



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΚΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ
ΤΗΣ ΔΙΟΞΕΙΤΩΣΗΣ
ΣΤΟ ΗΠΑΤΙΚΟ ΠΑΡΕΧΥΜΑ
ΣΗΠΤΙΚΩΝ ΒΗΜΥΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΑΡΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΙΔΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ
ΑΘΗΝΑ, 2007-2008

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε
στο Εργαστήριο Χειρουργικής Έρευνας, της Α΄ Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής,
του Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Ιπποκράτειο Νοσοκομείο,
κατά την περίοδο: Οκτώβριος 2007 έως Μάιος 2008.

Η τριμελής επιτροπή αποτελείται απο τους:

Μανούσο Μ. Κωνσταντουλάκη,
Επίκουρο Καθηγητή Χειρουργικής της Ιατρικής σχολής
του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Παναγιώτη Μαρκουλάτο,
Αναπληρωτή Καθηγητή Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία
του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αιμιλία Ζίφα,
Λέκτορα Βιολογίας-Νευροβιολογίας
του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΚΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ
ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ
ΣΤΟ ΗΠΑΤΙΚΟ ΠΑΡΕΓΧΥΜΑ
ΣΗΠΤΙΚΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ

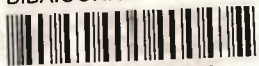
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΙΔΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ
ΑΘΗΝΑ 2007-2008



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 11628/1
Ημερ. Εισ.: 19-04-2013
Δωρεά: -
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2008
ΚΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000115513

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

- Θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή Χειρουργικής της Ιατρικής σχολής του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Μανούσο Μ. Κωνσταντουλάκη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.
 - Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω, τα άλλα μέλη της τριμελούς επιτροπής, Παναγιώτη Μαρκουλάτο, Αναπληρωτή Καθηγητή Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Αιμιλία Ζίφα, Λέκτορα Βιολογίας-Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
 - Ευχαριστώ βαθύτατα τα μέλη του Εργαστηρίου Χειρουργικής Έρευνας, Α΄ Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής, Πανεπιστημίου Αθηνών, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο και συγκεκριμένα, την Βιολόγο Αγάπη Κατάκη, MSc, PhD για την καθοδήγησή και την επίβλεψη της εργασίας μου, τις Βιολόγους Μαριλένα Νικολοπούλου MSc, PhD και Αναστασία Δερβεντή MSc, PhD, την Βιοχημικό Πολυξένη Δούμπα και τον Ιατρό Νικόλαο Μέμο για την επιστημονική υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές τους.
 - Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τους φίλους μου και την Άντα για την συμπαράσταση τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.
-

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1. ΗΠΑΡ	15
1.1. ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ	17
1.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ	17
1.3. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΗΠΑΤΟΣ	18
1.3.1. ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ	19
1.3.2. ΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	20
1.3.2.A. ΠΥΛΑΙΟ ΦΛΕΒΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	20
1.3.2.B. ΗΠΑΤΙΚΟ ΦΛΕΒΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	21
1.3.2.Γ. ΗΠΑΤΙΚΟ ΑΡΤΗΡΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	21
1.3.3. ΧΟΛΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	21
1.3.4. ΛΕΜΦΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	22
1.3.5. ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	23
1.3.6. ΔΟΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ	23
1.4. ΚΥΡΙΟΙ ΗΠΑΤΙΚΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ	25
1.4.1. ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΑ	26
1.4.2. Ο ΧΩΡΟΣ ΤΟΥ DISSE	28
1.4.3. ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΚΟΛΠΟΕΙΔΩΝ ΤΡΙΧΟΕΙΔΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ	28
1.4.3.A. ΚΟΛΠΟΕΙΔΗ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	30
1.4.3.B. ΚΥΤΤΑΡΑ KUPFFER	30
1.4.3.Γ. ΗΠΑΤΙΚΑ ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΑΡΑ	32

