samples from 7 patients with hepatic diseases (3 with CHB, 2 with CHC, and 2 with NAFLD) and 2 normal controls, using an anti-FOXP3 mouse monoclonal antibody (ab22510) from Abcam (Cambridge, UK). GAPDH (rabbit polyclonal, code: 2275-PC-100; Trevigen, Gaithersburg, Md, USA) served as a loading control, using an ultraviolet detection system (WesternDot 625 Goat Anti-Rabbit Western Blot Kit; Invitrogen), according to manufacturer's recommendations.

2.4. Statistical Analysis. For basic statistical calculations, *Foxp3*, *IL-10*, *TGF- β 1*, *Fas*, *FasL*, *TRAIL*, *caspase-3*, *TNF- α* , *IFN- γ* , and *IL-1 β* expression levels were treated as continuous variables. Differences of gene expression between disease groups were analyzed by the nonparametric Mann-Whitney *U* test. The association of the above parameters with inflammation and fibrosis grade was tested with Kruskal-Wallis *H* test. Spearman's rank correlation coefficient was used to estimate the correlations of the expression among the aforementioned genes, as well as the correlations of gene expressions with aminotransferases levels or viral load. All statistical calculations were performed by the use of SPSS (version 16.0, Chicago, IL, USA). Differences were considered statistically significant when the *P* value (two sided) was $< .05$.

3. Results

3.1. Gene Expression in Relation to Liver Diseases. As shown in Table 2 and Figure 1, patients with CHB and CHC as well as those with the other hepatic diseases (NAFLD, autoimmune hepatitis, PBC, and MTX-related hepatotoxicity) presented a statistically significant increase of *Foxp3* mRNA levels compared to normal controls. In none of the patient groups, *Foxp3* expression correlated with the alanine aminotransferase (ALT) or aspartate aminotransferase (AST) levels and the viral load (serum HBV DNA or HCV RNA). The expression of FOXP3 was also confirmed by immunoblotting (Figure 1).

To ascertain whether the expression of specific apoptosis mediators was altered, the mRNA levels of *Fas*, *FasL*, *TRAIL*, *TNF- α* , and *caspase-3* were examined. A statistically significant increase of the mRNA expression of *FasL* was found in liver biopsies from all patient groups compared

TABLE 2: Relative expression of the examined genes.

Gene	Normals	Chronic HBV hepatitis		Chronic HCV hepatitis	NAFLD ^b	Autoimmune diseases ^c	MTX-related toxicity ^d
	(no. 8)	Diagnosis (no. 19)	Relapse (no. 7)	(no. 14)	(no. 11)	(no. 8)	(no. 2)
	Mean ± S.D.	Mean ± S.D. (P value ^a)	Mean ± S.D. (P value ^a)	Mean ± S.D. (P value ^a)	Mean ± S.D. (P value ^a)	Mean ± S.D. (P value ^a)	Mean ± S.D.
<i>Foxp3</i>	1.11 ± 0.71	20.3 ± 16.0 (<.001)	10.4 ± 5.47 (.001)	12.7 ± 12.3 (.001)	18.4 ± 11.9 (<.001)	16.0 ± 15.2 (.001)	28.4 ± 27.8
<i>TGF-β1</i>	1.56 ± 1.49	1.10 ± 0.84 (.710)	0.53 ± 0.31 (.053)	0.73 ± 0.58 (.065)	1.60 ± 1.01 (.620)	1.43 ± 1.04 (.834)	0.72 ± 0.17
<i>IL-10</i>	1.50 ± 1.02	0.66 ± 1.33 (.011)	0.20 ± 0.24 (.016)	0.48 ± 0.77 (.017)	0.79 ± 0.77 (.131)	0.64 ± 0.94 (.093)	0.59 ± 0.62
<i>Fas</i>	0.82 ± 0.24	2.25 ± 0.70 (<.001)	2.12 ± 0.78 (.003)	1.55 ± 1.07 (.179)	3.51 ± 1.17 (<.001)	1.56 ± 0.94 (.132)	4.14 ± 0.41
<i>FasL</i>	1.05 ± 1.47	4.20 ± 2.05 (.001)	3.05 ± 1.98 (.028)	4.20 ± 4.09 (.004)	3.94 ± 4.42 (.004)	4.33 ± 3.69 (.008)	0.49 ± 0.39
<i>TRAIL</i>	2.89 ± 2.04	7.28 ± 4.34 (.007)	11.3 ± 6.29 (.015)	8.86 ± 4.56 (.001)	15.3 ± 6.64 (<.001)	3.52 ± 2.11 (.355)	15.3 ± 12.7
<i>Caspase-3</i>	1.87 ± 1.85	1.13 ± 0.74 (.915)	0.76 ± 0.43 (.366)	1.66 ± 1.34 (.700)	1.97 ± 1.05 (.283)	3.19 ± 2.23 (.093)	2.28 ± 0.66
<i>TNF-α</i>	3.43 ± 4.70	1.77 ± 3.12 (.307)	1.54 ± 1.93 (.201)	2.73 ± 3.58 (.544)	8.17 ± 11.0 (.480)	6.63 ± 9.11 (.186)	1.21 ± 0.93
<i>IFN-γ</i>	1.92 ± 1.77	5.47 ± 5.99 (.202)	4.17 ± 2.46 (.186)	2.19 ± 1.77 (.628)	4.18 ± 4.93 (.572)	8.43 ± 7.25 (.059)	0.37 ± 0.26
<i>IL-1β</i>	1.37 ± 1.05	0.51 ± 1.39 (.022)	0.41 ± 0.66 (.055)	0.33 ± 0.26 (.042)	0.99 ± 0.95 (.322)	1.15 ± 1.12 (.571)	0.30 ± 0.23

^aStatistical significance refers to comparison with the expression levels in the normal controls (Mann-Whitney *U* test); ^bNAFLD: nonalcoholic fatty liver disease; ^cautoimmune diseases group consists of 4 patients with autoimmune hepatitis and 4 with primary biliary cirrhosis; ^dMTX: methotrexate.

to normal controls (Table 2). Furthermore, *Fas* expression was found significantly increased in patients with CHB and NAFLD, while *TRAIL* expression was significantly increased in all patients, except of those with autoimmune diseases (Table 2). Positive correlations were observed between the intrahepatic expression levels of *Foxp3* with the expression of *Fas* ($P = .014$), *FasL* ($P < .001$) and *TRAIL* ($P = .003$) (Figure 2), *Fas* and *TRAIL* ($P < .001$), and *FasL* and *IFN-γ* ($P < .001$), irrespective of the cause of liver damage (viral, NAFLD, autoimmunity, MTX).

Patients with CHB and CHC displayed an approximately 3-fold significant decrease of *IL-10* expression compared to normal controls (Table 2). *IL-10* expression levels in these groups of patients were not significantly different from those of NAFLD patients. Compared to normal controls, NAFLD patients, as well as those with autoimmune hepatic diseases and MTX-related toxicity, presented with lower *IL-10* expression levels that, however, did not reach the level of statistical significance (Table 2). Moreover, *IL-1β* transcripts were significantly decreased than those of normal controls in the groups of CHB and CHC patients at diagnosis (Table 2).

No significant difference in the expression of *TGF-β1* was observed between the various groups of patients with liver diseases and normal controls (Table 2). However, a significant positive correlation between the expression levels

of *TGF-β1* and those of *Fas*, *IL-10*, *TNF-α*, and *IL-1β* ($P < .05$, in all cases) was found.

To this point, it must be underlined that one CHB patient with very high *Foxp3* mRNA levels (25-fold higher than that of the reference sample) also displayed a high expression of *IL-10* and *TGF-β1* (approximately 6-fold and 4-fold higher than that of the reference sample, resp.). These findings were confirmed in repeated Q-RT-PCR analyses, and this patient did not differ from the other CHB patients, in any clinical or laboratory parameter.

Finally, the expression levels of all genes in the post-treatment biopsies obtained from 7 CHB patients during the relapse of the disease did not differ from their expression in CHB patients at diagnosis.

3.2. Gene Expression in Relation to the Intensity of Inflammation and Fibrosis. Taking into account that no striking differences were observed between the various groups of patients with respect to the expression of the analyzed genes, we considered all subjects of the study as a whole group, in an attempt to investigate possible relations between the expression of the genes and the intensity of inflammation.

In relation to the intensity of inflammation, *Foxp3* exhibited a statistically significant increase of expression from normal liver to severe inflammation (Figure 3). This

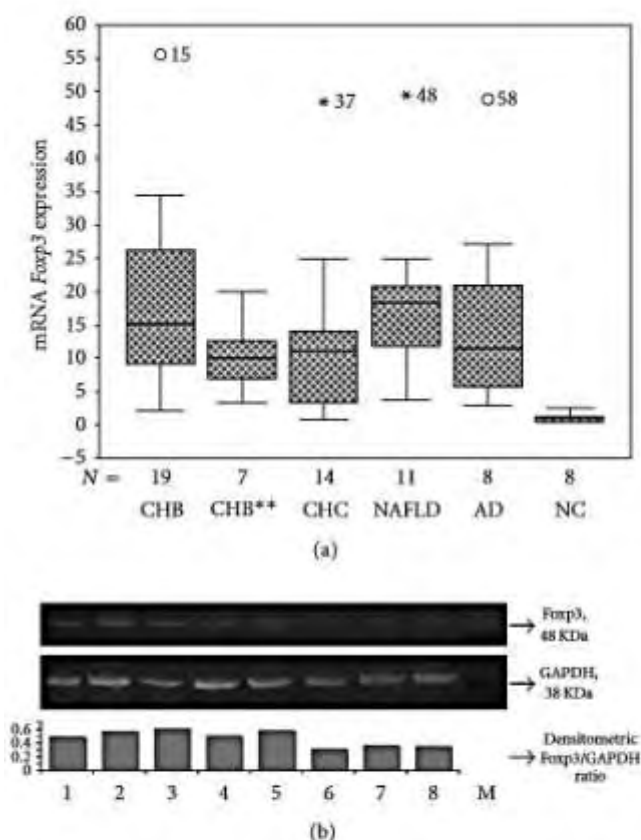


FIGURE 1: Expression of *Foxp3* in different hepatic diseases. (a) Boxplot diagram of the relative expression of *Foxp3* in the different disease subgroups (CHB: chronic HBV hepatitis, CHB**: chronic HBV hepatitis at relapse, CHC: chronic HCV hepatitis, NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease, AD: autoimmune diseases/autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis, and NC: normal controls). (b) Western blot analysis of the expression of FOXP3 and GAPDH. Lane 1: patient with CHC; Lanes 2 and 3: patients with CHB; Lane 4: patient with NAFLD; Lane 5: patient with autoimmune hepatitis; Lanes 6–8: normal controls; M: SeeBlue Plus2 Prestained Standard (Invitrogen, UK).

pattern of expression was nearly similar for *FasL* (Figure 3). On the other hand, *Fas* and *TRAIL* displayed a different pattern of expression, where, compared to I-0 subjects (without macroscopic evidence of inflammation), patients with minimal to moderate inflammation (I-1 to I-3) exhibited a statistically significant increase of expression that returned to those of I-0 subjects, as inflammation became severe (I-4) (Figure 3). *IL-10* and *TGF- β 1* expression did not display any statistically significant change in relation to the intensity of inflammation. To this end, it must be noted that no patients with NAFLD presented with moderate or severe inflammation, that is, that all patients categorized as I-3 and I-4 represent those with chronic viral hepatitis and autoimmune cirrhosis (Table 1).

Moreover, a significant positive correlation between mRNA levels of *Foxp3*, *FasL*, and *IFN- γ* with fibrosis ($P = .003$, $P = .004$, and $P = .013$, resp.) was observed. Interestingly, fibrosis staging correlated negatively with the

expression levels of *IL-10* ($P = .003$) and *caspase-3* ($P = .013$), but not with the expression of *TGF- β 1* and other apoptosis mediators ($P > .05$). Furthermore, a significant positive correlation between the expression levels of *IL-1 β* and those of *TNF- α* and *caspase-3* was also observed ($P < .001$ and $P < .001$, resp.).

Finally, as expected, HAI score was positively correlated with ALT levels ($P = .038$), in patients with CHB and CHC.

4. Discussion

Our study provides clear evidence that irrespective of the cause of liver damage, *Foxp3* expression, and not *IL-10* and *TGF- β 1*, appeared with a dramatic increase that relates to the intensity of liver inflammation. Moreover, apoptosis-induced inflammation is observed in a wide range of liver diseases.

It is well known that viruses sensitize hepatocytes to apoptosis whilst they are also capable of inhibiting it, in order to allow the survival of the infected host cells [21], as well as that increased expression of *Fas/FasL* appears in chronic viral hepatitis [22–27]. However, contradictory results exist in the literature regarding their relation with inflammation (HAI score) and ALT levels [26–28]. According to our results, a significant increase of *Fas* and *TRAIL* appears at the early stages of liver inflammation that could contribute to its induction. As the inflammation exacerbates and striking fibrosis (cirrhosis) is established, the expression of these apoptosis mediators declines. This finding can be attributed to the evolution of liver damage followed by destruction of hepatocytes and accumulation of lymphocytic infiltrate. As such, the elevated *FasL* expression, mainly expressed by CTLs, can also be explained, despite the fact that it is not followed by a parallel increase of *TRAIL* expression, as expected.

Most interestingly, however, our findings indicate that not only apoptosis is taking place in NAFLD, but also it can equally be responsible for the induction of inflammation, considered till now to be associated with lipid-related NF- κ B activation [28, 29]. Notwithstanding the limited cases examined with autoimmune hepatitis, PBC and MTX-hepatotoxicity, the same phenomenon was observed. Till now, there is only scarce evidence [30–33] that an increased expression of *Fas/FasL* accompanies NAFLD. The covariation of apoptosis mediators with inflammation that was observed in our NAFLD patients represents a line of supporting evidence to the results by Feldstein et al. [32], correlating inflammation with TUNEL-positive cells in this disease.

As mentioned above, a high intrahepatic expression of another death ligand activating the caspase cascade and apoptosis, namely, *TRAIL*, was demonstrated. Although *TRAIL* induces apoptosis mostly in transformed cells, recent in vitro studies showed that it triggers steatosis and massive apoptosis in fresh liver explants from patients with viral hepatitis or fatty liver [34–37]. The increased intrahepatic expression of *TRAIL* that we found followed the same pattern of expression of *Fas*, indicating the significant role that this molecule might play in liver inflammation, irrespective of the cause. The nature (soluble or transmembrane) and the

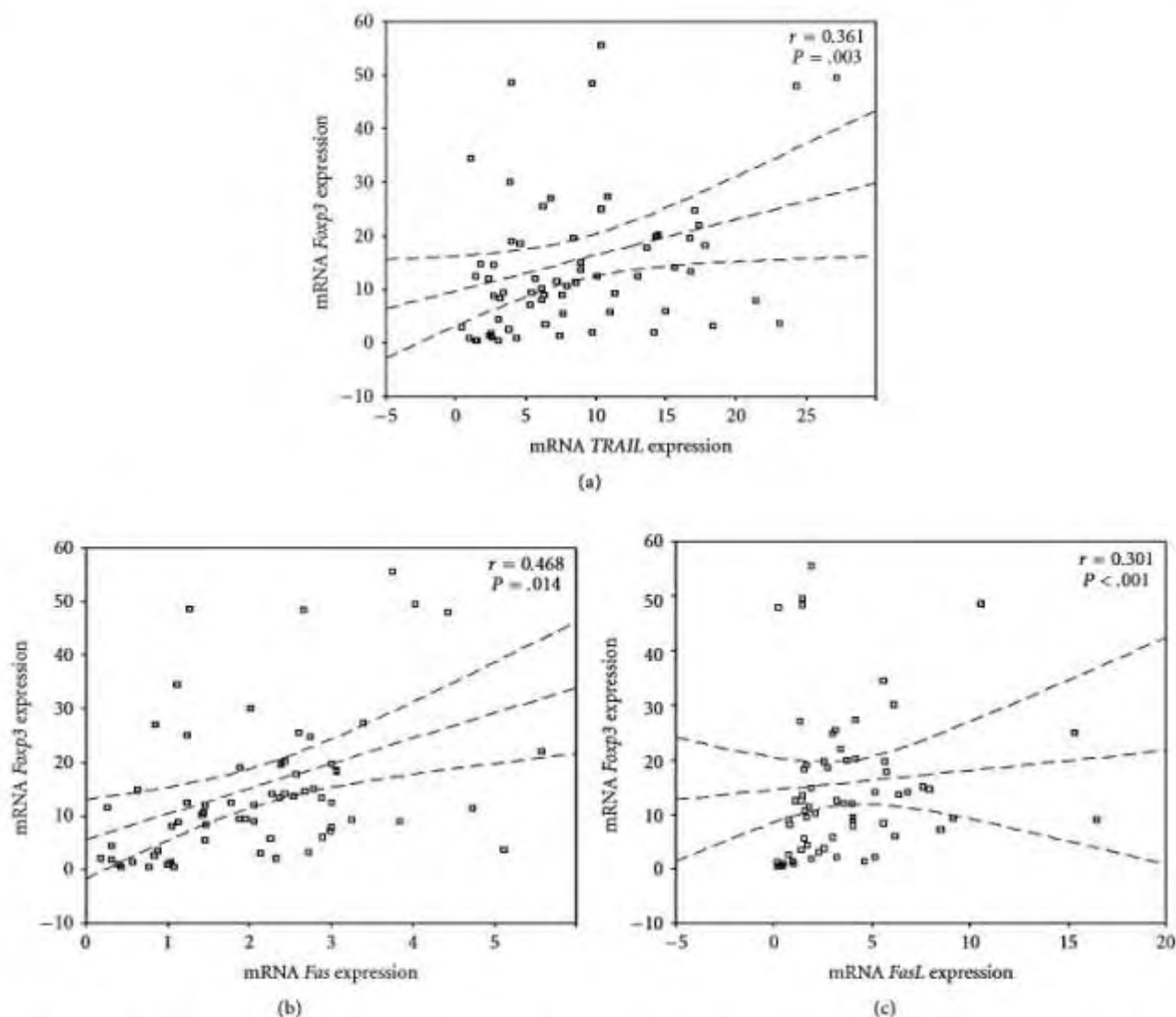


FIGURE 2: Results of the Spearman's rank correlation coefficient between *Fxp3* and *TRAIL* (a), *Fxp3* and *Fas* (b), and *Fxp3* and *FasL* (c), in all disease subgroups considered.

source (immune cells or hepatocytes) of *TRAIL* as well as the downstream molecules (receptors and mediators) activated during its signalling in hepatocytes or stellate cells remain to be determined.