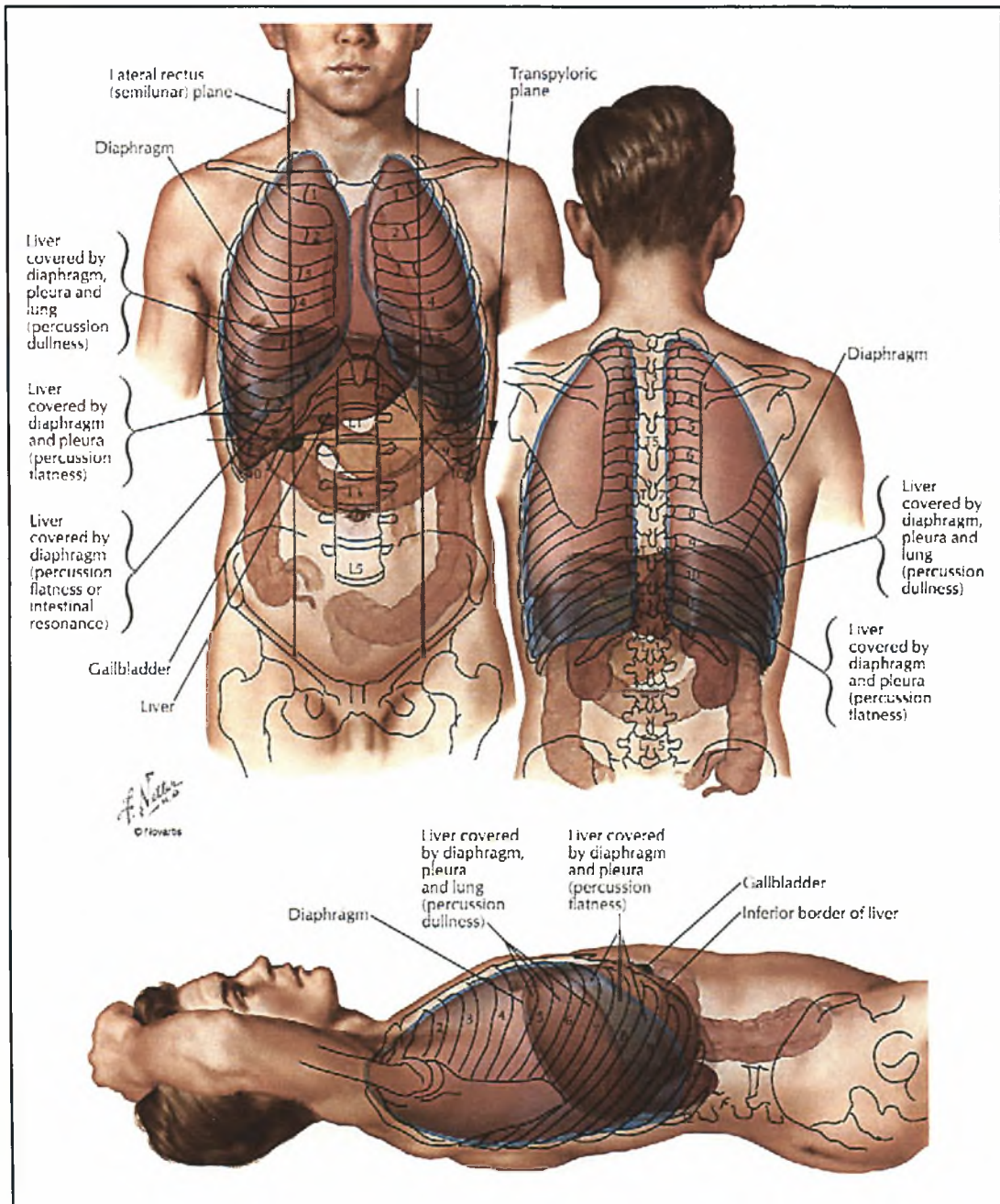
1.4.4.	ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ	34
1.4.5.	ΧΟΛΙΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	35
1.5.	ΚΥΡΙΕΣ ΗΠΑΤΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	36
1.5.1.	ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ	36
1.5.1.A.	ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ	36
1.5.1.B.	ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ	37
1.5.1.Γ.	ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	38
1.5.2.	ΕΚΚΡΙΣΗ ΧΟΛΗΣ	39
1.5.3.	ΕΚΚΡΙΣΗ ΟΡΜΟΝΩΝ	40
1.5.4.	ΗΠΑΤΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ	41
1.5.5.	ΑΠΟΤΟΞΙΝΩΣΗ ΟΥΣΙΩΝ	43
2.	ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΝΕΚΡΩΣΗ	44
2.1.	ΑΠΟΠΤΩΣΗ	44
2.2.	ΝΕΚΡΩΣΗ	47
3.	ΣΗΨΗ	47
4.	ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ	49
4.1	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ	50
5.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	51
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ		53
1.	ΥΛΙΚΑ	53
1.1.	ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	53
1.2.	ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ	54
2.	ΜΕΘΟΔΟΙ	55
2.1.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΗΨΗΣ ΣΕ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥΣ ΕΠΙΜΥΕΣ	55
2.1.1.	ΖΩΑ	55
2.1.2.	ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΣΗΨΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΤΥΦΛΟΥ (Cecal Ligation and Puncture C.L.P.)	56

2.2.	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ	58
2.2.1.	ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	58
2.2.2.	ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ	59
2.2.3.	ΕΠΩΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ	60
2.2.4.	ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΤΑΣΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ ΡΟΗΣ	61
2.3.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	62
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	75
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	81

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ήπαρ αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα όργανα του σώματος, εκτελώντας ένα μεγάλο μέρος απαραίτητων για τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού διεργασιών. Η κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους επιδρά η απόπτωση στους κυτταρικούς πληθυσμούς του ήπατος, έχει αποτελέσει το αντικείμενο πολλών ερευνών, τα αποτελέσματα όμως είναι αντιφατικά και δεν εξηγούν τη γενική εικόνα του φαινομένου. Στην παρούσα μελέτη, εξετάζεται η χρονική κατανομή της απόπτωσης και της νέκρωσης, σε τέσσερις κύριους κυτταρικούς πληθυσμούς του ήπατος. Χρησιμοποιήθηκαν 35 αρσενικοί αρουραίοι Wistar, στους οποίους προκλήθηκε σήψη με τη μέθοδο της τρώσης και απολίνωσης του τυφλού (C.L.P. Cecal Ligation and Puncture). Τα ζώα θανατώθηκαν στις 6, 12, 24, 36, 48 και 60 ώρες μετά την πρόκληση σήψης. Το ήπαρ αφαιρέθηκε από 5 ζώα σε κάθε χρονική ομάδα, καθώς επίσης και από 5 ζώα στα οποία δεν είχε προκληθεί σήψη και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σαν ομάδα ελέγχου. Τα δείγματα ήπατος αποθηκεύτηκαν στους -80° C και κατά τη διάρκεια του πειράματος, ομογενοποιήθηκαν, επώαστηκαν με αντισώματα και φθορίζουσες χρωστικές και τέλος, η ένταση του φθορισμού μετρήθηκε στον κυτταρομετρητή ροής, με σκοπό να ανιχνευθούν οι μεταβολές της απόπτωσης και της νέκρωσης σε σχέση με τον χρόνο, στους εξής τύπους κυττάρων του ήπατος: ηπατοκύτταρα, μακροφάγα, κύτταρα Ito και ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δείχνουν ότι: 1) τα κύτταρα του ήπατος κατά τη σήψη οδηγούνται στο θάνατο κυρίως μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης. 2) Τα ηπατοκύτταρα, είναι αυτά που προσεγγίζουν τη γενική εικόνα της απόπτωσης, η οποία αυξάνεται στις 6 ώρες μετά την πρόκληση σήψης και πέφτει σε χαμηλά επίπεδα στις 60 ώρες, καθώς επίσης και την γενική εικόνα της νέκρωσης του οργάνου, που εμφανίζει άνοδο στις 6 και 48 ώρες και πτώση στις 60 ώρες μετά την πρόκληση σήψης. 3) Η μεταβολή της απόπτωσης στους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς είναι μικτή και αντικατοπτρίζει τις ξεχωριστές τους λειτουργίες.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



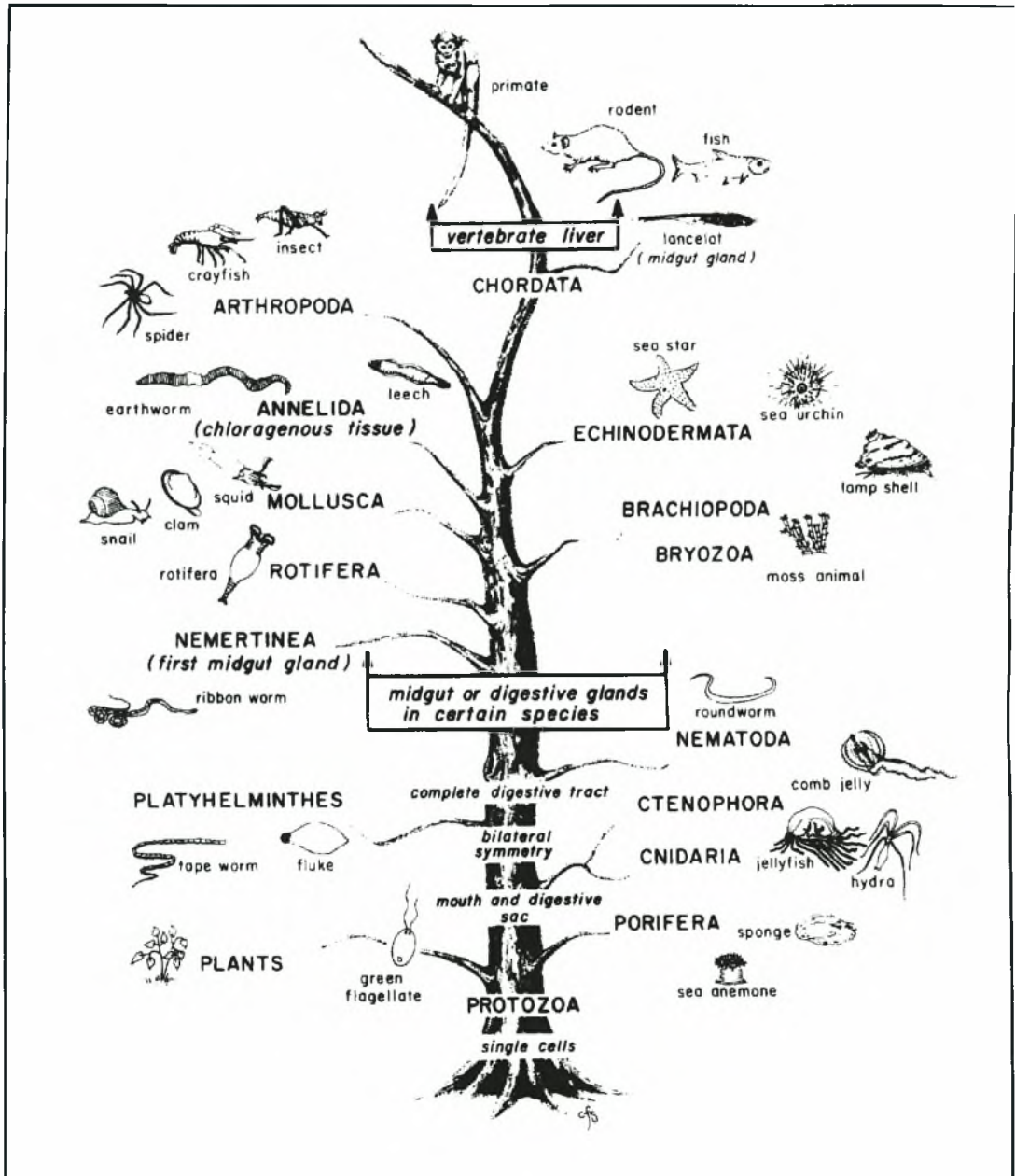
Εικόνα 1:
Η θέση του ήπατος στο ανθρώπινο σώμα.

Πηγή: Atlas of Human Anatomy,
2nd Edition, Frank H. Netters.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΗΠΑΡ

Το ήπαρ είναι το μεγαλύτερο όργανο στον άνθρωπο και το δεύτερο μεγαλύτερο συνολικά μετά το δέρμα, ενώ, αποτελεί και τον μεγαλύτερο αδένα του σώματος [1], (1, 2, 3). Το βάρος του σε ενήλικες άνδρες και γυναίκες είναι 1,4 και 1,8 kg αντίστοιχα, αποτελώντας το 1,8-3,1% του σωματικού βάρους [1], (2). Το ώριμο ήπαρ στον άνθρωπο, βρίσκεται στο δεξιό υποχόνδριο (δεξιό και άνω μέρος της κοιλιάς) κάτω από τα πλευρά και εκτείνεται και στο επιγάστριο (κεντρικό και άνω μέρος της κοιλιάς). Ένα μεγάλο τμήμα του καλύπτεται από το δεξιό πλευρικό τόξο (Εικόνα 1). Διαχωρίζεται από τους πνεύμονες και την καρδιά από το διάφραγμα [1], (3). Οι διαστάσεις του κυμαίνονται από 12-15cm οριζόντια και από 15-20cm κάθετα. Στην κυκλοφορία, συναντάται μεταξύ της πεπτικής οδού και του σπλήνα και λαμβάνει αίμα από όλα τα κοιλιακά όργανα μέσω της πυλαίας φλέβας. Επίσης λαμβάνει πλούσιο σε οξυγόνο αίμα από την ηπατική αρτηρία, έχοντας έτσι πρόσβαση στη συστηματική κυκλοφορία [1]. Το αίμα στο ήπαρ διαχέεται από την κεντρική κυκλοφορία στο δίκτυο των κολποειδών τριχοειδών αγγείων, τα οποία περιπλέκονται ανάμεσα από τα ηπατοκύτταρα (3). Παίρνει μέρος σε έναν απίστευτο αριθμό διεργασιών που συμπεριλαμβάνουν την αποθήκευση γλυκογόνου, την αποικοδόμηση των ερυθροκυττάρων, την σύνθεση πρωτεϊνών του πλάσματος, ενζύμων, συμπαραγόντων και την αποτοξίνωση ουσιών. Συμβάλει επίσης στην πέψη με την έκκριση της χολής από την χοληδόχο κύστη. Τέλος το ήπαρ αποτελεί και ένα βασικό όργανο της ανοσίας, αφού ο τεράστιος όγκος αίματος που κυλά στις επιφάνειες των αγγείων του το καθιστά ιδανικό όργανο για φαγοκύτωση υλικών της κυκλοφορίας που μπορεί να περιλαμβάνουν και ξένα μακρομόρια και μικροοργανισμούς όπως βακτήρια [1], (1). Αποτέλεσμα των πολλαπλών λειτουργιών του ήπατος είναι, ότι οι ηπατικές ασθένειες έχουν επιπτώσεις σε όλα τα συστήματα οργάνων (2).