We demonstrated that the intensity of chronic liver inflammation was not associated with *IL-1 β* expression, and its mRNA levels were significantly lower in patients with CHB and CHC compared to normal controls. Moreover, a strong positive correlation of the expression of proinflammatory cytokines *IL-1 β* and *TNF- α* was also observed. Interestingly, our findings are in accordance with those of Bortolami et al., whereas a lower expression of *IL-1 β* in patients with CHB and CHC compared to normal controls was also reported [38]. A plausible explanation could be the accumulation of lymphocyte infiltrate in chronic viral hepatitis, resulting in altered cellularity with a low proportion of cells producing the aforementioned cytokines. On the other hand, a low production of the above proinflammatory cytokines

in chronic viral inflammation cannot be excluded. *IL-1 β* and *TNF- α* are prototypic cytokines that exert pleiotropic effects on a variety of cells, playing a fundamental role in acute and chronic inflammatory conditions [39, 40]. Their role at the initial phases of local and systemic inflammation, triggering a complex network of signalling molecules, is indisputable and well characterized [39, 40]. Moreover, a sustained increased expression of *IL-1 β* and *TNF- α* has been reported in several cases of chronic local inflammation, as in rheumatoid arthritis and inflammatory bowel diseases, where the anticytokine therapy is very effective, reducing symptoms and slowing or arresting tissue damage [41]. However, in cases of severe systemic inflammation, a downregulation of mRNA levels of the proinflammatory cytokines *IL-1 β* and *TNF- α* , produced by liver and blood cells, has been reported [41, 42]. As a result, the anticytokine therapy for such patients is detrimental [41]. Our findings may display that a similar phenomenon is observed in

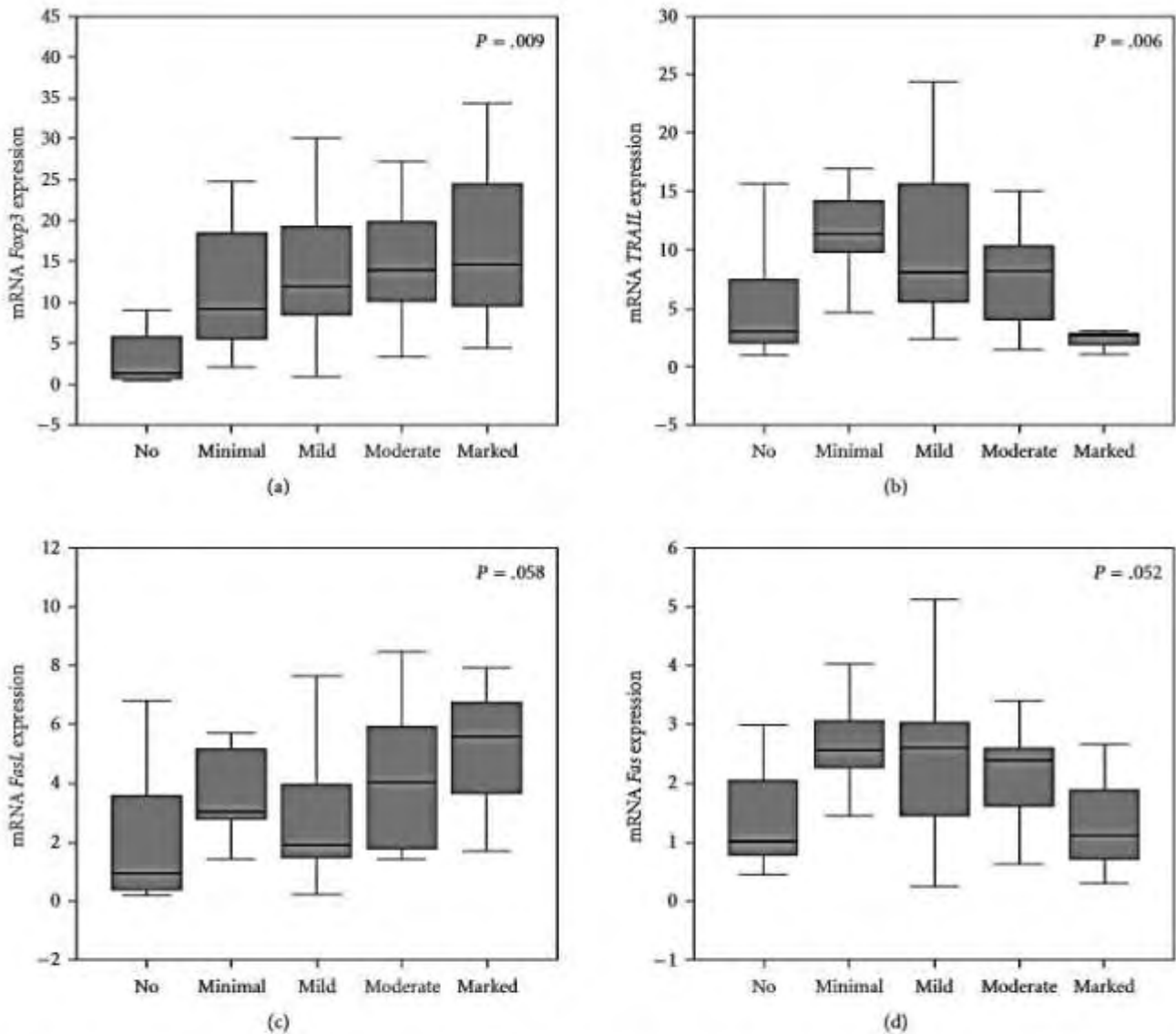


FIGURE 3: Boxplot diagrams presenting the expression of *Fcpx3* and apoptosis mediators according to the intensity of liver inflammation (classification as presented in Section 2). Abscissa corresponds to relative mRNA expression. The pattern of expression in the *Fcpx3* diagram followed also by *FasL*, but not by *Fas* and *TRAIL*. P value in each diagram refers to Kruskal-Wallis H test.

chronic liver inflammation, especially in cases of chronic viral hepatitis. Thus, considering the sustained low levels of the proinflammatory cytokines in patients with chronic viral hepatitis as well as the fact that the anticytokine therapy for rheumatoid arthritis and inflammatory bowel diseases can also result in reactivation of HBV or HCV infections [43], the contribution of an inappropriate inflammatory reaction as the causative of the chronicity of viral infections should be taken into account and remains to be determined.

Our results, regarding *Fcpx3*, *IL-10*, and *TGF- β 1* expression, imply that nTregs, and not iTregs, could contribute by processes unknown as yet to inflammatory liver disease. Most intriguing is the finding that increased *Fcpx3* expression, and therefore nTregs intrahepatic accumulation, characterizes not only viral hepatitis but also to an equal degree, NAFLD as well as autoimmune hepatitis, PBC and MTX-related

hepatotoxicity. Till now, the increased frequency of nTregs in the peripheral blood and/or their accumulation in the liver of patients with CHB or CHC has been attributed to the expansion of Tregs modulating the function of virus-specific T cells [8–11, 13]. Moreover, it has been postulated that viruses contribute to the production of virus-specific Tregs, suppressing the virus-specific T cell clones and thus allowing the persistence of viral infections [6–8, 11]. However, evidence supporting this hypothesis remains obscure. On the contrary, it has been described that in mice, the depletion of nTregs leads to immunopathology and deterioration of infectious diseases induced by various pathogens [44, 45]. Indeed, Wei et al. demonstrated that the depletion of FOXP3⁺ Tregs results in fulminant hepatitis in a mouse model of immune-mediated liver damage (induced by Concanavalin A) [46]. According to our results, persistent

liver inflammation, regardless of its cause, seems to represent a main factor that contributes to the expansion of nTregs. Should this be the case, then the described suppression of virus-specific T cells could be considered as a bystander effect of the nTregs that have been expanded due to the persistent apoptosis-induced inflammation.

Taken collectively, our results are in line with the attractive view of Zheng and Rudensky claiming that Tregs "have a vital role in preventing autoimmunity and pathology inflicted by uncontrolled immune responses to infections" [1]. As such, the evidence provided by our work can be integrated in a comprehensive protective model as detailed below. The excessive apoptosis induced by various tissue insults may overcome the capability of macrophages to safely clear the apoptotic cells. Consequently, the emergence of inflammation cannot be prevented by the secretion of anti-inflammatory cytokines from macrophages. In parallel, excessive autoantigen presentation is taking place leading to the activation of autoreactive T cells. Pre existing nTreg clones are therefore expanded, in order to prevent the self-tissue damage and to avoid catastrophic pathology.

Recent animal and human studies demonstrated that intrahepatic Tregs were increased in autoimmune liver diseases [47, 48], considering also that in AIH they were found fewer than in PBC, estimated by immunocytochemistry [47]. Despite the fact that our work provides also limited, yet consistent, data with regard to the autoimmune hepatitis/cirrhosis and PBC, it can be postulated that, in these cases, apoptosis-induced inflammation might be the result, rather than the cause, of the autoimmune damage that might have initiated due to a defective nTreg function. This being the case, the above initiates and perpetuates a vicious cycle leading to the destruction of self-tissues. In other words, our model indicates that Tregs could be the missing link to the "waste disposal" hypothesis of autoimmunity [49].

Should a similar protective role of nTregs be uncovered in other types of apoptosis-induced inflammation, then the proposed targeting of apoptosis [50], rather than of nTregs, could prove to be a more promising therapeutic modality. Our results and the pathophysiological model we propose confirm that, possibly with the exception of autoimmunity, nTregs represent a protective mechanism whose manipulation should be carefully considered. However, further research towards the elucidation of the underlying casual relationships is required, in order to clarify whether our findings signify the existence of a uniform Treg-mediated regulatory mechanism of apoptosis-induced inflammation.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the "Hellenic Society for the Study of the Liver" and the "Basic Research Scholarship Hrakleitos-II, National Strategic Reference Framework 2007–2013, Greece."

References

- [1] Y. Zheng and A. Y. Rudensky, "Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage," *Nature Immunology*, vol. 8, no. 5, pp. 457–462, 2007.
- [2] K. J. Maloy and F. Powrie, "Regulatory T cells in the control of immune pathology," *Nature Immunology*, vol. 2, no. 9, pp. 816–822, 2001.
- [3] J. M. Kim, J. P. Rasmussen, and A. Y. Rudensky, "Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice," *Nature Immunology*, vol. 8, no. 2, pp. 191–197, 2007.
- [4] S. Jiang, N. Camara, G. Lombardi, and R. I. Lechler, "Induction of allopeptide-specific human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells ex vivo," *Blood*, vol. 102, no. 6, pp. 2180–2186, 2003.
- [5] E. M. Aandahl, J. Michaëlsson, W. J. Moretto, F. M. Hecht, and D. E. Nixon, "Human CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Control T-Cell Responses to Human Immunodeficiency Virus and Cytomegalovirus Antigens," *Journal of Virology*, vol. 78, no. 5, pp. 2454–2459, 2004.
- [6] K. Sugimoto, F. Ikeda, J. Stadanlick, E. A. Nunes, H. J. Alter, and K. M. Chang, "Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection," *Hepatology*, vol. 38, no. 6, pp. 1437–1448, 2003.
- [7] R. Cabrera, Z. Tu, Y. Xu et al., "An immunomodulatory role for CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection," *Hepatology*, vol. 40, no. 5, pp. 1062–1071, 2004.
- [8] J. N. Stoop, R. G. Van Der Molen, C. C. Baan et al., "Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection," *Hepatology*, vol. 41, no. 4, pp. 771–778, 2005.
- [9] D. Xu, J. Fu, L. Jin 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," *Journal of Immunology*, vol. 177, no. 1, pp. 739–747, 2006.
- [10] S. M. Ward, B. C. Fox, P. J. Brown et al., "Quantification and localisation of FOXP3⁺ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection," *Journal of Hepatology*, vol. 47, no. 3, pp. 316–324, 2007.
- [11] O. Franzese, P. T. E. Kennedy, A. J. Gehring et al., "Modulation of the CD8⁺-T-cell response by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 6, pp. 3322–3328, 2005.
- [12] T. Manigold and V. Racanelli, "T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies," *Lancet Infectious Diseases*, vol. 7, no. 12, pp. 804–813, 2007.
- [13] J. F. R. Kerr, W. G. E. Cooksley, J. Searle et al., "The nature of piecemeal necrosis in chronic active hepatitis," *Lancet*, vol. 2, no. 8147, pp. 827–828, 1979.
- [14] C. Rust and G. J. Gores, "Apoptosis and liver disease," *American Journal of Medicine*, vol. 108, no. 7, pp. 567–574, 2000.
- [15] H. Jonuleit and E. Schmitt, "The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations," *Journal of Immunology*, vol. 171, no. 12, pp. 6323–6327, 2003.
- [16] K. Ishak, A. Baptista, L. Bianchi et al., "Histological grading and staging of chronic hepatitis," *Journal of Hepatology*, vol. 22, no. 6, pp. 696–699, 1995.
- [17] E. M. Brunt, C. G. Janney, A. M. Di Bisceglie, B. A. Neuschwander-Tetri, and B. R. Bacon, "Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions," *American Journal of Gastroenterology*, vol. 94, no. 9, pp. 2467–2474, 1999.
- [18] J. Ludwig, E. R. Dickson, and G. S.A. McDonald, "Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis)," *Virchows Archiv*, vol. 379, no. 2, pp. 103–112, 1978.