Εικόνα 2:
Γενεαλογικό δέντρο όπου εμφανίζονται επιλεγμένα φύλα και είδη
προσδιορίζοντας την εξέλιξη του πεπτικού συστήματος και του ήπατος.

Πηγή: [3]

1.1. ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ

Φυλογενετικά το ήπαρ είναι ένα ιδιαίτερα παλιό όργανο (**Εικόνα 2**). Σε μια πρωτόγονη μορφή του εμφανίζεται για πρώτη φορά στα Κνιδάρια, ένα θαλάσσιο φύλο που περιέχει περίπου 11.000 είδη (π.χ. Κοράλλια, θαλάσσιες Ανεμώνες) και φαίνεται να υπάρχει εδώ και 540-580 εκατομμύρια χρόνια. Σε αυτά το ήπαρ εμφανίζεται ως μια πάχυνση του ενδοδέρματος και εξυπηρετεί ορισμένες μεταβολικές και αποθηκευτικές λειτουργίες [2].

Το ήπαρ αναπτύχθηκε σε ένα μορφολογικά αναγνωρίσιμο όργανο -που συνηθίζεται να αναφέρεται ως μεσεντέριος αδένας (midgut gland) από τη δεκαετία του 60 [3]-όταν τα θαλάσσια ζώα εξελίχθηκαν σε ζώα της στεριάς. Η έλλειψη του θαλάσσιου περιβάλλοντος, που διευκολύνει κάθε είδους ανταλλαγή (π.χ. ουσιών, ενέργειας), έκανε την διατήρηση της ομοιόστασης ένα πρόβλημα προς επίλυση, τον μεταβολισμό ουσιών αναγκαίο, και το σύστημα ανοσιακής απάντησης πιο εξελιγμένο [2].

Είναι γενικότερα αποδεκτό από τους συγκριτικούς βιολόγους, ότι το ήπαρ ως ένα κεντρικό όργανο της ομοιόστασης, συναντάται μόνο στα σπονδυλωτά και εμφανίζει περιορισμένη ομολογία με τους μεσεντέριους αδένες των ασπόνδυλων [3].

Ένα ενδιαφέρον στοιχείο για την κατανόηση της κοινής καταγωγής του ήπατος, είναι ότι στα τελεόστεα ψάρια, το όργανο που αντιστοιχεί στο ήπαρ περιλαμβάνει και το πάγκρεας. Ενώ στα ανώτερα σπονδυλωτά που το ήπαρ και το πάγκρεας είναι πλέον ξεχωριστά όργανα με κοινή εμβρυϊκή καταγωγή, έχει αποδειχθεί ότι υπό κατάλληλες συνθήκες, το ήπαρ έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει παγκρεατικό ιστό [4] και το πάγκρεας να δίνει γένεση σε ηπατοκύτταρα [2].

1.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Κατά την εμβρυονική περίοδο, ο λεκιθικός σάκος εκπληρώνει πολλές διατροφικές και μεταβολικές διεργασίες, διαδραματίζοντας ουσιαστικά το ρόλο του ανύπαρκτου ακόμα ήπατος. Μετά τον σχηματισμό του εμβρύου, παρατηρείται η ταχεία δημιουργία του ήπατος, το οποίο άμεσα αναπτύσσεται σε ένα από τα μεγαλύτερα όργανα του εμβρύου, αναλαμβάνοντας τον κύριο όγκο των μεταβολικών απαι-

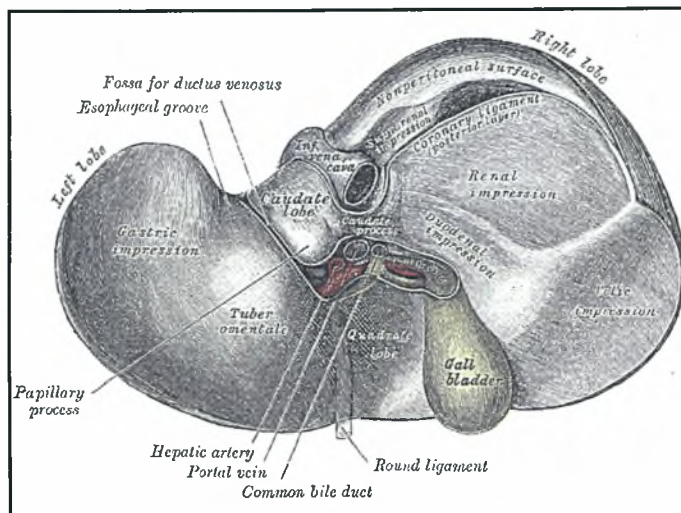
τήσεων, υποκαθιστώντας έτσι τον ρόλο του λεκιθικού σάκου, γι αυτό τον λόγο σε όλα τα σπονδυλωτά το ήπαρ αναπτύσσεται σε στενή σχέση με τον λεκιθικό σάκο [2,1].