- [19] P. Scheuer, "Primary biliary cirrhosis," *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, vol. 60, no. 12, pp. 1257–1260, 1967.
- [20] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2T method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [21] J. G. Teodoro and P. E. Branton, "Regulation of apoptosis by viral gene products," *Journal of Virology*, vol. 71, no. 3, pp. 1739–1746, 1997.
- [22] P. R. Galle, W. J. Hofmann, H. Walczak et al., "Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 182, no. 5, pp. 1223–1230, 1995.
- [23] K. Mochizuki, N. Hayashi, N. Hiramatsu et al., "Fas antigen expression in liver tissues of patients with chronic hepatitis B," *Journal of Hepatology*, vol. 24, no. 1, pp. 1–7, 1996.
- [24] K. X. Luo, Y. F. Zhu, L. X. Zhang, H. T. He, X. S. Wang, and L. Zhang, "In situ investigation of Fas/FasL expression in chronic hepatitis B infection and related liver diseases," *Journal of Viral Hepatitis*, vol. 4, no. 5, pp. 303–307, 1997.
- [25] C. M. P. Rodrigues, D. Brites, F. Serejo, A. Costa, F. Ramalho, and M. Carneiro De Moura, "Apoptotic cell death does not parallel other indicators of liver damage in chronic hepatitis c patients," *Journal of Viral Hepatitis*, vol. 7, no. 3, pp. 175–183, 2000.
- [26] M. Tagashira, K. Yamamoto, K. Fujio et al., "Expression of perforin and Fas ligand mRNA in the liver of viral hepatitis," *Journal of Clinical Immunology*, vol. 20, no. 5, pp. 347–353, 2000.
- [27] J. Y. Lee, D. W. Chae, S. M. Kim et al., "Expression of FasL and perforin/granzyme B mRNA in chronic hepatitis B virus infection," *Journal of Viral Hepatitis*, vol. 11, no. 2, pp. 130–135, 2004.
- [28] P. A. Kern, M. Saghizadeh, J. M. Ong, R. J. Bosch, R. Deem, and R. B. Simso, "The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 95, no. 5, pp. 2111–2119, 1995.
- [29] I. Copaci, L. Micu, and M. Voiculescu, "The role of cytokines in non-alcoholic steatohepatitis. A systematic review," *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, vol. 15, no. 4, pp. 363–373, 2006.
- [30] Q. Chen, M. Galleano, and A. I. Cederbaum, "Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in Hep G2 cells overexpressing human cytochrome P4502E1," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 23, pp. 14532–14541, 1997.
- [31] T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Minokoshi et al., "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase," *Nature Medicine*, vol. 8, no. 11, pp. 1288–1295, 2002.
- [32] A. E. Feldstein, A. Canbay, P. Angulo et al., "Hepatocyte apoptosis and Fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis," *Gastroenterology*, vol. 125, no. 2, pp. 437–443, 2003.
- [33] Z. Li, J. A. Oben, S. Yang et al., "Norepinephrine regulates hepatic innate immune system in leptin-deficient mice with nonalcoholic steatohepatitis," *Hepatology*, vol. 40, no. 2, pp. 434–441, 2004.
- [34] A. H. Chou, H. F. Tsai, Y. Y. Wu et al., "Hepatitis C virus core protein modulates TRAIL-mediated apoptosis by enhancing bid cleavage and activation of mitochondria apoptosis signaling pathway," *Journal of Immunology*, vol. 174, no. 4, pp. 2160–2166, 2005.
- [35] B. Mundt, T. Wirth, L. Lender et al., "Tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces hepatic steatosis in viral hepatitis and after alcohol intake," *Gut*, vol. 54, no. 11, pp. 1590–1596, 2005.
- [36] H. Malhi, F. J. Barreyro, H. Isomoto, S. E. Bronk, and G. J. Gores, "Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity," *Gut*, vol. 56, no. 8, pp. 1124–1131, 2007.
- [37] X. Volkmann, U. Fischer, M. J. Bahr et al., "Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver," *Hepatology*, vol. 46, no. 5, pp. 1498–1508, 2007.
- [38] M. Bortolami, A. Kotsafti, R. Cardin, and F. Farinati, "Fas/FasL system, IL-1 β expression and apoptosis in chronic HBV and HCV liver disease," *Journal of Viral Hepatitis*, vol. 15, no. 7, pp. 515–522, 2008.
- [39] M. Kolb, P. J. Margetts, D. C. Anthony, F. Pitossi, and J. Gauldie, "Transient expression of IL-1 β induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 107, no. 12, pp. 1529–1536, 2001.
- [40] C. E. McCall and B. K. Yoza, "Gene silencing in severe systemic inflammation," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 175, no. 8, pp. 763–767, 2007.
- [41] A. P. Cope and M. Feldmann, "Emerging approaches for the therapy of autoimmune and chronic inflammatory disease," *Current Opinion in Immunology*, vol. 16, no. 6, pp. 780–786, 2004.
- [42] C. J. Wrighton, R. Hofer-Warbinek, T. Moll, R. Eytner, F. H. Bach, and R. De Martin, "Inhibition of endothelial cell activation by adenovirus-mediated expression of I κ B α , an inhibitor of the transcription factor NF- κ B," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 183, no. 3, pp. 1013–1022, 1996.
- [43] M. B. Carroll and M. I. Bond, "Use of tumor necrosis factor- α inhibitors in patients with chronic hepatitis B infection," *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, vol. 38, no. 3, pp. 208–217, 2008.
- [44] A. Aseffa, A. Gumy, P. Launois, H. R. MacDonald, J. A. Louis, and F. Tacchini-Cottier, "The early IL-4 response to Leishmania major and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells," *Journal of Immunology*, vol. 169, no. 6, pp. 3232–3241, 2002.
- [45] S. Hori, T. L. Carvalho, and J. Demengeot, "CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells suppress CD4⁺ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by Pneumocystis carinii in immunodeficient mice," *European Journal of Immunology*, vol. 32, no. 5, pp. 1282–1291, 2002.
- [46] H. X. Wei, YA. H. Chuang, B. Li et al., "CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells protect against T cell-mediated fulminant hepatitis in a TGF- β -dependent manner in mice," *Journal of Immunology*, vol. 181, no. 10, pp. 7221–7229, 2008.
- [47] M. Sakaki, K. Hiroishi, T. Baba et al., "Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune liver diseases and chronic viral hepatitis," *Hepatology Research*, vol. 38, no. 4, pp. 354–361, 2008.
- [48] C. Saeki, M. Nakano, H. Takahashi et al., "Accumulation of functional regulatory T cells in actively inflamed liver in mouse dendritic cell-based autoimmune hepatic inflammation," *Clinical Immunology*, vol. 135, no. 1, pp. 156–166, 2010.
- [49] M. J. Walport, "Complement. Second of two parts," *New England Journal of Medicine*, vol. 344, no. 15, pp. 1140–1144, 2001.
- [50] T. Kondo, T. Suda, H. Fukuyama, M. Adachi, and S. Nagata, "Essential roles in the Fas ligand in the development of hepatitis," *Nature Medicine*, vol. 3, no. 4, pp. 409–413, 1997.



Liver *FOXP3* and *PD1/PDL1* expression is down-regulated in chronic HBV hepatitis on maintained remission related to the degree of inflammation

Georgios Germanidis^{1†}, Nikoletta Argentou^{2†}, Prodromos Hytioglou³, Themistoklis Vassiliadis⁴, Kalliopi Patsiaoura⁵, Anastasios E. Germenis² and Matthaios Speletas^{2*}

¹ First Department of Internal Medicine, AHEPA Hospital, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

² Department of Immunology and Histocompatibility, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Biopolis, Larissa, Greece

³ Department of Pathology, AHEPA Hospital, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

⁴ First Propedeutic Department of Internal Medicine, AHEPA Hospital, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

⁵ Department of Pathology, Hippokraton Hospital, Thessaloniki, Greece

Edited by:

Eyad Elkord, University of Salford and University of Manchester, UK

Reviewed by:

Maria Grazia Roncarolo, San Raffaele Scientific Institute, Italy

Bing Ni, Third Military Medical University, China

*Correspondence:

Matthaios Speletas, Department of Immunology and Histocompatibility, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Biopolis, 41110 Larissa, Greece
e-mail: maspel@med.uth.gr

[†]Georgios Germanidis and Nikoletta Argentou have contributed equally to this work.

Background and Aim: T cell expression of PD1 and inhibition of T effector cells by Foxp3⁺-T regulatory cells are among the most powerful mechanisms for achieving a balanced immune response. Our aim was to investigate, how liver *FOXP3* and *PD1/PDL1* expression is regulated in chronic HBV hepatitis (CHB) on maintained long-term remission in comparison with active disease, and whether they are correlated to the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines and apoptosis mediators, along with the degree of histological inflammation and markers of T cell effector restoration.

Methods: Fifty-three HBeAg-negative CHB patients with both active (30) and completely remitted disease on long-term antiviral treatment (23) and four controls (submitted to liver biopsy due to a mild increase of aminotransferases but without liver necroinflammatory and architecture changes) were enrolled in the study. Liver mRNA levels of immunoregulatory genes (*FOXP3*, *IL10*, *TGFB1*, and those of *PD1/PDL1/PDL2* pathway), major apoptosis mediators (*FAS*, *FASL*, *TNFA*, *TRAIL*), cytokines of effector T cell restoration (*IL2*, *IFNG*), and those of *IL1B*, *CD4*, and *CD8*, were evaluated by quantitative real-time reverse-transcriptase PCR and were correlated with each other, along with the intensity of liver inflammation and fibrosis staging. The expression and localization of *FOXP3*, *PD1*, *PDL1*, *CD4*, and *CD8* were also assessed by immunohistochemistry.

Results: The expression of *FOXP3*, *IL10*, *TGFB1*, *PD1*, *PDL1*, *FASL*, and *CD8* was significantly down-regulated in the remission state. In contrast, liver expression of *IL2* and *IFNG*, along with *CD4*, *IL1B*, *TNFA*, and *FAS* did not change significantly. Moreover, *FOXP3*, *PD1*, *PDL1*, and *CD8* transcripts were positively correlated to the intensity of liver inflammation.

Conclusion: Our data indicate that in the CHB disease model, the immunosuppressive liver environment is down-regulated in the maintained on-treatment long-term remission state and correlates with the intensity of liver inflammation, but not liver T cell restoration.

Keywords: chronic HBV hepatitis, regulatory T cells, *FOXP3*, *PD1/PDL1*, *FAS/FASL*, inflammation

INTRODUCTION

The most important process for the immune control and inactivation of hepatitis B virus (HBV) infection is a robust immune response, either spontaneous or treatment induced (1, 2). However, in chronic active infection (chronic HBV hepatitis, CHB), the impaired and/or unbalanced T cell responses are unable to control viral replication but are sufficient to cause chronic liver damage. The latter is initially dependent on viral antigens expressed on hepatocytes and anti-HBV specific CD8⁺-cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses; afterward, the chronic liver damage is amplified by non-specific liver infiltrating cells and CD4⁺-T cell interaction pathways (1, 2).

Among the most powerful mechanisms for achieving a balanced immune response are the expression of programmed death 1 (PD1) molecule by T cells (3) and the inhibition of effector T cells (Teffs) by CD4⁺-T regulatory cells (Tregs) (4). Models of viral infection have indicated that the interaction between the inhibitory receptor PD1, expressed in high levels on lymphocytes, and its ligands program cell death 1 ligand (PDL)-1 and PDL2, plays a critical role in T cell exhaustion by inducing T cell inactivation (3, 5). In CHB patients, high PD1 levels are expressed by virus-specific T cells and improvement of the T cell function has been obtained *in vitro* by inhibition of the PD1/PDL1 interaction (3, 5). Particularly, the PD1/PDL1 blockade increased CD8⁺ T

cell proliferation, as well as the production of interferon-gamma (IFN- γ) and interleukin (IL)-2 production by intrahepatic lymphocytes, inducing variable levels of functional T cell restoration both in the liver and in peripheral blood, with a better functional improvement among intrahepatic T cells (5). Moreover, Tregs are important mediators of immune suppression and their presence prevents reactions against self by inducing regulatory signals to antigen presenting cells (APCs) and/or Tefs (6, 7). Their ablation increases the risk of autoimmunity (8) whilst, on the contrary, their signals could also affect non-autoreactive clones, leading to inhibition of antineoplastic, antimicrobial, antiparasitic, and antiviral immune responses (7, 9).

Previous studies have indicated that patients with chronic viral hepatitis display increased numbers of Tregs (both natural and inducible) in peripheral blood (10–12) or liver (13, 14), which, in turn, exert a suppressive function against specific HBV- or hepatitis C virus (HCV)-Tefs *in vitro* (10–14). Interestingly, Aoki et al. reported that the loss of natural Tregs (characterized by the constitutive expression of *FOXP3* gene) induces fatal autoimmune hepatitis (AIH) in neonatal thymectomized (NTx)-PD1^{-/-} mice, due to migration of dysregulated follicular T helper (Tfh) cells from the spleen (15). In this context, we have recently demonstrated that the *FOXP3* expression in liver is positively correlated with the intensity of liver inflammation along with a specific pattern of mRNA expression of the apoptosis mediators *FAS*, *FASL*, and *TRAIL*, irrespective of the cause of tissue damage (viral, toxic, autoimmunity), suggesting that might represent a bystander effect and not a causative event of chronic inflammation (16). Considering also that our findings were in line with the attractive view of Zheng and Rudensky (7) claiming that Tregs “have a vital role in preventing autoimmunity and pathology inflicted by uncontrolled immune responses to infections,” we suggested a comprehensive protective model of Tregs to prevent catastrophic pathology on apoptosis-induced inflammation (16).

The aim of this study was to explore whether the long-term antiviral treatment in patients with HBeAg-negative CHB affects the abovementioned model, investigating also another important apoptosis pathway implicated in Tefs dysfunction in liver, namely the PD1/PDL1. Thus, the expressions of *FOXP3*, characterizing mainly nTregs (7), as well as those of *IL10* (encodes IL-10) and *TGFB1* (encodes TGF- β 1), characterizing type I (Tr1) and T helper type 3 (Th3) inducible Tregs (iTregs) (17), respectively, were examined at the same time with the PD1/PDL1/PDL2 pathway, in relation to the expression of major apoptosis mediators, namely *TNFRSF6/FAS* (encodes FAS), *TNFSF6/FASL* (encodes FASL), *TNFA* (encodes TNF- α), and *TNFSF10/TRAIL* (encodes tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL). Furthermore, the expression of the inflammatory cytokine IL-1 β (encoded by *IL1B* gene) and cytokines of the immune effector T cell restoration (IL-2, encoded by *IL2* gene and IFN- γ , encoded by *IFNG* gene), together with the expression of *CD4* and *CD8* were explored. Our data provide clear evidence that in CHB HBeAg-negative disease model, the immunosuppressive liver environment is down-regulated in the maintained on-treatment long-term remission state and correlates with the intensity of liver inflammation, but not with liver T cell restoration.

MATERIALS AND METHODS

PATIENTS

Liver biopsy specimens obtained from 53 patients with CHB were examined; 30 were newly diagnosed and were evaluated before any treatment and 23 were on maintained continuous antiviral treatment response and remission for at least 240 weeks (5 years) with entecavir. Nine out of 30 newly diagnosed CHB patients were derived from a previous study of our group (16), since their genetic material was also available for the analysis of all genes included in this study. Considering that in Eastern Mediterranean area the HBV genotype D and HBeAg-negative serological form of CHB prevails (about 90% of affected Greek patients) (18), all the enrolled patients had the abovementioned HBV genotype. The treatment efficacy at year 5 included the biochemical response based on normalized ALT levels, and the complete virologic response defined as serum HBV DNA <169 copies/mL (29 IU/mL), namely the lower limit of quantification of the COBAS TaqMan assay (Roche Molecular Systems). None of the patients presented with co-infection with other hepatitis viruses (types A, C, D, and E) or with HIV, or with receiving any other immunomodulatory treatment during the last 6 months prior to liver sampling. HBV DNA quantification was performed with the bDNA assay V2.0 (Bayer, Siemens). A summary of the demographic, clinicopathologic, and serologic data of the analyzed CHB patients is presented in Table 1.

Each liver biopsy specimen was separated into two parts. One of them was immediately fixed in 10% formalin solution for diagnostic histological examination, and the other was snap frozen and stored at -80°C until further use. Formalin-embedded sections

Table 1 | Clinicopathological and serological data of the patients of the study.

	Chronic HBV hepatitis at diagnosis	Chronic HBV hepatitis on sustained remission
No	30	23
Sex (M/F) ^a	13/17	18/5
Age (median, range)	47, 21–64	52, 23–73
AST ^b (U/ μ L), (median, range)	43, 17–1969	24, 15–51
ALT ^c (U/ μ L), (median, range)	54, 15–1478	27, 15–49
Inflammation grade ^d		
I-0 ^d	0	1
I-1 ^d	8	18
I-2 ^d	14	4
I-3 ^d	6	0
I-4 ^d	2	0
Fibrosis (median, range) ^d	2.5, 0–6	2.0, 0–4
HAI score (median, range)	5.5, 1–15	2.0, 0–7
Viral load (median, range)	10 ⁵ Meq/mL (0.007–521)	0 Meq/mL (0–0.008)

^aM, male; F, female; ^bAST, aspartate aminotransferase; ^cALT, alanine aminotransferase; ^dinflammation grade (I-0: without inflammation, I-1: minimal, I-2: mild, I-3: moderate, and I-4: marked) and fibrosis stage were assessed as presented in the section of Material and Methods.

were stained by hematoxylin–eosin and Masson's trichrome. Two independent pathologists assessed and scored each biopsy and any discrepancy was further evaluated by an expert pathologist. The samples were blinded to the timing of biopsy and treatment assignment. Core length and number of portal tracts were taken into account to determine adequacy of biopsy specimens. Biopsy slides were graded and staged with the Ishak scoring system (19, 20). Furthermore, according to the intensity of liver inflammation in the biopsy specimens, the patients were classified as I-0 (no inflammation), I-1 [minimal inflammation, histological activity index (HAI) score 1–4], I-2 (mild inflammation, HAI score 5–8), I-3 (moderate inflammation, HAI score 9–12), and I-4 (marked inflammation, HAI score 13–18) and the latter classification was used in the statistical analysis (Table 1).

Informed consent was obtained by all participants and the study was approved by the Institutional Review Board. One of the challenges experienced in this study was the obtaining of informed consent from patients undergoing liver biopsy without a clear clinical need (patients on maintained remission), considering that they had complete virologic suppression at year 5 on continuous antiviral treatment.

QUANTITATIVE REAL-TIME REVERSE-TRANSCRIPTASE PCR

Total RNA was isolated from stored liver samples after homogenization, using TRI (Life Technologies, Invitrogen, Thessaloniki, Greece), according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was reversed transcribed from 1 µg of the total RNA, using a random 6-mer oligonucleotide primer (50 pmol/µL) (Roche, USA) and M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions.

The mRNA levels of 15 genes, namely *FOXP3*, *IL10*, *TGFB1*, *TNFRSF6/FAS*, *TNFRSF6/FASL*, *TNFSF10/TRAIL*, *PD1/PDCD1* (encodes PD1), *PDL1/PDCD1LG1* (encodes PDL1), *PDL2/PDCD1LG2* (encodes PDL2), *IL2*, *TNFA*, *IFNG*, *IL1B*, *CD4* (encodes CD4), and *CD8a* (encodes CD8) were determined in a Quantitative real-time reverse-transcriptase PCR (qRT-PCR) using SYBR-Green PCR Supermix (Invitrogen, UK), in the automated thermocycler RotorGene 6000 (Corbett Life Science, Sydney, Australia). The *B2M* gene was used as an internal control for sample normalization (reference gene). An 1/20 aliquot of the cDNA reaction product was used in duplicate qRT-PCR reactions and all measurements were averaged. Primers for the amplification of the genes *FOXP3*, *IL10*, *TGFB1*, *TNFRSF6/FAS*, *TNFRSF6/FASL*, *TNFSF10/TRAIL*, *IL2*, *TNFA*, *IL1B*, *PD1/PDCD1*, and *IFNG* were commercially obtained by Qiagen (Valencia, CA, USA). The primers for the amplification of *PDL1/PDCD1LG1*, *PDL2/PDCD1LG2*, *CD4*, and *CD8a* were designed with the aid of the Oligo 6.0 software (NBI, Plymouth, MN, USA) and are presented in Table 2. Thermocycling conditions of the analyzed genes are also presented in Table 2. The efficiency of each qRT-PCR reaction ranged between 0.9 and 1.05. Relative quantification and calculation of the range of confidence were performed using the comparative $\Delta\Delta^{CT}$ method, as described (21). The relative expression of each gene is presented as a multiple of the respective gene expression in a sample of a patient who underwent liver biopsy due to a mild increase of aminotransferases but without liver architecture changes (histology negative for disease; "healthy" control).

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Immunohistochemical stains for FOXP3, PD1, and PDL1 proteins, as well as CD4 and CD8 antigens, were performed on 4 µm-thick paraffin sections of 15 newly diagnosed before any treatment and 12 on maintained continuous antiviral treatment response and remission biopsy specimens. The primary monoclonal antibodies utilized for immunohistochemistry and their dilutions are shown in Table 3. All immunohistochemical stains except for PD1 were performed in an automated Bond system (Menarini), with the use of the Bond polymer refine detection kit. Stains for PD1 were performed in a DAKO autostainer, with the use of an Envision Flex Plus kit.

STATISTICAL ANALYSIS

For basic statistical calculations, all gene expression levels were treated as continuous variables. Differences of gene expression between different disease statuses were analyzed by the non-parametric Mann–Whitney *U* test. The association of the above parameters with inflammation and fibrosis staging was tested with the Kruskal–Wallis *H* test. Spearman's rank correlation coefficient was used to estimate the correlations of the expression among the aforementioned genes, as well as the correlations of gene expressions with aminotransferases levels or viral load. Mann–Whitney *U* test, Kruskal–Wallis *H* test, and Spearman's correlation analyses were appropriately performed by the using of SPSS (version 18.0, Chicago, IL, USA). Differences were considered statistically significant when the *p*-value (two sided) was <0.05.

RESULTS

GENE AND PROTEIN EXPRESSION IN RELATION TO CHB STATUS

As shown in Figure 1, patients maintained on-treatment at 5 years remission (virologic, biochemical, and histochemical) of CHB had significantly decreased mRNA levels of *FOXP3*, *IL10*, *TGFB1*, *TNFRSF6/FASL*, *PD1/PDCD1*, *PDL1/PDCD1LG1*, and *CD8a*, as well as significantly increased levels of *TNFSF10/TRAIL*, as compared to patients at diagnosis with active disease. The expression levels of *IL2* and *IFNG* were also decreased, but these alterations did not reach statistical significance (Table 4). Interestingly, the alteration of *FOXP3* expression was not accompanied by a commensurate decrease of *CD4* mRNA levels.

The correlation of the expression between the analyzed genes, the liver biochemistry [alanine aminotransferase (AST) and aspartate aminotransferase (ALT) levels], and the viral load are presented in detail in Figure 2.

The immunohistochemical staining for FOXP3, PD1, and PDL1 showed small numbers of positive lymphocytes in untreated livers, while positive cells practically disappeared following treatment (Figure 3). Moreover, CD4⁺-lymphocytes were mostly located in portal tracts, while CD8⁺-lymphocytes were found in portal tracts, limiting plates, and lobules, in an extent commensurate with their nature as effectors of necroinflammatory activity (Figure 3).

GENE EXPRESSION IN RELATION TO THE INTENSITY OF INFLAMMATION AND THE DEGREE OF FIBROSIS

In relation to the intensity of inflammation, *FOXP3*, *PD1/PDCD1*, *PDL1/PDCD1LG1*, and *CD8a* exhibited a statistically significant

Table 2 | Primers and PCR conditions for the amplification of the analyzed genes.

Gene	Primers	Sequence	PCR conditions
<i>FOXP3</i>	Forward Reverse	Commercially obtained by Qiagen, Cat No PPH00029B	95°C for 10 min, followed by 40 cycles (95°C for 15 s, 60°C for 15 s, 72°C for 15 s)
<i>IL10</i>	Forward Reverse	Commercially obtained by Qiagen, Cat No PPH00572B	95°C for 10 min, followed by 40 cycles (95°C for 15 s, 58°C for 60 s)
<i>TGFB1</i>	Forward Reverse	Commercially obtained by Qiagen, Cat No PPH00508A	95°C for 10 min, followed by 40 cycles (95°C for 15 s, 60°C for 60 s)
<i>FAS</i>	Forward Reverse	Commercially obtained by Qiagen, Cat No PPH00141B	95°C for 2 min, followed by 40 cycles (95°C for 10 s, 55°C for 10 s, 72°C for 20 s)
<i>FASL</i>	Forward Reverse	Commercially obtained by Qiagen, Cat No PPH00142B	95°C for 2 min, followed by 40 cycles (95°C for 10 s, 55°C for 10 s, 72°C for 30 s)
<i>TRAIL</i>	Forward Reverse	Commercially obtained by Qiagen, Cat No PPH00242E	95°C for 2 min, followed by 40 cycles (95°C for 10 s, 55°C for 10 s, 72°C for 20 s)
<i>PD1</i>	Forward Reverse	Commercially obtained by Qiagen, Cat No PPH13086E	95°C for 10 min, followed by 40 cycles (95°C for 15 s, 60°C for 60 s)
<i>PDL1</i>	Forward Reverse	GGTGGTGCCGACTACAA TAGCCCTCAGCCTGACAT	95°C for 2 min, followed by 40 cycles (95°C for 10 s, 58°C for 10 s, 72°C for 20 s)
<i>PDL2</i>	Forward Reverse	CTGTGGCAAGTCCTCATA TAAAGCTGCTATCTGGTGA	95°C for 2 min, followed by 40 cycles (95°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s)
<i>IL2</i>	Forward Reverse	Commercially obtained by Qiagen, Cat No PPH00172B	95°C for 10 min, followed by 40 cycles (95°C for 15 s, 60°C for 60 s)
<i>TNFA</i>	Forward Reverse	Commercially obtained by Qiagen, Cat No PPH00341E	95°C for 10 min, followed by 40 cycles (95°C for 15 s, 60°C for 60 s)
<i>IFNG</i>	Forward Reverse	Commercially obtained by Qiagen, Cat No PPH00380B	95°C for 10 min, followed by 40 cycles (95°C for 10 s, 58°C for 10 s, 72°C for 30 s)
<i>CD4</i>	Forward Reverse	CATCAAGGTTCTGCCACAT TTCTAAACCGGTGAGGACAC	95°C for 2 min, followed by 40 cycles (95°C for 10 s, 58°C for 10 s, 72°C for 20 s)
<i>CD8a</i>	Forward Reverse	GCTGGACTTCGCCTGTGATA TGTCTCCCGATTGACCAC	95°C for 2 min, followed by 40 cycles (95°C for 10 s, 55°C for 10 s, 72°C for 60 s)
<i>B2M</i>	Forward Reverse	Commercially obtained by Qiagen, Cat No PPH01094E	95°C for 10 min, followed by 40 cycles (95°C for 15 s, 60°C for 60 s)

Table 3 | Antibodies and dilutions used in the present immunohistochemical study.

Antigen	Antibody (clone)	Dilution	Manufacturer
FOXP3	ab22510	1:50	Abcam (Cambridge, UK)
PD1	ab52587	1:25	Abcam (Cambridge, UK)
PDL1 (CD274)	29E.2A3	1:30	Biologend (Athens, Greece)
CD4	NCLL-CD4-1F6	1:20	Novocastra (Athens, Greece)
CD8	C8/144B	1:50	DAKO (Athens, Greece)

increase of expression from minimal to marked inflammation (Figure 4). This pattern of expression was nearly similar for *TNFSF6/FASL*, although not reaching statistical significance ($p=0.128$). On the other hand, *TNFSF10/TRAIL* displayed an

opposite pattern of expression, decreasing from minimal to severe inflammation (Figure 4). The expression of the other analyzed genes was not affected by inflammation intensity ($p > 0.05$, in all cases).

The severity of fibrosis was significantly associated only with the expression of *PDL1/PDCDL1*. A similar pattern was observed for *FOXP3* and *PD1/PDCDI*, and an opposite one for *TNFSF10/TRAIL*, although not reaching statistical significance ($p=0.105$, $p=0.080$, $p=0.060$, respectively). The expression of the other analyzed genes was not affected by the severity of fibrosis ($p > 0.05$, in all cases).

Finally, as expected, HAI score was positively correlated with the fibrosis stage ($p < 0.001$, $r=0.665$), while the viral load was also positively correlated with both HAI score and fibrosis stage ($p < 0.001$, $r=0.724$, and $p=0.003$, $r=0.403$, respectively).

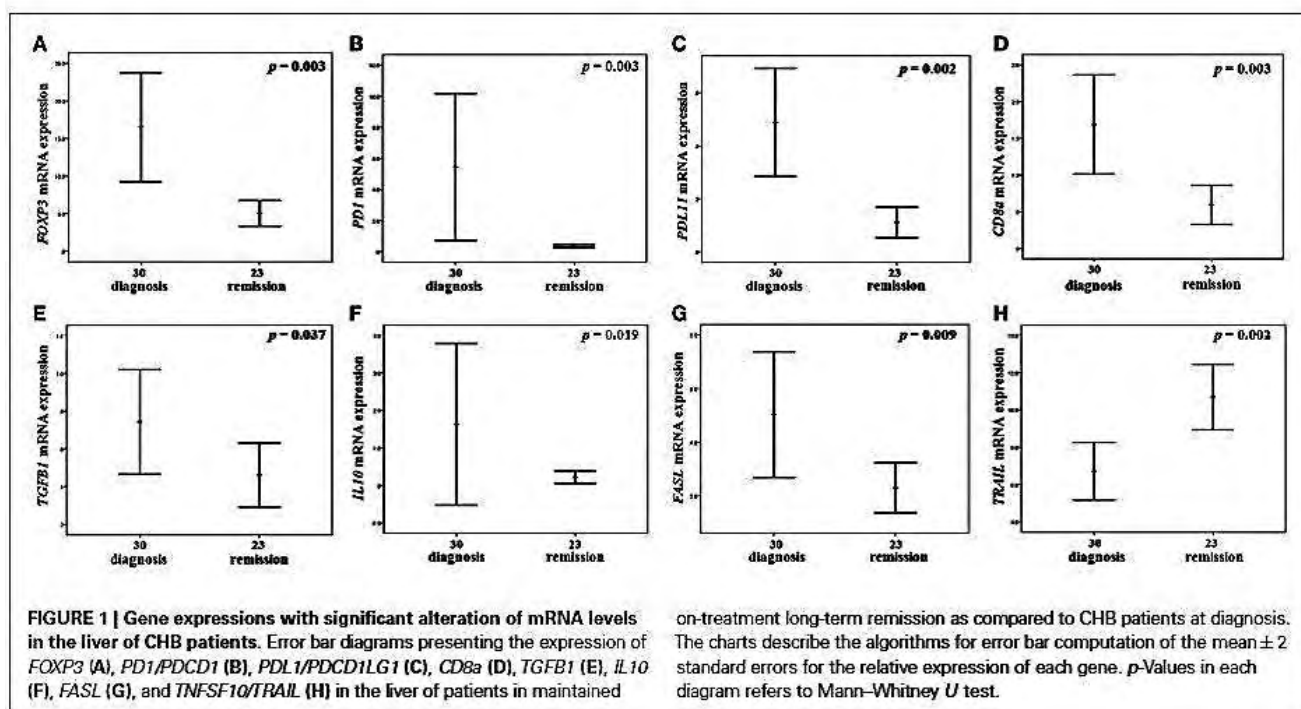


FIGURE 1 | Gene expressions with significant alteration of mRNA levels in the liver of CHB patients. Error bar diagrams presenting the expression of *FOXP3* (A), *PDI/PDCD1* (B), *PDL1/PDCD1LG1* (C), *CD8a* (D), *TGFBI* (E), *IL10* (F), *FASL* (G), and *TNFSF10/TRAIL* (H) in the liver of patients in maintained

on-treatment long-term remission as compared to CHB patients at diagnosis. The charts describe the algorithms for error bar computation of the mean \pm 2 standard errors for the relative expression of each gene. *p*-Values in each diagram refers to Mann–Whitney *U* test.

Table 4 | Relative expression of the examined genes with no statistical significance between patients at diagnosis (*n* 30) and at remission (*n* 23) of the disease.

No	Gene	CHB – diagnosis (mean \pm SDEV)	CHB – remission (mean \pm SDEV)	<i>p</i> -Value*
1	<i>TNFRSF6/FAS</i>	1.8 \pm 0.9	1.8 \pm 0.9	0.747
2	<i>PDL2/PDCD1LG2</i>	0.3 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	0.394
3	<i>IL2</i>	63.5 \pm 226.9	70 \pm 6.2	0.647
4	<i>TNFA</i>	35.9 \pm 100.1	22.7 \pm 36.7	0.342
5	<i>IFNG</i>	11.0 \pm 22.8	4.0 \pm 4.8	0.083
6	<i>IL1B</i>	0.6 \pm 1.4	0.1 \pm 0.1	0.083
7	<i>CD4</i>	0.7 \pm 1.1	0.5 \pm 0.5	0.628

CHB, chronic HBV hepatitis; SDEV, standard deviation.

**p*-Values refer to Mann–Whitney *U* test.

DISCUSSION

Our study provides clear evidence that in the CHB HBeAg-negative disease model, the expression of *FOXP3*, characterizing mainly nTregs, as well as those of *IL10* and *TGFBI*, characterizing Tr1 and Th3 iTregs (6), are down-regulated in the liver in the maintained on-treatment long-term remission state, as compared with cases histologically, biochemically, and virologically active at diagnosis, before any treatment. In addition, mRNA levels of liver *FASL* and *PDI* (mainly expressed by CTLs, characterized also by the expression of *CD8*), and *PDL1* (mainly attributed to infected hepatocytes and infiltrating lymphocytes) are concomitantly down-regulated in the maintained long-term remission state. However, the down-regulation of *CD8*, with no up-regulation of IL-2 (encoded by *IL2*) and IFN- γ (encoded by *IFNG*), is not in favor of

restoration of T cell immune-responsiveness, but rather indicates reduction of CTLs and hepatocyte cytolysis when liver inflammation subsides on long-term antiviral treatment. These findings are also supported by our immunohistochemical findings (Figure 3). As mentioned above, the decrease of *FOXP3* expression was not followed by a commensurate decrease of *CD4* mRNA levels in human liver tissues. Obviously, this may reflect that not only Tregs are CD4⁺ but also other T cell subtypes, such as Th17 cells (6). However, a more specific analysis of T cell subpopulations by FCM was not available in our human liver tissues, and this is one of the limitations of our study. Consequently, the alterations of the frequency of CD4⁺-T cells identified in our study could not confidently be attributed to a specific T cell subpopulation.

Our data further support the notion that the *PDI/PDL1* pathway (elevated levels of *PDI* on T cells and increased expression of *PDL1* on hepatocytes) is associated with T cell dysfunction in chronic HBV and HCV infections (3). In this context, it has been suggested that the disruption of this pathway is a logical therapeutic strategy to rescue the dysfunctional T cells, aiming to restore HBV/HCV-specific T cell responses. Fiscaro et al. (5) have also reported in short term experimental *ex vivo* CHB models that the functional recovery of HBV-specific T cells following *PDI/PDL1* blockade was more pronounced for liver-resident T cells rather than peripheral T cells, and was characterized by CD8⁺ cell proliferation and the production of IFN- γ and IL-2 by intrahepatic lymphocytes. However, it is still uncertain whether the expression of *PDL1* on hepatocytes truly contributes to the development of T cell exhaustion or if it is a homeostatic mechanism that dampens the inflammatory reaction (3). Kassel et al. reported that the hepatic expression of *PDI/PDL1* molecules links more directly with the degree of inflammation than with the underlying

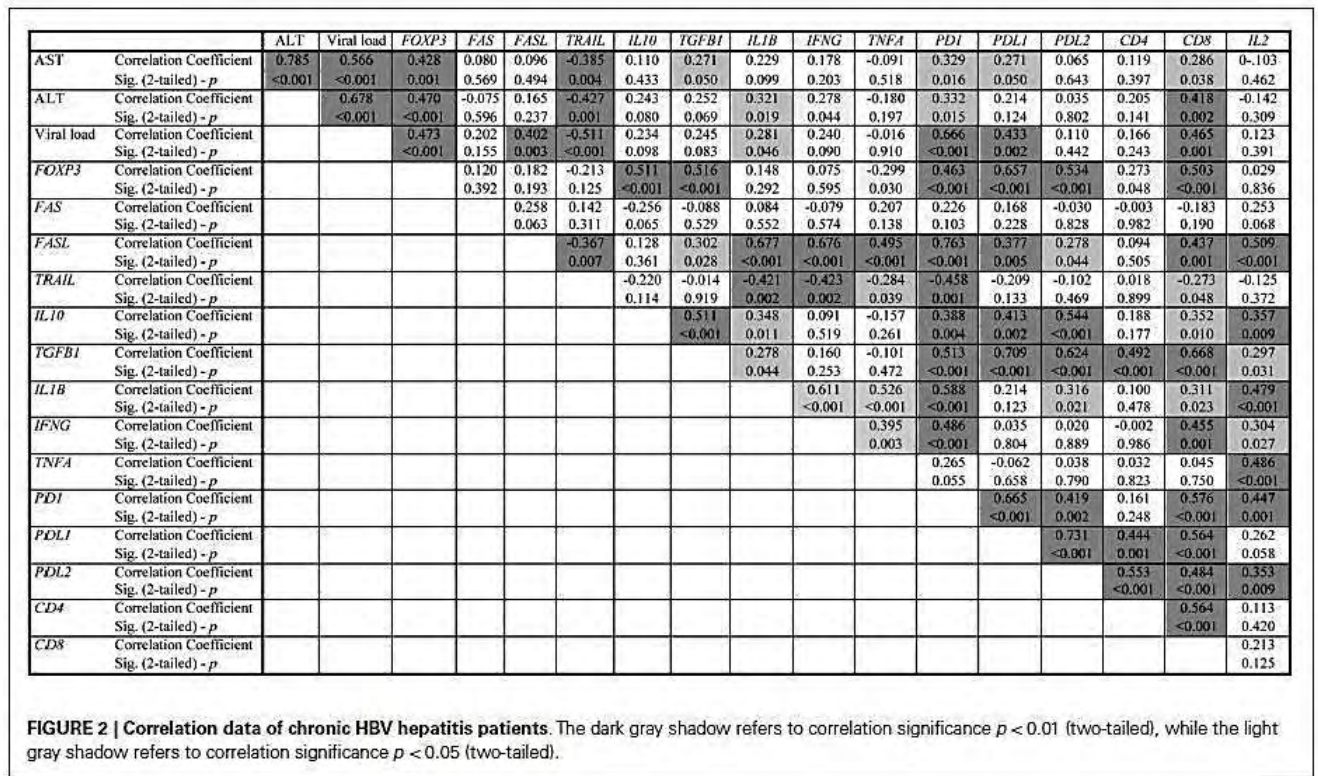


FIGURE 2 | Correlation data of chronic HBV hepatitis patients. The dark gray shadow refers to correlation significance $p < 0.01$ (two-tailed), while the light gray shadow refers to correlation significance $p < 0.05$ (two-tailed).

etiology of liver damage, concluding that the PD1 pathway may assist the liver in protecting itself from immune-mediated destruction (22). Accordingly, our findings did not support an antiviral Tregs function restoration in long-term maintained remission of chronic HBV infection, since no significant differences of the expression of CD4, IL2, and IFNG were observed. Interestingly, the abovementioned findings, considering Tregs function at remission, are in line with the findings of Nan et al. suggesting that the impaired immune responses of CHB patients are not fully restored by therapy, since no significant differences in the expression of IFN-gamma were found (23). On the other hand, the expressions of PD1 and PDL1 were significantly associated with the intensity of histological liver inflammation. Thus, we further support the conclusions of Kassel et al. suggesting that the down-regulation of PD1 and PDL1 molecules on maintained remission represents an epiphenomenon, contributing to, or resulting from, the resolution of an active liver inflammation.