Η ανάπτυξη του ήπατος στο άνω υπογάστριο αρχίζει κατά τη 18^η μέρα της κυοφορίας και συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης. Η δομική και λειτουργική ωρίμανση του οργάνου όμως συνεχίζεται και μετά τη γέννηση μέχρι και την ηλικία των 15 ετών. Το εναρκτήριο γεγονός για τον σχηματισμό του ήπατος είναι η δημιουργία στο ενδόδεσμα της ηπατικής εγκόλπωσης, η οποία αρχίζει να αναπτύσσεται προς το εγκάρσιο διάφραγμα που διαχωρίζει την περικαρδική από την περιτοναϊκή κοιλότητα. Σε μικροσκοπικό επίπεδο κατά την τέταρτη εβδομάδα της κύησης, ομάδες επιθηλιακών βλαστικών κυττάρων, οι ηπατοβλάστες εκτείνονται πέρα από την ηπατική εγκόλπωση και αρχίζουν να σχηματίζουν μια πρώτη μορφή του δικτύου αγγείων του ήπατος [1]. Οι ηπατοβλάστες μπορούν να αναγνωριστούν από την έκφραση συγκεκριμένων μορίων όπως η α-φετοπρωτεΐνη, η κυτοκερατίνη-18 και η αλβουμίνη τα οποία όπως έχει αποδειχθεί και σε *in vitro* μελέτες εκφράζονται σε βλαστικά κύτταρα που σχετίζονται με ηπατική λειτουργία [2, 5, 6]. Η ανάπτυξη του φλεβικού συστήματος του οργάνου γίνεται εμφανής κατά την 7^η εβδομάδα της κύησης με τον σχηματισμό της πυλαίας φλέβας, ενώ η ανάπτυξη του δικτύου των αρτηριών και των χοληφόρων πόρων ακολουθεί παράλληλη πορεία.

1.3. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΗΠΑΤΟΣ

Η κλασική ανατομία διαχωρίζει το ήπαρ σε δυο κύριους λοβούς, τον δεξιό και τον μικρότερο αριστερό και δύο επικουρικούς λοβούς, τον τετράπλευρο και τον κερκοφόρο οι οποίοι ανήκουν ανατομικά στον δεξιό λοβό (Εικόνα 3). Αντίθετα όμως με την τυπολογική αυτή ταξινόμηση του ήπατος, οι σημερινοί ηπατοχειρουργοί δίνουν μεγαλύτερη σημασία στην λειτουργική ανατομία του οργάνου όπως αυτή μελετήθηκε από τον *Francis Glisson* το 1654. Σύμφωνα με αυτή το ήπαρ διαιρείται σε τομείς με ανεξάρτητη προσαγωγό και απαγωγό κυκλοφορία αίματος, οι οποίοι αριθμούνται όπως περιγράφηκε από τον *Couinaud* από το II έως το VIII. Σε αντιστοιχία των τομέων με τους λοβούς, ο κερκοφόρος λοβός αποτελεί τον τομέα I, ο τετράπλευρος τον IV, ο αριστερός τους II και III και ο δεξιός τους V,VI,VII,VIII (Εικόνα 4) [1, 2]. Στην πύλη του ήπατος, που βρίσκεται στην κάτω επιφάνεια του οργάνου, διακρίνου-

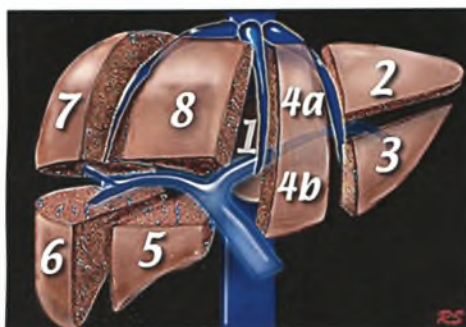
με, την πυλαία φλέβα, που αποσχίζεται σε δεξιό και αριστερό κλάδο, την ηπατική αρτηρία, που επίσης αποσχίζεται σε δεξιό και αριστερό κλάδο και τον κοινό ηπατικό πόρο, μέσω του οποίου διέρχεται η χολή. Ο κοινός ηπατικός πόρος, προέρχεται από τη συνένωση του αριστερού και του δεξιού ηπατικού πόρου, οι οποίοι συλλέγουν τη χολή από τους αντίστοιχους



Εικόνα 3:

Η κάτω επιφάνεια του ήπατος όπου μπορούμε να διακρίνουμε τους τέσσερις λοβούς του. Αριστερός (Left), Κερκοφόρος (Caudate), Τετράπλευρος (Quadrate), Δεξιός (Right). Επίσης διακρίνεται και η πυλαία τριάδα (Hepatic artery, Portal vein, Common bile duct).

Πηγή: Henry Gray's Anatomy of the Human Body (1918)



Εικόνα 4:

Ο διαχωρισμός του ήπατος σε τομείς (1-8) σύμφωνα με τον Couinaud.

Πηγή:

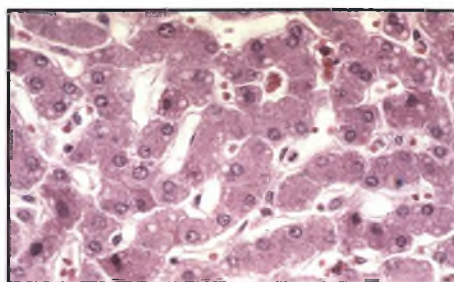
<http://www.radiologyassistant.nl/en/4375bb8dc241d>

λοβούς του ήπατος. Τα τρία αυτά ανατομικά στοιχεία, δηλαδή η πυλαία φλέβα, η ηπατική αρτηρία και ο κοινός ηπατικός πόρος, χαρακτηρίζονται ως πυλαία τριάδα (Εικόνα 3) και διακλαδίζονται παράλληλα, ως το επίπεδο των κολποειδών τριχοειδών. Εξωτερικά το ήπαρ καλύπτεται από την ινώδη κάψα του Glisson η οποία συντήκεται με τον συνδετικό ιστό της πυλαίας τριάδας στην κάτω επιφάνεια του οργάνου [1].