Furthermore, we observed a down-regulation of the apoptosis mediators FAS and FASL in the maintained long-term remission state in CHB patients. Considering that previous studies, including ours, have demonstrated that the contribution of Fas/FasL pathway in CHB is of utmost importance, closely related to the degree of liver inflammation (16, 24), our findings further confirm the notion that it represents the most common and efficient pathway to kill virally infected cells in liver (25). On the other hand, we unexpectedly observed an inverse correlation of TRAIL expression with the intensity of liver inflammation and the disease stage (active vs. remission), since patients on maintained remission displayed an up-regulation of its mRNA levels in liver. TRAIL

is a newly characterized TNF family member, triggering apoptosis in various tumor and virus-infected cells, by binding to certain death receptors, namely DR4 and DR5 (26–28). However, TRAIL can also bind to the decoy receptors DcR1, neutralizing its downstream effect, and DcR2 causing activation of NFkappaB, leading to transcription of genes known to antagonize the death-signaling pathway and/or to promote inflammation (29, 30). As a result, the increased levels of TRAIL are capable of not only inducing apoptosis but also reducing inflammation, as it has already been shown in a rabbit knee model of inflammatory arthritis (31). Considering that we have not investigated the activation cascades of TRAIL in our disease model, further studies are required in order to shed light on the precise role this protein plays in the pathogenesis and/or restoration of liver inflammation.

Likewise, we observed a significant reduction of mRNA levels of genes, which are indicative of T cell mediated immunosuppression, namely FOXP3, IL10, and TGFB1. Moreover, the expression pattern of FOXP3 was identical with those observed by PD1 and PDL1 genes, characterized by a significant positive correlation with the intensity of liver inflammation (Figure 4). Although, Foxp3⁺ Tregs seemed to protect the liver from immune damage and compromise virus control during acute experimental HBV infection (5, 32), their role in chronic viral infections, both HBV and HCV, has been shown to range from suppressing T cell responses directed against viruses to down-regulating the immune responses causing the liver damage (5). Thus, the initial expansion stage of the adaptive immune response against viruses is followed by a contraction stage, during which Tregs might play a prominent role in maintaining a delicate balance between a robust immune response

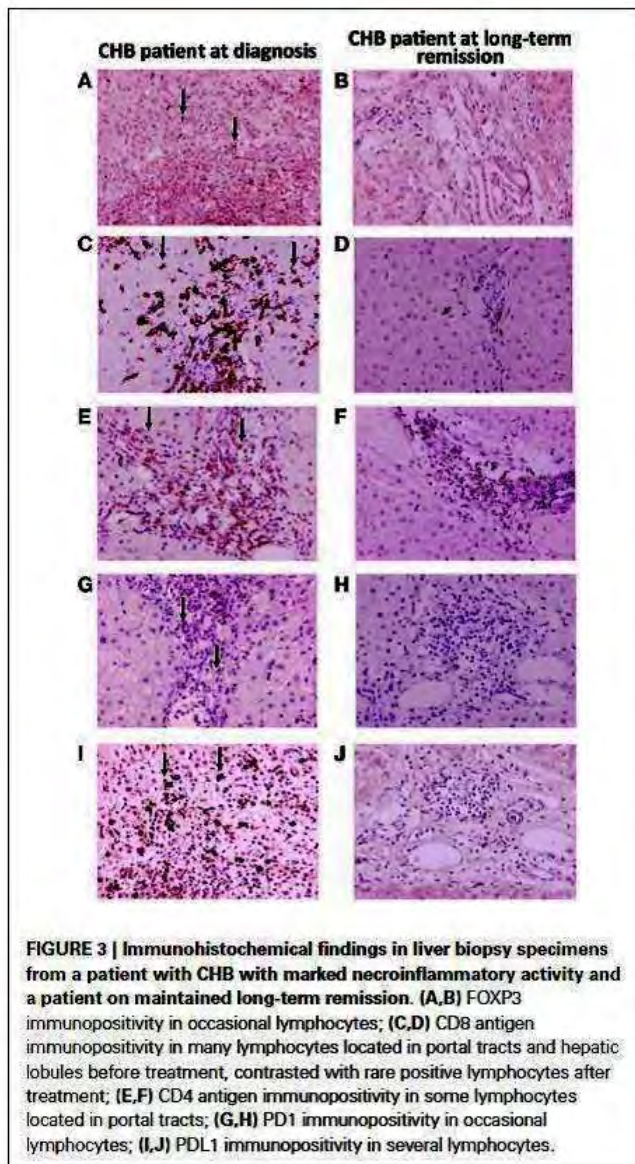


FIGURE 3 | Immunohistochemical findings in liver biopsy specimens from a patient with CHB with marked necroinflammatory activity and a patient on maintained long-term remission. (A,B) FOXP3 immunopositivity in occasional lymphocytes; **(C,D)** CD8 antigen immunopositivity in many lymphocytes located in portal tracts and hepatic lobules before treatment, contrasted with rare positive lymphocytes after treatment; **(E,F)** CD4 antigen immunopositivity in some lymphocytes located in portal tracts; **(G,H)** PD1 immunopositivity in occasional lymphocytes; **(I,J)** PDL1 immunopositivity in several lymphocytes.

to clear the infection and the immunopathological consequences of sustained immune activation and inflammation (5).

Furthermore, recent data suggest that $CD4^+CD25^+$ -Tregs play an active role in CHB not only in modulating effectors of immune response to HBV, but also in influencing the disease prognosis. Several groups have reported that the frequency of $Foxp3^+$ -Tregs in liver is significantly increased in patients with severe CHB compared to healthy controls (1, 5, 10–14, 33, 34), while their frequency in peripheral blood is significantly correlated with serum viral load (13, 33). Interestingly, in such patients the depletion of circulating Tregs led to an increase of $IFN-\gamma$ production by HBV-Ag-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC). In addition, $CD4^+CD25^+$ -Tregs were capable of suppressing the proliferation of autologous PBMC mediated by HBV antigens, probably reflecting the generation of HBV-Ag-specific tissue and circulating Tregs (13). In this context, Stross et al. have recently

demonstrated that Tregs significantly delayed the clearance of HBV from blood and infected hepatocytes in a mouse model of acute HBV infection, by down-regulating antiviral activity of Teffs through limiting cytokine production and cytotoxicity (32).

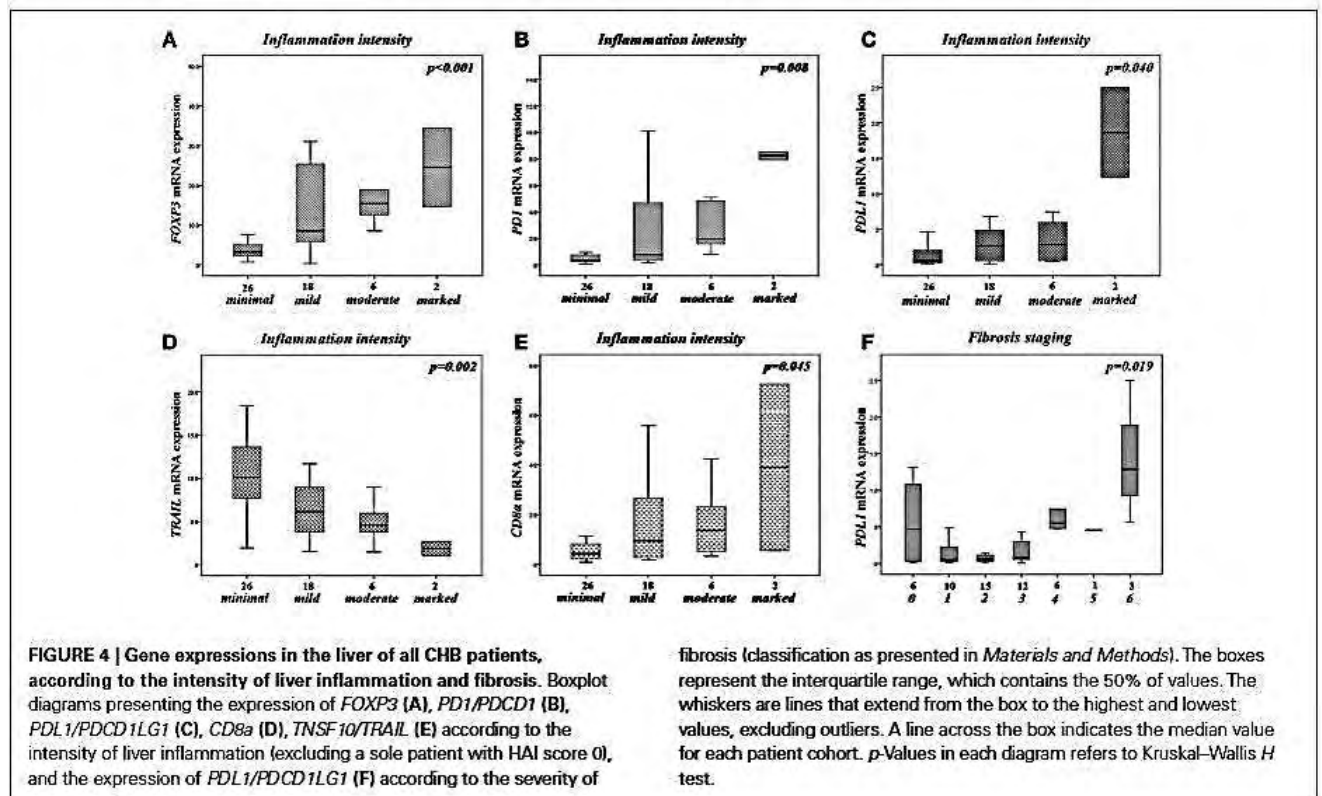
However, we recently observed that accumulation of $Foxp3^+$ -Tregs takes place in patients with chronic liver inflammation independently of the initial inducer of liver injury (toxic, autoimmunity, and viral, including HBV infection), and it is correlated with elevated expression of apoptosis mediators FAS, FASL, and TRAIL (16). As a result, we have suggested a protective role of Tregs expansion in chronic liver inflammation, in order to prevent self-tissue damage and to avoid catastrophic pathology (16). Should this be the case, the described suppression of virus-specific T cells could be considered as a bystander effect of the nTregs that have been expanded due to the persistent apoptosis-induced inflammation. In favor to our hypothesis, Peiseler et al. have recently reported the presence of normal frequencies and function of Tregs in patients with type 1 AIH; indeed, they found higher Treg frequencies in blood and liver tissue during active disease, correlated with the inflammatory activity of the liver, compared with remission (35). Moreover, Otano et al. have recently demonstrated an increase of hepatic Tregs accompanied by a significantly high expression of anti-inflammatory cytokines, such as $TGF-\beta 1$ and IL-10, and immunosuppressive molecules, such as PD1/PDL1, in WHV-chronically infected woodchucks (36). Thus, similarly to chronic HBV infection, persistent WHV infection is associated with a strong immunosuppressive environment within the liver. We consider that the results presented herein, including the study of PD1/PDL1 pathway, although correlative rather than conclusive, further support the abovementioned proposed model.

As mentioned above, our CHB HBeAg-negative patients on maintained on-treatment long-term remission displayed a down-regulation of the hepatic expression of *FOXP3*, *PD1*, and *PDL1* that was also correlated with a minimal intensity of liver inflammation. However, these patients did not exhibit immune restoration phenomena, as they are evident in the *ex vivo* human HBV infection (5, 37) and the animal models of acute (32) and chronic liver viral infections (36). Therefore, the targeting of Tregs and/or PD1/PDL1 pathway in the acute, or the early chronic HBV infection setting, should be carefully considered as a therapeutic strategy, since their depletion may trigger autoimmune phenomena or increase immune-mediated liver damage.

In conclusion, our data indicate that in the CHB HBeAg-negative disease model, the immunosuppressive liver environment is down-regulated in the maintained on-treatment long-term remission state, as compared with cases histologically, biochemically, and virologically active at diagnosis, before any treatment. In addition, the contraction of the inhibitory pathways, as measured by the down-regulation of their liver mRNA expression in long-term remission, is possibly a mere consequence of the diminution of liver inflammation, after being hyper-expressed, in order to counterbalance excessive allo- and/or auto-reactive Teffs clones.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr K. Mantzoukis, Dr S. Metallidis, and Dr. S. Anastasiadis, for collecting patients' samples. This study has been co-financed by the European Union



(European Social Fund–ESF) and Greek national funds through the Operational Program “Education and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework (NSRF)–Research

Funding Program: “Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund,” and was also granted by the Research Committee of Aristotle University of Thessaloniki.

REFERENCES

- Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut* (2012) 61:1754–64. doi:10.1136/gutjnl-2011-301073
- Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest* (1997) 99:1472–7. doi:10.1172/JCI119308
- Watanabe T, Bertoletti A, Tanoto TA. PD-1/PD-L1 pathway and T-cell exhaustion in chronic hepatitis virus infection. *J Viral Hepat* (2010) 17:453–8. doi:10.1111/j.1365-2893.2010.01313.x
- Alatrakchi N, Koziel M. Regulatory T cells and viral liver disease. *J Viral Hepat* (2009) 16:223–9. doi:10.1111/j.1365-2893.2009.01081.x
- Fisicaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Biasini E, Sacchelli L, et al. Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* (2010) 138:682–93. doi:10.1053/j.gastro.2009.09.052
- Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* (2010) 140:845–58. doi:10.1016/j.cell.2010.02.021
- Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* (2007) 8:457–62. doi:10.1038/nri1455
- Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* (2007) 8:191–7. doi:10.1038/nri1428
- Lund JM, Hsing L, Pham TT, Rudensky AY. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science* (2008) 320:1220–4. doi:10.1126/science.1155209
- Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJ, Kuipers EJ, Kusters JG, et al. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* (2005) 41:771–8. doi:10.1002/hep.20649
- Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, Gotto J, Williams R, Mainim MK, et al. Modulation of the CD8+ T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* (2005) 79:3322–8. doi:10.1128/JVI.79.6.3322-3328.2005
- Manigold T, Racaneli V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis* (2007) 7:804–13.
- Xu D, Fu J, Jin L, Zhang H, Zhou C, Zou Z, 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) 177:739–47.
- Zhang M, Zhou J, Zhao T, Huang G, Tan Y, Tan S, et al. Dissection of a circulating and intrahepatic CD4(+)Foxp3(+) T-cell subpopulation in chronic hepatitis B virus (HBV) infection: a highly informative strategy for distinguishing chronic HBV infection states. *J Infect Dis* (2012) 205:1111–20. doi:10.1093/infdis/jis011
- Aoki N, Kido M, Iwamoto S, Nishiura H, Maruoka R, Tanaka J, et al. Dysregulated generation of follicular helper T cells in the spleen triggers fatal autoimmune hepatitis in mice. *Gastroenterology* (2011) 140:1322–33. doi:10.1053/j.gastro.2011.01.002
- Speletas M, Argentou N, Germanidis G, Vassiliadis T, Mantzoukis K, Patsiaoura K, et al. Foxp3 expression in liver correlates with the degree but not the cause of inflammation. *Mediators Inflamm* (2011) 2011:827565. doi:10.1155/2011/827565
- Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* (2004) 171:6322–7.
- Ribeiro RM, Germanidis G, Powers KA, Pellegrini B, Nikolaidis P, Perelson AS, et al. Hepatitis B virus kinetics under antiviral therapy sheds light on differences in hepatitis B e antigen positive and negative infections. *J Infect Dis* (2010) 202:1309–18. doi:10.1086/656528

19. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* (1981) 1:431–5. doi:10.1002/hep.1840010511
20. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, DeGroote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* (1995) 22:696–9. doi:10.1016/0168-8278(95)80226-6
21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-T} method. *Methods* (2001) 25:402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
22. Kassel R, Cruise MW, Iezzoni JC, Taylor NA, Pruett TL, Hahn YS. Chronically inflamed livers up-regulate expression of inhibitory B7 family members. *Hepatology* (2009) 50: 1625–37. doi:10.1002/hep.23173
23. Nan XR, Zhang Y, Yu HT, Sun RL, Peng MJ, Li Y, et al. Inhibition of viral replication downregulates CD4+CD25^{high} regulatory T cells and programmed death-ligand 1 in chronic hepatitis B. *Viral Immunol* (2012) 25:21–8. doi:10.1089/vim.2011.0049
24. Lee JY, Chae DW, Kim SM, Nam ES, Jang MK, Lee JH, et al. Expression of FasL and perforin/granzyme B mRNA in chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* (2004) 33:130–5. doi:10.1046/j.1365-2893.2003.00486.x
25. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* (2000) 407:789–95. doi:10.1038/35037728
26. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* (1995) 3:673–82. doi:10.1016/1074-7613(95)90057-8
27. Fulda S, Debatin KM. Modulation of TRAIL signaling for cancer therapy. *Vitam Horm* (2004) 67:275–90. doi:10.1016/S0083-6729(04)67015-4
28. Mundt B, Wirth T, Zender L, Waltemathe M, Trautwein C, Manns MP, et al. Tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces hepatic steatosis in viral hepatitis and after alcohol intake. *Gut* (2005) 54:1590–6. doi:10.1136/gut.2004.056929
29. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* (1997) 277:818–21. doi:10.1126/science.277.5327.818
30. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF- κ B and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* (1997) 7:813–20. doi:10.1016/S1074-7613(00)80399-4
31. Yao Q, Seol DW, Mi Z, Robbins PD. Intra-articular injection of recombinant TRAIL induces synovial apoptosis and reduces inflammation in a rabbit knee model of arthritis. *Arthritis Res Ther* (2006) 8:R16. doi:10.1186/ar1867
32. Stross L, Günther J, Gasteiger G, Asen T, Graf S, Aichler M, et al. Foxp3+ regulatory T cells protect the liver from immune damage and compromise virus control during acute, experimental hepatitis B virus infection. *Hepatology* (2012) 56:873–83. doi:10.1002/hep.25765
33. Tang Y, Jiang L, Zheng Y, Ni B, Wu Y. Expression of CD39 on FoxP3+ T regulatory cells correlates with progression of HBV infection. *BMC Immunol* (2012) 13:17. doi:10.1186/1471-2172-13-17
34. Wang Q, Zheng Y, Huang Z, Tian Y, Zhou J, Mao Q, et al. Activated IL-23/IL-17 pathway closely correlates with increased Foxp3 expression in livers of chronic hepatitis B patients. *BMC Immunol* (2011) 12:25. doi:10.1186/1471-2172-12-25
35. Peiseler M, Sebode M, Franke B, Wortmann F, Schwinge D, Quaas A, et al. FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *J Hepatol* (2012) 57:125–32. doi:10.1016/j.jhep.2012.02.007
36. Otano I, Suarez L, Dotor J, Gonzalez-Aparicio M, Cretaz J, Olague C, et al. Modulation of regulatory T cell activity in combination with IL-12 increases hepatic tolerogenicity in woodchucks with chronic hepatitis B. *Hepatology* (2012) 56:474–83. doi:10.1002/hep.25667
37. Boni C, Laccabue D, Lampertico P, Giuberti T, Viganò M, Schivazappa S, et al. Restored function of HBV-specific T cells after long-term effective therapy with nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* (2012) 143:963–73. doi:10.1053/j.gastro

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 26 April 2013; accepted: 08 July 2013; published online: 25 July 2013.

Citation: Germanidis G, Argentou N, Hytiroglou P, Vassiliadis T, Patsiaoura K, Germentis AE and Speletas M (2013) Liver FOXP3 and PD1/PDL1 expression is down-regulated in chronic HBV hepatitis on maintained remission related to the degree of inflammation. *Front. Immunol.* 4:207. doi:10.3389/fimmu.2013.00207

This article was submitted to *Frontiers in Immunological Tolerance*, a specialty of *Frontiers in Immunology*.

Copyright © 2013 Germanidis, Argentou, Hytiroglou, Vassiliadis, Patsiaoura, Germentis and Speletas. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:139–176.
2. Palmer E. Negative selection—clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:383–391.
3. Alferink J, Aigner S, Reibke R, Hammerling GJ, Arnold B. Peripheral T-cell tolerance: the contribution of permissive T-cell migration into parenchymal tissues of the neonate. *Immunol Rev.* 1999;169:255–261.
4. Walker LS, Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:11–19.
5. Shevach EM. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:389–400.
6. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic selftolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531–562.
7. Gershon RK, Kondo K.. Infectious immunological tolerance. *Immunology.* 1971;21:903–914.
8. Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y. Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. *J Exp Med.* 1982;156:1565–1576.
9. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155:1151–1164.
10. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003;3:253– 7.
11. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S *et al.* Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol.* 2013;14:307–308.
12. Bensinger SJ, Bandeira A, Jordan MS, Caton AJ, Laufer TM. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med* 2001;194:427–438.
13. Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, Annunziato F. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev.* 2005;4:579–586.
14. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, *et al.* Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001;2:301–306.
15. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2005;6:1142–1151.
16. Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol.* 2005;6:152–162.
17. Pacholczyk R, Kern J. The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells. *Immunology.* 2008;125:450–458.
18. Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, *et al.* Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood.* 2001;98:2736–2744.
19. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol.* 2000;164:183–190.
20. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001;167:1245–1253.

-
21. Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1008;188: 287–296.
22. Oberle N, Eberhardt N, Falk CS, Krammer PH, Suri-Payer E. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4⁺CD25 T cells by CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol.* 2007;179: 3578–3587.
23. Hatakeyama M, Tsudo M, Minamoto S, Kono T, Doi T, Miyata T, Miyasaka M, Taniguchi T. Interleukin-2 receptor beta chain gene: generation of three receptor forms by cloned human **alpha and beta chain cDNA's.** *Science.* 1989;244:551–556.
24. Holm TL, Nielsen J, Claesson MH. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology. *APMIS.* 2004;112:629–641.
25. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 2000;192: 303–310.
26. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, *et al.* CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* 2002;16:311–323.
27. Buonavista N, Balzano C, Pontarotti P, Le Paslier D, Golstein P. Molecular linkage of the human CTLA4 and CD28 Ig-superfamily genes in yeast artificial chromosomes. *Genomics.* 1992;13:856–861.
28. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002;3:135–142.
29. Tuyaerts S, Van Meirvenne S, Bonehill A, Heirman C, Corthals J, Waldmann H, *et al.* Expression of human GITRL on myeloid dendritic cells enhances their immunostimulatory function but does not abrogate the suppressive effect of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Leukoc Biol.* 2007;82:93–105.
30. Schreiber TH, Wolf D, Tsai MS, Chirinos J, Deyev VV, Gonzalez L, *et al.* Therapeutic Treg expansion in mice by TNFRSF25 prevents allergic lung inflammation. *J Clin Invest.* 2010;120:3629–3640.
31. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells. *J Exp Med.* 2006;203:1701–1711.
32. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2010;236:219–242.
33. Freeman GJ, Wherry EJ, Ahmed R, Sharpe AH. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1- PD-1 ligand blockade. *J Exp Med.* 2006;203:2223–2227.
34. Kitazawa Y, Fujino M, Wang Q, Kimura H, Azuma M, Kubo M, *et al.* Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses. *Transplantation.* 2007;83:774–782.
35. Raimondi G, Shufesky WJ, Tokita D, Morelli AE, Thomson AW. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4⁺CD25⁺ resting regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol.* 2006;176:2808–2816.
36. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, *et al.* Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 2004;21:503–513.
37. Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:13445–13450.
38. Wang R, Kozhaya L, Mercer F, Khaitan A, Fujii H, Unutmaz D. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:13439–13444.

-
39. Chen ML, Yan BS, Bando Y, Kuchroo VK, Weiner HL. Latency-associated peptide identifies a novel CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2008;180:7327–7337.
40. Tran DQ, Andersson J, Hardwick D, Bebris L, Illei GG, Shevach EM. Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3⁺ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood.* 2009;113: 5125–5133.
41. Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells. *Blood.* 2007;109:2058–2065.
42. Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E, **et al.** Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood.* 2007;110:1550–1558.
43. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005;6:345–352
44. Hill JA, Feuerer M, Tash K, Haxhinasto S, Perez J, Melamed R, **et al.** Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity.* 2007;27:786–800.
45. Sugimoto, N., Oida, T., Hirota, K., Nakamura, K., Nomura, T., Uchiyama, T., and Sakaguchi, S. (2006) Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int. Immunol.* **18**, 1197–1209
46. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE., Belkaid Y, **et al.** Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol.* 2010;184:3433–3441.
47. Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV, Harris TJ, Yen HR, Bruno TC, **et al.** A role for the transcription factor Helios in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Mol Immunol.* 2010;47:1595–1600.
48. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4:330–336.
49. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299:1057–1061.
50. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, **et al.** Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature.* 2007;445:771–775.
51. Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, et al. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol.* 2007;8:359–368.
52. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, **et al.** Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004;16:1643–1656.
53. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature.* 2007;445:936–940.
54. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:5138–5143.
55. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson P J, Whitesell L, **et al.** The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001;27:20–21.
56. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, **et al.** JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest.* 2000;106:R75–81.
57. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, **et al.** Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 2007;5:e38.
58. Janson PC, Winerdal ME, Marits P, Thorn M, Ohlsson R, Winqvist O. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS ONE.* 2008;3:e1612.

-
59. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol.* 2009; 9: 83–89.
60. Liu J, Lluís A, Illi S, Layland L, Olek S, von Mutius E, **et al.** T regulatory cells in cord blood – FOXP3 demethylation as reliable quantitative marker. *PLoS ONE.* 2010; 5:e13267.
61. Floess S., Freyer J., Siewert C., Baron U., Olek S., Polansky J., et al. (2007) Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 5:e38. doi:10.1371/journal.pbio.0050038.
62. Kim HP, Leonard WJ. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J Exp Med.* 2007; 204: 1543–1551.
63. Nagar M, Vernitsky H, Cohen Y, Dominissini D, Berkun Y, Rechavi G, **et al.** Epigenetic inheritance of DNA methylation limits activation-induced expression of FOXP3 in conventional human CD25⁺CD4⁺ T cells. *Int Immunol.* 2008; 20: 1041–1055.
64. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol.* 2008; 38: 1654–1663.
65. Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol.* 2010; 32: 95–106
66. Kuczma M, Pawlikowska I, Kopij M, Podolsky R, Rempala A, Kraj P. TCR repertoire and Foxp3 expression define functionally distinct subsets of CD4⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 2009; 183: 3118–3129.
67. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med (Berl.)* 1996; 74: 589–607.
68. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, **et al.** FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell.* 2006; 126: 375–387.
69. Haque R, Lei F, Xiong X, Wu Y, Song J. FoxP3 and Bcl-xL cooperatively promote regulatory T cell persistence and prevention of arthritis development. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12: R66.
70. Sharabi A, Mozes E. Bcl-xL affects the development of functional CD4 Tregs. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12: 405.
71. Sharabi A, Lapter S, Mozes E. Bcl-xL is required for the development of functional regulatory CD4 cells in lupus-afflicted mice following treatment with a tolerogenic peptide. *J Autoimmun.* 2010; 34: 87–95.
72. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, **et al.** Disruption of a new forkhead/ winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2010; 27: 68–73.
73. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, **et al.** The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001; 27: 20–21.
74. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, **et al.** Immunologic self-tolerance maintained by CD4⁺CD25⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 1998; 10: 1969–1980.
75. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, **et al.** The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol.* 2006; 176: 6752–6761.
76. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 1993; 75: 263–274.
77. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schaffer AA, Noyan F, **et al.** Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med.* 2009; 361: 2033–2045.
78. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med.* 2001; 193: 1285–1294.

-
- 79 . Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN. Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis- prone population. *Eur J Immunol.* 2001;31:1122–1131.
- 80 . Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med.* 2001;193:1303–1310.
81. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in regulatory T cells. *J Exp Med.* 2001;201:1061–1067.
82. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell.* 2008;134:392–404.
83. Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, **et al.** TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol.* 2004;172:834–842.
- 84 . Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contactdependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 2001;194:629–644.
85. Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, **et al.** IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol.* 2010;11:1093–1101.
86. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, **et al.** The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007;450:566–569.
87. Niedbala W, Wei XQ, Cai B, Hueber AJ, Leung BP, McInnes IB, **et al.** IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol.* 2007;37:3021–3029.
88. Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, Coulomb- **L’Hermine A, Devergne O.** Human CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol.* 2008;181:6898–6905.
89. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity.* 2004;21:589–601.
90. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol.* 2005;174:1783–1786.
91. Qin HY, Mukherjee R, Lee-Chan E, Ewen C, Bleackley RC, Singh B. A novel mechanism of regulatory T cell-mediated down-regulation of autoimmunity. *Int Immunol.* 2006;18:1001–1015.
92. Strauss L, Bergmann C, Whiteside TL. Human circulating CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells kill autologous CD8⁺ but not CD4⁺ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol.* 2009;182:1469–1480.
93. Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. The family of IL-10- secreting CD4⁺ T cells. *Adv Immunol.* 2010;105:99–129.
94. Beissert S, Schwartz A, Schwartz T. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol.* 2006;126:15–24.
95. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.* 2006;212:28–50.
96. **Wan YY, Flavell RA. “Yin-yang” functions of transforming growth factor-b and T regulatory cells in immune regulation. Immunol Rev.** 2007;220:199–213.
97. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martinez-Llordella M, Ashby M, **et al.** Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol.* 2009;10:1000–1007.
98. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol.* 2005;6:331–337.
99. Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature.* 2007;445:766–770.

-
100. Balandina A, Lecart S, Dartevielle P, Saoudi A, Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood*. 2005;105:735–741.
101. Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Phelps ML, Shin T, Matsui EC, *et al*. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood*. 2004;104:2187–2193.
102. Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity*. 2009;30:616–625.
103. Tsuji M, Komatsu N, Kawamoto S, Suzuki K, Kanagawa O, Honjo T, *et al*. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science*. 2009;323:1488–1492.
104. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, *et al*. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 2008;29:44–56.
105. Zhou X, Jeker LT, Fife BT, Zhu S, Anderson MS, McManus MT, *et al*. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J Exp Med*. 2008;205:1983–1991.
106. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, *et al*. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 2000;12:431–440.
107. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol*. 2008;9:239–244.
108. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, *et al*. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006;212:8–27.
109. Gallimore A, Sakaguchi S. Regulation of tumour immunity by CD25+ T cells. *Immunology*. 2002;107:5–9.
110. Rouse BT, Sarangi PP, Suvas S. Regulatory T cells in virus infections. *Immunol Rev*. 2006;212:272–286.
111. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2004;199:971–979.
112. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, *et al*. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J Exp Med*. 2004;200:277–285.
113. Lindley S, Dayan SM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4+CD25+ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005;54:92–99.
114. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, *et al*. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25^{high} regulatory T cells in psoriasis: Mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol*. 2005;174:164–173.
115. Boyer O, Saadoun D, Abriol J, Dodille M, Piette JC, Cacoub P, *et al*. CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood*. 2004;103:3428–3430.
116. Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D, *et al*. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol*. 2006;176:4484–4491.
117. Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4+CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2005;140:360–367.
118. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J. *et al*. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*. 2004;363:608–615.

-
119. Grindebacke H, Wing K, Andersson AC, Suri-Payer E, Rak S, Rudin A. Defective suppression of Th2 cytokines by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:1364–1372.
120. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, **et al**. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*. 2004;199:1567–1575.
121. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:271–283.
122. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards DF, **et al**. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest*. 2006;116:146–155.
123. Robinson DS, Larche M, Durham SR. Tregs and allergic disease. *J Clin Invest*. 2004;114:1389–1397.
124. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, et al. Regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res*. 2001;61:4766–4772.
125. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loeben B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2003;9:606–612.
126. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G. **et al**. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. 2002;169:2756–2761.
127. Viguier M, Lemaître F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, **et al**. Foxp3 expressing CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol*. 2004;173:1444–1453.
128. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2005;65:2457–2464.
129. Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, **et al**. Cutting edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol*. 2002;168:4272–4276.
130. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN, **et al**. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2004;103:1755–1762.
131. Fiore F, Nuschak B, Peola S, Mariani S, Muraro M, Foglietta M, **et al**. Exposure to myeloma cell lysates affects the immune competence of dendritic cells and favors the induction of Tr1-like regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2005;35:1155–1163.
132. Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, **et al**. CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55:1064–1071.
133. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:263–274.
134. Suvas S, Azkur AK, Kim BS, Kumaraguru U, Rouse BT. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J Immunol*. 2004;172:4123–4132.
135. Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT. CD4⁺CD25⁺ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8⁺ T cell responses. *J Exp Med*. 2003;198:889–901.
136. Toka FN, Suvas S, Rouse BT. CD4⁺CD25⁺ T cells regulate vaccine-generated primary and memory CD8⁺ T cell responses against herpes simplex virus type 1. *J Virol*. 2004;78:13082–13089.
137. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, **et al**. An immunomodulatory role for CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2004;40:1062–1071.

-
138. Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2005;41:771-778.
139. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, *et al.* T cells with a CD4⁺CD25⁺ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8⁺ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2005;79:7860-7867.
140. Rushbrook SM, Ward SM, Unitt E, Vowler SL, Lucas M, Klenerman P, *et al.* Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8⁺ T cells during persistent hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2005;79:7852-7859.
141. MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, *et al.* CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis*. 2002;185:720-727.
142. Redpath S, Ghazal P, Gascoigne NR. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol*. 2001;9:86-92.
143. McGuirk P, Mills KHG. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol*. 2002;23:450-455.
144. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-257.
145. Hengartner MO. **The biochemistry of apoptosis.** *Nature*. 2000;407:770-776.
146. Healy JI, Goodnow CC. Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:645-670.
147. Burek MJ, Oppenheim RW. Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol*. 1996;6:427-446.
148. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*. 1998;280:243-248.
149. Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:12736-12747.
150. Kumar S, Dorstyn L. Analysing caspase activation and caspase activity in apoptotic cells. *Methods Mol Biol*. 2009;559:3-17.
151. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997;326:1-16.
152. Ashe PC, Berry MD. Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27:199-214.
153. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 2003;10:76-100.
154. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:383-424.
155. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*. 1999;274:11549-11556.
156. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102:33-42.
157. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, *et al.* Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000;102:43-53.
158. LeBlanc AC. Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27:215-229.
159. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999;397:441-446.
160. Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ*. 1999;6:516-524.

-
161. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, *et al.* Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med.* 1995;182:367-377.
162. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gómez-Monterrey I, Castedo M, *et al.* Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 1996;183:1533-1544.
163. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell.* 1997;91:627-637.
164. Heiskanen KM, Bhat MB, Wang HW, Ma J, Nieminen AL. Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J Biol Chem.* 1999;274:5654-5658.
165. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997;275:1132-1136.
166. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 1997;275:1129-1132.
167. Johnson BW, Cepero E, Boise LH. Bcl-xL inhibits cytochrome c release but not mitochondrial depolarization during the activation of multiple death pathways by tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem.* 2000;275:31546-31553.
168. Sun XM, Bratton SB, Butterworth M, MacFarlane M, Cohen GM. Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J Biol Chem.* 2002;277:11345-11351.
169. Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J.* 2000;345:271-278.
170. Pavlov EV, Priault M, Pietkiewicz D, Cheng EH, Antonsson B, Manon S, *et al.* A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol.* 2001;155:725-731.
171. Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA, Saikumar P. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem.* 2001;276:18361-18374.
172. Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv.* 2000;74:281-286.
173. Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, *et al.* Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell.* 1993;73:431-445.
174. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal.* 2003;15:983-992.
175. Bhardwaj A, Aggarwal BB. Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol.* 2003;23:317-332.
176. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, *et al.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998;17:1675-1687.
177. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998;94:481-490.
178. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998;94:491-501.
179. Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol.* 2002;22:207-220.
180. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995;267:1456-1462.

-
181. Benoist C, Mathis D. Cell death mediators in autoimmune diabetes--no shortage of suspects. *Cell*. 1997;89:1-3.
182. Salmon M, Gordon C. The role of apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38:1177-1183.
183. Aupeix K, Hugel B, Martin T, Bischoff P, Lill H, Pasquali JL, *et al*. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest*. 1997;99:1546-1554.
184. Kim TW, Pettingell WH, Jung YK, Kovacs DM, Tanzi RE. Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. *Science*. 1997;277:373-376.
185. Lev N, Melamed E, Offen D. Apoptosis and Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27:245-250.
186. Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Semin Liver Dis*. 1998;18:105-14.
187. Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med*. 2000;108:567-574.
188. **J. González-Gallego, M.J. Tuñón**. Apoptosis in the Liver. In: Salido GM, Rosado JA, editors. *Apoptosis: Involvement of Oxidative Stress and Intracellular Ca²⁺ Homeostasis*. Netherlands: Springer; 2009.
189. Watson AJM. Necrosis and apoptosis in the gastrointestinal tract. *Gut* 1995;37:165-167.
190. Merrit AJ, Potten CS, Kemp CJ, Hickman JA, Balmain A, Lane DP, *et al*. The role of p53 in spontaneous and radiation induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53 deficient mice. *Cancer Res*. 1994;54:614-617.
191. Iwadate Y, Fujimoto S, Tagawa M, Namba H, Sueyoshi K, Hirose M, *et al*. Association of p53 gene mutation with decreased chemosensitivity in human gliomas. *Int J Cancer*. 1996;69:236-240.
192. Burch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role in disease. *Trends Pharmacol Sci*. 1992;13:245-251.
193. **Müllauer L, Grasl-Kraupp B, Bursch W, Schulte-Hermann R**. Transforming growth factor beta-1 induced cell death in preneoplastic foci of rat liver and sensitization by the anti-estrogen tamoxifen. *Hepatology*. 1996;23:840-847.
194. Newcomb EW. p53 gene mutations in lymphoid diseases and their possible relevance to drug resistance. *Leuk Lymphoma*. 1995;17:211-221.
195. Cox AD, Der CJ The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2003;22:8999-9006.
196. Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*. 1999;18:3004-3016.
197. Graves JA, Rothermund K, Wang T, Qian W, Van HB, Prochownik EV. Point mutations in c-Myc uncouple neoplastic transformation from multiple other phenotypes in rat fibroblasts. *PLoS One*. 2010;5:13717.
198. Boxer LM, Dang CV. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene*. 2001;20:5595-5610.
199. Nagata S. Autoimmune diseases caused by defects in clearing dead cells and nuclei expelled from erythroid precursors. *Immunol Rev*. 2007;220:237-250.
200. Madkaikar M, Mhatre S, Gupta M, Ghosh K. Advances in autoimmune lymphoproliferative syndromes. *Eur J Haematol*. 2011; 87:1-9.
201. Gschwind M, Huber G. Apoptotic cell death induced by beta-amyloid 1-42 peptide is cell type dependent. *J Neurochem* 1995; 65:292-300.
202. Walkinshaw G, Waters CM. Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA: implications for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Invest*. 1995;95:2458-2464.

-
203. Portera-Cailliau C, Sung CH, Nathans J, Adler R. Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:974-978.
204. Festoff BW. Amyotrophic lateral sclerosis: current and future treatment strategies. *Drugs*. 1996;51:28-44.
205. Rohn TT. The role of caspases in Alzheimer's disease; potential novel therapeutic opportunities. *Apoptosis*. 2010;15:1403-1409.
206. Alcami A, Koszinowski UH. Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today*. 2000;21:447-455.
207. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454:428-435.
208. Majno G, Joris I. *Cells, Tissues and Disease*. 2nd ed. University of Michigan: Oxford University Press; 2004.
209. Barton GM. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest*. 2008;118:413-420.
210. Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nature Immunol*. 2006;7:344-353.
211. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol*. 2001;2:816-822.
212. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*. 2007;13:108-116.
213. Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol*. 2003;171:6322-6327.
214. Lundgren A, Suri-Payer E, Enarsson K, Svennerholm AM, Lundin BS. Helicobacter pylori-specific CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells suppress memory T-cell responses to H. pylori in infected individuals. *Infect Immun*. 2003;71:1755-1762.
215. Xu D, Fu J, Jin L, Zhang H, Zhou C, Zou Z, *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;177:739-747.
216. Manigold T, Racanelli V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:804-813.
217. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol*. 2007;8:191-197.
218. Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, *et al*. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792:746-756.
219. Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol*. 2007;257:143-179.
220. Massague J. Integration of Smad and MAPK pathways: a link and a linker revisited. *Genes Dev*. 2003;17:2993-2997.
221. Masszi A, Di Ciano C, Sirokmány G, Arthur WT, Rotstein OD, Wang J, *et al*. Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284:911-924.
222. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes*. 1996;45:522-530.
223. Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, *et al*. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*. 2001;12:27-36.
224. Portella G, Cumming SA, Liddell J, Cui W, Ireland H, Akhurst RJ, *et al*. Transforming growth factor beta is essential for spindle cell conversion of mouse skin carcinoma in vivo: implications for tumor invasion. *Cell Growth Differ*. 1998;9:393-404.

-
225. Isoda K, Kamezawa Y, Tada N, Sato M, Ohsuzu F. Myocardial hypertrophy in transgenic mice overexpressing human interleukin 1alpha. *J Card Fail.* 2001; 7: 355-364.
226. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Demetris AJ, Feldman AM. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha causes lethal myocarditis in transgenic mice. *J Card Fail.* 1997; 3: 117-124.
227. Liao CH, Akazawa H, Tamagawa M, Ito K, Yasuda N, Kudo Y, **et al.** Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts. *J Clin Invest.* 2010; 120: 242-253.
228. Dienstag JL. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med.* 2008; 359: 1486-1500.
- 229 Szabo G, Dolganiuc A. HCV immunopathogenesis: virus-induced strategies against host immunity. *Clin Liver Dis.* 2006; 10: 753-771.
230. **Niederau C, Lange S, Heintges T, Erhardt A, Buschkamp M, Hürter D, et al.** Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study. *Hepatology.* 1998; 28: 1687-1695.
231. Fattovich G, Brollo L, Giustina G, Noventa F, Pontisso P, Alberti A, **et al.** Natural history and prognostic factors for chronic hepatitis type B. *Gut.* 1991; 32: 294-298.
232. Marcellin P, Lau GK, Bonino F, Farci P, Hadziyannis S, Jin R, **et al.** Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med.* 2004; 351: 1206-1217.
233. Wright TL. Introduction to chronic hepatitis B infection. *Am J Gastroenterol.* 2006; 101: S1-S6.
234. Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, **et al.** The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1996; 23: 1334-1340.
235. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl H Med* 1998; 339: 1485-92.
236. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell S. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology.* 2003; 37: 1202-1219.
237. Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Gastroenterol Reports.* 1999; 1: 57-61.
238. Younossi ZM, Gramlich T, Liu YC, Matteoni C, Petrelli M, Goldblum J, **et al.** Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations. *Mod Pathol.* 1998; 11: 560-565.
239. Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med.* 2005; 22: 1129-1133.
240. Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol.* 1989; 20: 594-598.
241. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology.* 1990; 11: 74-78.
242. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet.* 2001; 358: 893-894.
243. Caldwell SH, Hespenheide EE, Redick JA, Iezzoni JC, Battle EH, Sheppard BL. A pilot study of a thiazolidinedione, troglitazone, in nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96: 519-525.
244. Czaja AJ. Autoimmune liver disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2006; 22: 234-240.
245. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1261-1273.
246. Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest.* 1997; 99: 1472-1477.
247. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, **et al.** Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature.* 1993; 364: 806-809.

-
248. Rowan S, Fisher DE. Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia*. 1997;11:457-465.
249. Fischer R, Baumert T, Blum HE. Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J Gastroenterol*. 2007;13:4865-4872.
250. Yoon JH, Gores GJ. Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *J Hepatol*. 2002;37:400-410.
251. Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, *et al*. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*. 1994;265:528-530.
252. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature*. 1994;370:650-652.
253. Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell*. 1995;81:9-12.
254. Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med*. 1997;3:409-413.
255. Takaku S, Nakagawa Y, Shimizu M, Norose Y, Maruyama I, Wakita T, *et al*. Induction of hepatic injury by hepatitis C virus-specific CD8+ murine cytotoxic T lymphocytes in transgenic mice expressing the viral structural genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;301:330-337.
256. Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, *et al*. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med*. 1995;182:1223-1230.
257. Mochizuki K, Hayashi N, Hiramatsu N, Katayama K, Kawanishi Y, Kasahara A, *et al*. Fas antigen expression in liver tissues of patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 1996;24:1-7.
258. Hayashi N, Mita E. Fas system and apoptosis in viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997;12:S223-226.
259. Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, Mochizuki K, Kawanishi Y, Kasahara A, *et al*. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1994;19:1354-1359.
260. Mita E, Hayashi N, Iio S, Takehara T, Hijioka T, Kasahara A, *et al*. Role of Fas ligand in apoptosis induced by hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;204:468-474.
261. Lapinski TW, Kowalczyk O, Prokopowicz D, Chyczewski L. Serum concentration of sFas and sFasL in healthy HBsAg carriers, chronic viral hepatitis B and C patients. *World J Gastroenterol*. 2004;10:3650-3653.
262. Galle PR, Krammer PH. CD95-induced apoptosis in human liver disease. *Semin Liver Dis*. 1998;18:141-151.
263. Afford SC, Adams DH. Following the TRAIL from hepatitis C virus and alcohol to fatty liver. *Gut*. 2005;54:1518-1520.
264. Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Stürzbecher HW, *et al*. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res*. 1995;55:6012-6016.
265. Elmore LW, Hancock AR, Chang SF, Wang XW, Chang S, Callahan CP, *et al*. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:14707-14712.
266. Gottlob K, Fulco M, Levrero M, Graessmann A. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem*. 1998;273:33347-33353.
267. Takada S, Shirakata Y, Kaneniwa N, Koike K. Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death. *Oncogene*. 1999;18:6965-6973.
268. Chirillo P, Pagano S, Natoli G, Puri PL, Burgio VL, Balsano C, *et al*. The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:8162-8167.
269. Ito Y, Takeda T, Umeshita K, Sakon M, Wakasa K, Matsuura N, *et al*. Fas antigen expression in hepatocellular carcinoma tissues. *Oncol Rep*. 1998;5:41-44.

-
270. Wei HX, Chuang YH, Li B, Wei H, Sun R, Moritoki Y, *et al.* CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells protect against T cell-mediated fulminant hepatitis in a TGF-beta-dependent manner in mice. *J Immunol.* 2008;181:7221-7229.
271. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol.* 2008;9:194-202.
272. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997;390:465-471.
273. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000;275:2247-2250.
274. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2001;21:57-69.
275. Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, *et al.* Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:2572-2576.
276. Bayer EM, Herr W, Kanzler S, Waldmann C, Meyer Zum Büschenfelde KH, Dienes HP, *et al.* Transforming growth factor-beta1 in autoimmune hepatitis: correlation of liver tissue expression and serum levels with disease activity. *J Hepatol.* 1998;28:803-11.
277. Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N, Shirai Y, Kiso S, *et al.* Reduced plasma transforming growth factor-beta1 levels in patients with chronic hepatitis C after interferon-alpha therapy: association with regression of hepatic fibrosis. *J Hepatol.* 1999;30:1-7.
278. Hosui A, Kimura A, Yamaji D, Zhu BM, Na R, Hennighausen L. Loss of STAT5 causes liver fibrosis and cancer development through increased TGF- β and STAT3 activation. *J Exp Med.* 2009;206:819-831.
279. Andrianakos A, Trontzas P, Krachtis P, Pantelidou K, Kaskani E, Kontelis L, *et al.* Symptomatic peripheral osteoarthritis (SPOA) as a cause of long term disability (LTD) compared to other major disease groups (MDG) in Greek adult general population. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(Suppl 1):157.
- 280 Ανδριανάκος Α, Τρόντζας Π, Χριστογιάννης Φ, Ντάντης Π, Βουδούρης Κ, Γεωργούντζος Α, και συν. Επιπολασμός των ρευματικών νοσημάτων στην Ελλάδα: Περιγραφική επιδημιολογική μελέτη. Η μελέτη ESORDIG. *Ιατρική.* 2003;84:18-206.
281. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1237-1247.
282. Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, Rat AC, Toussaint F, Pinzano-Watrin A, *et al.* Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis Rheum.* 2005;52: 3492-3501.
283. Myers SL, Brandt KD, Ehlich JW, Braunstein EM, Shelbourne KD, Heck DA, *et al.* Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol.* 1990;17: 1662-1669.
284. Haraoui B, Pelletier JP, Cloutier JM, Faure MP, Martel-Pelletier J. Synovial membrane histology and immunopathology in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In vivo effects of antirheumatic drugs. *Arthritis Rheum.* 1991;34: 153-163.
285. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald, O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:1263-1267.
286. Da RR, Qin Y, Baeten D, Zhang Y. B cell clonal expansion and somatic hypermutation of Ig variable heavy chain genes in the synovial membrane of patients with osteoarthritis. *J Immunol.* 2007;178: 557-565.
287. Smith MD, Triantafyllou S, Parker A, Youssef PP, Coleman M. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol.* 1997;24: 365-371.