1.3.1 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Μετά τη γέννηση, τα κύτταρα του ηπατικού παρεγχύματος είναι οργανωμένα σε πλάκες πάχους δύο κυττάρων, οι οποίες μετά την ηλικία των πέντε ετών αποκτούν πάχος μόλις ενός κυττάρου, γεγονός που διευκολύνει την επαφή μεταξύ του αίματος και των ηπατοκυττάρων [2], (4). Το σύνολο των παραπάνω τοιχωμάτων

δημιουργεί ένα σπογκοειδές δίκτυο ηπατοκυτταρικών πλακών (muralium simplex), που ενώνονται με διαφορετικές γωνίες και περικλείουν τα κολποειδή τριχοειδή αγγεία (Εικόνα 5).



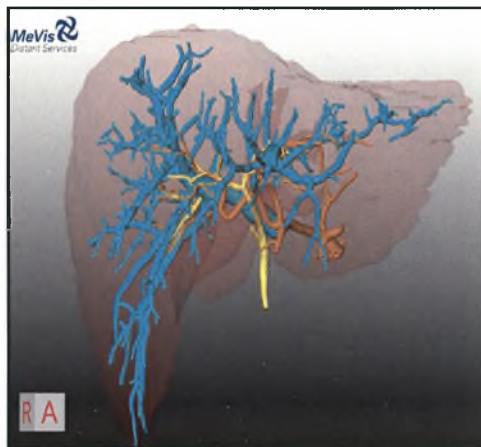
Εικόνα 5: Οι ηπατοκυτταρικές πλάκες πάχους ενός κυττάρου (muralium simplex) όπως φαίνονται από το οπτικό μικροσκόπιο. Ανάμεσα στα ηπατοκύτταρα διακρίνονται τα κολποειδή τριχοειδή αγγεία.

Πηγή: (4)

1.3.2 ΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

1.3.2.A. ΠΥΛΑΙΟ ΦΛΕΒΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

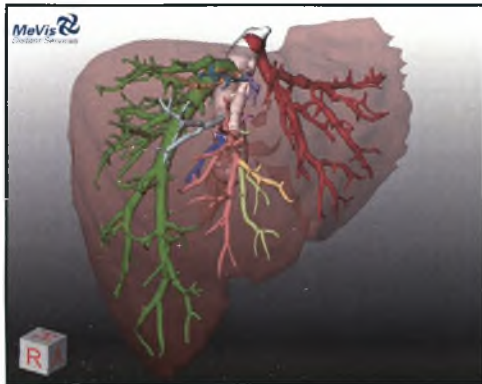
Η πυλαία φλέβα η οποία είναι υπεύθυνη για την προσαγωγή του αίματος στο ήπαρ, είναι υπεύθυνη για το 70% της αιμάτωσης του οργάνου. Σχηματίζεται πίσω από το πάγκρεας από τη συμβολή της μεσεντέριας φλέβας και της σπληνικής φλέβας, λαμβάνοντας έτσι όλο το αίμα της πεπτικής κυκλοφορίας, του σπλήνα, του παγκρέατος και της χοληδόχου κύστης. Στην πύλη του ήπατος η πυλαία φλέβα διαιρείται σε δεξιό και αριστερό κλάδο, με τον δεξιό να είναι κοντότερος και μικρότερος από τον αριστερό (Εικόνα 6). Στο εσωτερικό του ήπατος το φλεβικό σύστημα έχει δύο ξεχωριστές λειτουργίες, η μία είναι η μεταφορά του αίματος σε όλα τα σημεία του οργάνου και η άλλη η διανομή του στα ηπατοκύτταρα μέσω του δικτύου των κολποειδών τριχοειδών αγγείων [1, 2] (1, 3, 5).



Εικόνα 6: Το πυλαίο φλεβικό σύστημα (γαλάζιο), το ηπατικό αρτηριακό σύστημα (πορτοκαλί) και το χολικό σύστημα του ήπατος (κίτρινο), όπως φαίνονται στον υπολογιστή. Η αναπαράσταση έχει γίνει με δεδομένα από αξονικές τομογραφίες.

Πηγή: <http://www.mevis-distant-services.com/index.php?id=23>

1.3.2.B. ΗΠΑΤΙΚΟ ΦΛΕΒΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ



Εικόνα 7:

Το σύστημα άρδευσης του αίματος από το ήπαρ που καταλήγει στην κάτω κοίλη φλέβα όπως φαίνεται στον υπολογιστή. Η αναπαράσταση έχει γίνει με δεδομένα από αξονικές τομογραφίες.

Πηγή: <http://www.mevis-distant-services.com/index.php?id=23>

Η αποστράγγιση του αίματος από το ήπαρ πραγματοποιείται μέσω των κολποειδών τριχοειδών, που ενώνονται σε τερματικές ηπατικές φλέβες. Αυτές με τη σειρά τους ενώνονται σε μεγαλύτερες, που καταλήγουν στο σχηματισμό των τριών ηπατικών φλεβών. Μετά από σύντομη εξωηπατική πορεία, ενώνονται με την κάτω κοίλη φλέβα οδηγώντας το αίμα στην καρδιά (Εικόνα 7) [1, 2] (1, 3, 5).