-
288. Sakkas LI, Platsoucas CD. The role of T cells in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56: 409-424.
289. Goldring MB. Anticytokine therapy for osteoarthritis. *Expert Opin Biol Ther.* 2001;1: 817-829.
290. Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford).* 2005;44: 7-16.
291. Aigner T, Kim HA. Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degradation. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:1986-1996.
292. Goggs R, Carter SD, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M, Mobasher A. Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. *V J.* 2003;166: 140-158.
293. Lotz M, Hashimoto S, Kuhn K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage.* 1999;7: 389-391.
294. Mobasher A. Role of chondrocyte death and hypocellularity in aging human articular cartilage and the pathogenesis of osteoarthritis. *Med Hypotheses.* 2002;58:193-197.
295. Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis: a possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum.* 1998;41:284-289.
296. Heraud F, Heraud A, Harmand MF. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis.* 2000;59: 959-965.
297. Kim HA, Suh DI, Song YW. Relationship between chondrocyte apoptosis and matrix depletion in human articular cartilage. *J Rheumatol.* 2001;28: 2038-2045.
298. Okamoto K, Fujisawa K, Hasunuma T, Kobata T, Sumida T, Nishioka K. Selective activation of the JNK/AP-1 pathway in Fas-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 1997;40: 919-926.
299. Firestein GS, Yeo M, Zvaifler NJ. Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *The J Clin Invest.* 1995;96: 1631-1638.
300. Kobayashi T, Okamoto K, Kobata T, Hasunuma T, Sumida T, Nishioka K. Tumor necrosis factor alpha regulation of the FAS-mediated apoptosis-signaling pathway in synovial cells. *Arthritis Rheum.* 1999;42: 519-526.
301. Yao Q, Wang S, Gambotto A, Glorioso JC, Evans CH, Robbins PD, *et al.* Intra-articular adenoviral-mediated gene transfer of trail induces apoptosis of arthritic rabbit synovium. *Gene Ther.* 2003;10: 1055-1060.
302. Yao Q, Seol DW, Mi Z, Robbins PD. Intra-articular injection of recombinant TRAIL induces synovial apoptosis and reduces inflammation in a rabbit knee model of arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:R16.
303. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, DeGroot J, Gudat F, *et al.* Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22: 696-699.
304. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999;94: 2467-2474.
305. Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS. Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 1978;379: 103-112.
306. Scheuer PJ. Primary Biliary Cirrhosis. *Proc R Soc Med.* 1967;60: 1257-1260.
307. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond).* 2005;109: 365-379.
308. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, *et al.* The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27: 95-125.

-
309. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta^{CT})$ method. *Methods*. 2001;25:402-408.
- 310 Apostolou E, Stavropoulos A, Sountoulidis A, Xirakia C, Giaglis S, Protopapadakis E, *et al.* Activin-A overexpression in the murine lung causes pathology that simulates acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;15:382-391.
311. Bishop GA, Rokahr KL, Lowes M, McGuinness PH, Napoli J, DeCruz DJ, *et al.* Quantitative reverse transcriptase-PCR amplification of cytokine mRNA in liver biopsy specimens using a non-competitive method. *Immunol Cell Biol*. 1997;75:142-147.
312. Shi SR, Shi Y, Taylor CRJ. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *Histochem Cytochem*. 2011;59:13-32.
313. Teodoro JG, Branton PE. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol*. 1997;71:1739-1746.
314. Luo KX, Zhu YF, Zhang LX, He HT, Wang XS, Zhang L. In situ investigation of Fas/FasL expression in chronic hepatitis B infection and related liver diseases. *J Viral Hepat*. 1997;4:303-307.
315. Rodrigues CM, Brites D, Serejo F, Costa A, Ramalho F, Carneiro De Moura M. Apoptotic cell death does not parallel other indicators of liver damage in chronic hepatitis c patients. *J Viral Hepat*. 2000;7:175-183.
316. Tagashira M, Yamamoto K, Fujio K, Nagano T, Okamoto R, Ibuki N, *et al.* Expression of perforin and Fas ligand mRNA in the liver of viral hepatitis. *J Clin Immunol*. 2000;20:347-353.
317. Lee JY, Chae DW, Kim SM, Nam ES, Jang MK, Lee JH, *et al.* Expression of FasL and perforin/granzyme B mRNA in chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat*. 2004;11:130-135.
318. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest*. 1995;95:2111-2119.
319. Copaci I, Micu L, Voiculescu M. The role of cytokines in non-alcoholic steatohepatitis. A systematic review. *J Gastrointest Liver Dis*. 2006;15:363-373.
320. **Q. Chen, M. Galleano, and A. I. Cederbaum, "Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in Hep G2 cells overexpressing human cytochrome P4502E1,"** *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 23, pp. 14532-14541, 1997.
321. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002;8:288-295.
322. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, *et al.* Hepatocyte apoptosis and Fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2003;125:437-443.
323. Li Z, Oben JA, Yang S, Lin H, Stafford EA, Soloski MJ, *et al.* Norepinephrine regulates hepatic innate immune system in leptin-deficient mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2004;40:434-441.
324. Mundt B, Wirth T, Zender L, Waltemathe M, Trautwein C, Manns MP, *et al.* Tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces hepatic steatosis in viral hepatitis and after alcohol intake. *Gut*. 2005;54:1590-1596.
325. Chou AH, Tsai HF, Wu YY, Hu CY, Hwang LH, Hsu PI, *et al.* Hepatitis C virus core protein modulates TRAIL-mediated apoptosis by enhancing bid cleavage and activation of mitochondria apoptosis signaling pathway. *J Immunol*. 2005;174:2160-2166.
326. Malhi H, Barreyro FJ, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ. Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut*. 2007;56:1124-1131.
327. Volkman X, Fischer U, Bahr MJ, Ott M, Lehner F, Macfarlane M, *et al.* Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver. *Hepatology*. 2007;46:1498-1508.

-
328. Bortolami M, Kotsafti A, Cardin R, Farinati F. Fas/FasL system, IL-1 β expression and apoptosis in chronic HBV and HCV liver disease. *J Viral Hepat.* 2008;15:515–522.
329. Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, Pitossi F, Gauldie J. Transient expression of IL-1 β induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 2001;107:1529–1536.
330. McCall CE, Yoza BK. Gene silencing in severe systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:763–767.
331. Cope AP, Feldmann M. Emerging approaches for the therapy of autoimmune and chronic inflammatory disease. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:780–786.
332. Wrighton CJ, Hofer-Warbinek R, Moll T, Eytner R, Bach FH, de Martin R. Inhibition of endothelial cell activation by adenovirus-mediated expression of I κ B α , an inhibitor of the transcription factor NF- κ B. *J Exp Med.* 1996;183:1013–1022.
333. Carroll MB, Bond MI. Use of tumor necrosis factor- α inhibitors in patients with chronic hepatitis B infection. *Semin Arthritis Rheum.* 2008;38:208–217.
334. Ward SM, Fox BC, Brown PJ, Worthington J, Fox SB, Chapman RW, *et al.* Quantification and localisation of FOXP3⁺ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. *J Hepatol.* 2007;47:316–324.
335. Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, Gotto J, Williams R, Maini MK. *et al.* Modulation of the CD8⁺-T-cell response by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol.* 2005;79:3322–3328.
336. Kerr JF, Cooksley WG, Searle J, Halliday JW, Halliday WJ, Holder L, *et al.* The nature of piecemeal necrosis in chronic active hepatitis. *Lancet.* 1979;2:827–828.
337. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology.* 2003;38:1437–1448.
338. Aseffa A, Gumy A, Launois P, MacDonald HR, Louis JA, Tacchini-Cottier F. The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *J Immunol.* 2002;169:3232–3241.
339. Hori S, Carvalho TL, Demengeot J. CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells suppress CD4⁺ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur J Immunol.* 2002;32:1282–1291.
340. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol.* 2007;8:457–462.
- Sakaki M, Hiroishi K, Baba T, Ito T, Hirayama Y, Saito K, *et al.* Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune liver diseases and chronic viral hepatitis. *Hepatol Res.* 2008;38:354–361.
342. Saeki C, Nakano M, Takahashi H, Saito S, Homma S, Tajiri H, *et al.* Accumulation of functional regulatory T cells in actively inflamed liver in mouse dendritic cell-based autoimmune hepatic inflammation. *Clin Immunol.* 2010;135:156–166.
343. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2001;344:1140–1144.
344. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell.* 2010;140:845–858.
345. Watanabe T, Bertolotti A, and Tanoto TA. PD-1/PD-L1 pathway and T-cell exhaustion in chronic hepatitis virus infection. *J Viral Hepat (2010)* 17: 453–58.
346. Fasicaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Biasini E, Sacchelli L, *et al.* Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* 2010;138:682–693.
347. Kassel R, Cruise MW, Iezzoni JC, Taylor NA, Pruett TL, Hahn YS. Chronically inflamed livers up-regulate expression of inhibitory B7 family members. *Hepatology.* 2009;50:1625–1637.

-
348. Nan XP, Zhang Y, Yu HT, Sun RL, Peng MJ, Li Y, *et al.* Inhibition of viral replication downregulates CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells and programmed death-ligand 1 in chronic hepatitis B. *Viral Immunol.* 2012;25: 21-28.
349. Speletas M, Argentou N, Germanidis G, Vassiliadis T, Mantzoukis K, Patsiaoura K, *et al.* Foxp3 expression in liver correlates with the degree but not the cause of inflammation. *Mediators Inflamm.* 2011;827565.
350. **Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000;407: 789–795.**
351. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* 1995;3:673–682.
352. Fulda S, and Debatin KM. Modulation of TRAIL signaling for cancer therapy. *Vitam Horm (2004) 67: 275-90.*
353. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, *et al.* Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science.* 1997;277:818-821.
354. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-κB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity.* 1997;7:813-820.
355. **Stross L, Günther J, Gasteiger G, Asen T, Graf S, Aichler M, et al.** Foxp3⁺ regulatory T cells protect the liver from immune damage and compromise virus control during acute, experimental hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 2012;56:873-883.
356. Tang Y, Jiang L, Zheng Y, Ni B, Wu Y. Expression of CD39 on FoxP3⁺ T regulatory cells correlates with progression of HBV infection. *BMC Immunol.* 2012;13:17.
- 357 Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut.* 2012;61:1754-1764.
- 358 Zhang M, Zhou J, Zhao T, Huang G, Tan Y, Tan S, *et al.* Dissection of a circulating and intrahepatic CD4(+)Foxp3(+) T-cell subpopulation in chronic hepatitis B virus (HBV) infection: a highly informative strategy for distinguishing chronic HBV infection states. *J Infect Dis.* 2012;205:1111-1120.
- 359 Wang Q, Zheng Y, Huang Z, Tian Y, Zhou J, Mao Q, *et al.* Activated IL-23/IL-17 pathway closely correlates with increased Foxp3 expression in livers of chronic hepatitis B patients. *BMC Immunol.* 2011;12:25.
360. Peiseler M, Sebode M, Franke B, Wortmann F, Schwinge D, Quaas A, *et al.* FOXP3⁺ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *J Hepatol.* 2012;57:125-132.
361. Otano I, Suarez L, Dotor J, Gonzalez-Aparicio M, Crettaz J, Olagüe C, *et al.* Modulation of regulatory T cell activity in combination with IL-12 increases hepatic tolerogenicity in woodchucks with chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2012;56:474-483.
362. Boni C, Laccabue D, Lampertico P, Giuberti T, Vigano M, Schivazappa S, *et al.* Restored function of HBV-specific T cells after long-term effective therapy with nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology.* 2012;143:963-973.
363. Ayral X, Pickering EH, Woodworth TG, Mackillop N, Dougados M.. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis—results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13:361–367.
364. Revell PA, Mayston V, Lalor P, Mapp P. The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Ann Rheum Dis.* 1988;47:300–307.
365. Wang Q, Rozelle AL, Lepus CM, Scanzello CR, Song JJ, Larsen DM, *et al.* Identification of a central role for complement in osteoarthritis. *Nat Med.* 2011;17:1674–1679.
366. Nakamura H, Yoshino S, Kato T, Tsuruha J, Nishioka K.. T-cell mediated inflammatory pathway in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 1999;7:401–402.

-
367. Rollín R, Marco F, Jover JA, García-Asenjo JA, Rodríguez L, López-Durán L, *et al.* Early lymphocyte activation in the synovial microenvironment in patients with osteoarthritis: comparison with rheumatoid arthritis patients and healthy controls. *Rheumatol Int.* 2008;28:757-764.
368. Germanidis G, Argentou N, Hytioglou P, Vassiliadis T, Patsiaoura K, Germenis AE, *et al.* Liver FOXP3 and PD1/PDL1 Expression is Down-Regulated in Chronic HBV Hepatitis on Maintained Remission Related to the Degree of Inflammation. *Front Immunol.* 2013;4:207.
369. Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Yonezawa T, Kimura T. Reduced expression of the regulatory CD4⁺ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:617-627.
370. Nesterov A, Ivashchenko Y, Kraft AS. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) triggers apoptosis in normal prostate epithelial cells. *Oncogene.* 2002;21:1135-1140.
371. Pettersen I, Figenschau Y, Olsen E, Bakkelund W, Smedsröd B, Sveinbjörnsson B. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in human articular chondrocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;296:671-676.
372. Diehl GE, Yue HH, Hsieh K, Kuang AA, Ho M, Morici LA, *et al.* TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity.* 2004;21:877-889.
373. Kimberley FC, Screaton GR. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res.* 2004;14:359-372.
374. Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, *et al.* Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem.* 1998;273:14363-14367.
375. Dharmaptni AA, Smith MD, Findlay DM, Holding CA, Evdokiou A, Ahern MJ, *et al.* Elevated expression of caspase-3 inhibitors, survivin and XIAP correlates with low levels of apoptosis in active rheumatoid synovium. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R13.
376. Walsh DA, Bonnet CS, Turner EL, Wilson D, Situ M, McWilliams DF. Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15:743-751.
377. Hong S, Lim S, Li AG, Lee C, Lee YS, Lee EK, *et al.* Smad7 binds to the adaptors TAB2 and TAB3 to block recruitment of the kinase TAK1 to the adaptor TRAF2. *Nat Immunol.* 2007;8:504-513.
378. Ka SM, Huang XR, Lan HY, Tsai PY, Yang SM, Shui HA, *et al.* Smad7 gene therapy ameliorates an autoimmune crescentic glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:1777-1788.
379. L. Zhu, L. Wang, X. Wang, *et al.*, "Hepatic deletion of Smad7 in mouse leads to spontaneous liver dysfunction and aggravates alcoholiv liver injury", *PLoS One*, vol. 6, no. 2, article ID e17415, 2011.
380. Fantini MC, Rizzo A, Fina D, Caruso R, Sarra M, Stolfi C, *et al.* Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression. *Gastroenterology.* 2009;136:1308-1316.
381. Boirivant M, Pallone F, Di Giacinto C, Fina D, Monteleone I, Marinaro M, *et al.* Inhibition of Smad7 with a specific antisense oligonucleotide facilitates TGF-beta1-mediated suppression of colitis. *Gastroenterology.* 2006;131:1786-1798.
382. Dooley S, Hamzavi J, Breikopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, *et al.* Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology.* 2003;125:178-191.
383. Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, *et al.* Differential Regulation of TGF-beta Signal in Hepatic Stellate Cells Between Acute and Chronic Rat Liver Injury. *Hepatology.* 2002;35:49-61.
384. Stopa M, Anhuf D, Terstegen L, Gatsios P, Gressner AM, Dooley S. Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor beta (TGF-beta)-induced activation of Smad7. The TGF-beta response element of the promoter requires functional Smad binding element and E-box sequences for transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2000;275:29308-29317.

-
385. Dooley S, Streckert M, Delvoux B, Gressner AM. Expression of Smads during in vitro transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;283:554-562.
386. **Massagué J**, Chen YG. Review Controlling TGF-beta signalling. *Genes Dev.* 2000;14:627-644.
387. Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, **et al.** Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell.* 2000;6:1365-75.
388. Weng H, Mertens PR, Gressner AM, Dooley S. IFN-gamma abrogates profibrogenic TGF-beta signaling in liver by targeting expression of inhibitory and receptor Smads. *J Hepatol.* 2007;46:295-303.
389. Bitzer M, von Gersdorff G, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M. **et al.** A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev.* 2000;14:187-197.
390. Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7:425-436.
391. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest.* 2007;117:539-548.
392. Dooley S, ten Dijke P. **TGF- β in progression of liver disease.** *Cell Tissue Res.* 2012;347:245-256.
393. Dooley S, Hamzavi J, Ciucan L, Godoy P, Ilkavets I, Ehnert S, **et al.** Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF β -mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology.* 2008;135:642-659.
394. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, Thannickal VJ, **et al.** miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med.* 2010;207:1589-1597.
395. Marquez RT, Bandyopadhyay S, Wendlandt EB, Keck K, Hoffer BA, Icardi MS, **et al.** Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans. *Lab Invest.* 2010;90:1727-1736.
396. Gressner OA, Gressner AM. Connective tissue growth factor: a fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases. *Liver Int.* 2008;28:1065-1079.
397. Tong Z, Chen R, Alt DS, Kemper S, Perbal B, Brigstock DR. Susceptibility to liver fibrosis in mice expressing a connective tissue growth factor transgene in hepatocytes. *Hepatology.* 2009;50:939-947.
398. Gressner OA, Lahme B, Demirci I, Gressner AM, Weiskirchen R. Differential effects of TGF-beta on connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in hepatic stellate cells and hepatocytes. *J Hepatol.* 2007;47:699-710.
399. Piao RL, Brigstock DR, Zhu J, Zhang ML, Gao RP. Clinical significance of connective tissue growth factor in hepatitis B virus-induced hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol.* 2012;18:2280-2286.
400. Gressner OA, Fang M, Li H, Lu LG, Gressner AM, Gao CF. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in serum is an indicator of fibrogenic progression and malignant transformation in patients with chronic hepatitis B infection. *Clin Chim Acta.* 2013;421:126-131.
401. Walter R, Wanninger J, Bauer S, Eisinger K, Neumeier M, Weiss TS, **et al.** Adiponectin reduces connective tissue growth factor in human hepatocytes which is already induced in non-fibrotic non-alcoholic steatohepatitis. *Exp Mol Pathol.* 2011;91:740-744.
402. Schaffler A, **Schölmerich J, Büchler C.** Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue — emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Prac Gastroenterol Hepatol.* 2005;2:273-280.