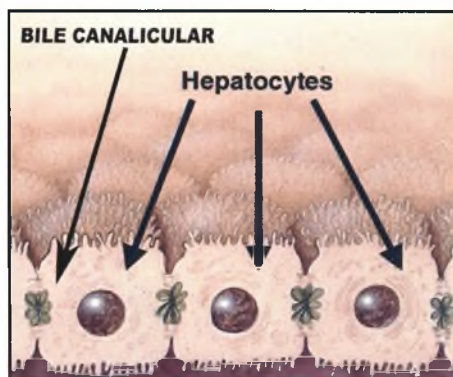
1.3.2.Γ. ΗΠΑΤΙΚΟ ΑΡΤΗΡΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το υπόλοιπο 30% της αιμάτωσης του ήπατος προέρχεται από την ηπατική αρτηρία, η οποία έρχεται από το επάνω μέρος του παγκρέατος, ανεβαίνει μπροστά από την πυλαία φλέβα, και φθάνει στην πύλη του ήπατος. Εκεί διακλαδίζεται στην δεξιά και αριστερή ηπατική αρτηρία ενώ, η κεντρική ηπατική αρτηρία η οποία προέρχεται, είτε από την αριστερή, είτε από τη δεξιά αιματώνει το τετράπλευρο λοβό (Εικόνα 6). Οι αρτηρίες προχωρούν μέσα στο όργανο παράλληλα με τις φλέβες και καταλήγουν σε κολποειδή τριχοειδή [1, 2] (1, 3, 5).

1.3.3. ΧΟΛΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το χολικό σύστημα είναι μια σειρά από κανάλια και πόρους, που έχουν ως λειτουργία τη συλλογή της χολής από το ήπαρ, τη μεταφορά της στη χοληδόχο κύστη και από εκεί την απελευθέρωσή της στο λεπτό έντερο. Αρχικά οι κυτταρικές μεμβράνες των ηπατοκυττάρων που εφάπτονται πλευρικά, δημιουργούν ανάμεσα τους τα χολικά σωληνοειδή, (πτυχώσεις των γειτονικών μεμβρανών που δημιουργούν

ένα είδος αγωγού), στα οποία εκκρίνονται τα συστατικά της χολής, που παράγονται από τα ηπατοκύτταρα (Εικόνα 8). Τα χολικά σωληνοειδή διατρέχουν το ήπαρ παράλληλα με τα κολποειδή τριχοειδή και η χολή ρέει μέσα τους με φορά αντίθετη από αυτή του αίματος. Τα χολικά σωληνοειδή συγκεντρώνονται, για να σχηματίσουν τα χολικά σωληνάκια ή κανάλια του Hering και αυτά με τη σειρά τους αθροίζονται στους χολικούς πόρους, που καταλήγουν στον αριστερό και δεξιό ηπατικό πόρο και στη συνέχεια στον κοινό ηπατικό πόρο, ο οποίος οδηγεί τη χολή στη χοληδόχο κύστη. Η χοληδόχος κύστη, φιλοξενείται στην κάτω επιφάνεια του ήπατος, είναι όργανο σε σχήμα αχλαδιού, το οποίο ανατομικά χωρίζεται σε πυθμένα, σώμα και αυχένα. Συνέχεια του αυχένα αποτελεί ο κυστικός πόρος, ο οποίος ενώνεται με τον κοινό ηπατικό πόρο, για να σχηματιστεί ο χοληδόχος πόρος (Εικόνα 9). Αυτός εκβάλλει στον αυλό του δωδεκαδακτύλου σε μια περιοχή που χαρακτηρίζεται ως λήκυθος του Vater [1], (2, 3).



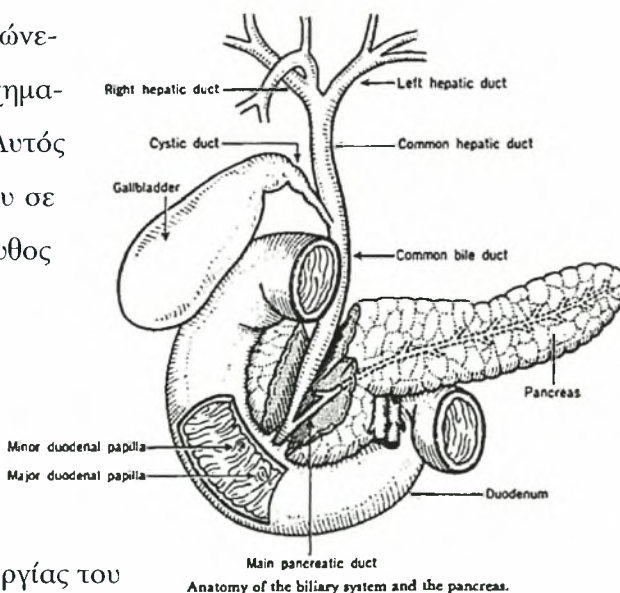
Εικόνα 8:

Τα χολικά σωληνοειδή (bile canaliculi) όπως σχηματίζονται μεταξύ των γειτονικών ηπατοκυττάρων.

Πηγή: Scott L. Friedman THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 275, No. 4, Issue of January 28, pp. 2247–2250, 2000 Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury

1.3.4. ΛΕΜΦΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί λειτουργίας του ηπατικού λεμφικού συστήματος δεν είναι γνωστοί, είναι γενικά αποδεκτό, ότι η λέμφος σχηματίζεται με το φιλτράρισμα του πλάσματος, μέσα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα στον χώρο του Disse (δηλαδή του χώρου μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων των κολ-



Εικόνα 9:

Το σύστημα των χολικών πόρων. Διακρίνουμε, δεξιό και αριστερό ηπατικό πόρο (left, right hepatic duct), κοινό ηπατικό πόρο (common hepatic duct), κυστικό πόρο (cystic duct) και χοληδόχο κύστη (gallbladder).

Πηγή: (5)

ποειδών τριχοειδών αγγείων και των ηπατοκυττάρων). Μια άλλη θεωρία βέβαια προτείνει, ότι ίνες κολλαγόνου μεταξύ των αγγείων και του χώρου του Disse, συνιστούν ένα μικροσκοπικό κανάλι για την κυκλοφορία της λέμφου. Στη συνέχεια η λέμφος περνάει στα λεμφαγγεία, μέσα από τα οποία κυκλοφορεί γύρω από τις ηπατικές αρτηρίες, τις φλέβες, καθώς και τους χολικούς πόρους [1].

1.3.5. ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το ανθρώπινο ήπαρ λαμβάνει τόσο συμπαθητικές, όσο και παρασυμπαθητικές νευρικές ίνες, οι πρώτες προέρχονται από το πνευμονογαστρικό νεύρο, ενώ οι δεύτερες από το κοιλιακό γάγγλιο. Οι συμπαθητικές νευρικές ίνες, δημιουργούν ένα πλούσιο δίκτυο γύρω από αιμοφόρα αγγεία και τα ακολουθούν μέχρι να καταλήξουν στα κολποειδή τριχοειδή αγγεία, τα ηπατοκύτταρα και τα ηπατικά αστροκύτταρα. Οι παρασυμπαθητικές νευρικές ίνες, νευρώνουν έξω- και ενδοηπατικούς κλάδους της ηπατικής αρτηρίας, της πυλαίας φλέβας και της ηπατικής φλέβας. Τα δύο είδη νευρικών ινών, λειτουργούν επηρεάζοντας την ηπατική μεταβολική δραστηριότητα. Η διέγερση του πνευμονογαστρικού νεύρου, προωθεί την μετατροπή γλυκόζης σε γλυκογόνο και αυξάνει την δραστικότητα της τρανσαμινάσης της τυροσίνης. Διέγερση του αδρενεργικού συστήματος, προωθεί την γλυκογονόλυση και τη γλυκονογένεση αυξάνοντας έτσι την συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Όλες οι παραπάνω λειτουργίες που επιτελούνται από τους νευρώνες στο ήπαρ, θα ήταν καλό να αναφερθεί ότι λαμβάνουν χώρα μόνο υπό καταστάσεις stress, ενώ φυσιολογικά οι λειτουργίες του ήπατος ρυθμίζονται από κυκλοφορούσες ορμόνες [1].

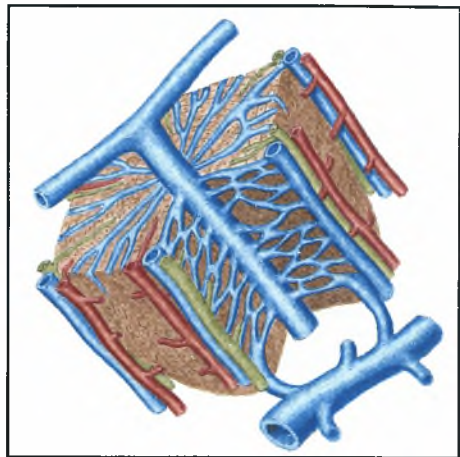
1.3.6. ΔΟΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

Σε αντίθεση με τον νεφρώνα, που εμφανίζεται ως η βασική δομική και λειτουργική μονάδα οργάνωσης του νεφρού, έχοντας την δυνατότητα να λειτουργεί αυτόνομα, το ήπαρ στερείται μιας τέτοιας σαφώς διακριτής διαμόρφωσης. Το βασικό στοιχείο που χαρακτηρίζει την απουσία της καθορισμένης δομικής μονάδας στο

ήπαρ, είναι η έλλειψη μιας μεμβράνης συνδετικού ιστού που να αποτελεί το όριο της. Τέτοιες δομές έχουν βρεθεί στον ηπατικό ιστό ορισμένων μόνο ζώων, όπως ο χοίρος, οι πολικές αρκούδες και τα ρακούν [1, 2].

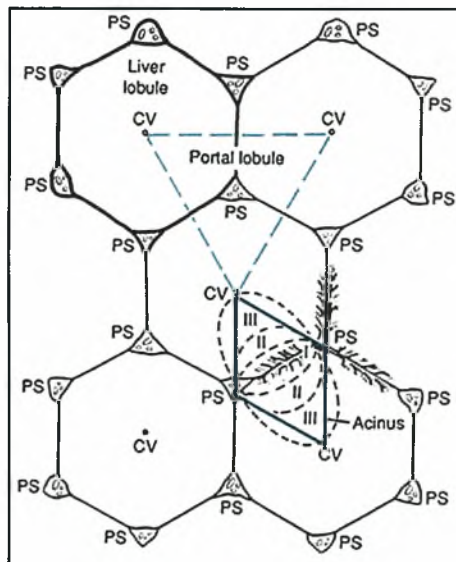
Ο *Kiernan* βασιζόμενος σε μελέτες που έγιναν σε χοίρους, περιέγραψε πρώτος το κλασικό ηπατικό λοβίο (Εικόνα 10), ως μια μονάδα του ήπατος με κατά προσέγγιση εξαγωνικό σχήμα. Στις γωνίες του εξαγώνου βρίσκονται οι λεγόμενες πυλαίες περιοχές, που περιλαμβάνουν πυλαίες τριάδες αποτελούμενες από διακλαδώσεις της πυλαίας φλέβας, της ηπατικής αρτηρίας και των χολικών πόρων. Στο κέντρο του εξαγώνου, εντοπίζεται ένας κλάδος ηπατικής φλέβας και από εκεί βρίσκεται ακτινωτά τοποθετημένα τα ηπατοκύτταρα σε στοιβάδες από πλάκες πάχους ενός κυττάρου, οι οποίες εκτείνονται προς την περιφέρεια του εξαγώνου. Η συνέχεια των κυτταρικών πλακών διακόπτεται από ένα σύστημα κολποειδών τριχοειδών. Στα περισσότερα ζώα βέβαια τα όρια του εξαγώνου δεν είναι εύκολα διακριτά [1,2], (1, 5, 6).

Αργότερα ο *Mall* πρότεινε μια διαφορετική μορφή οργάνωσης την οποία ονόμασε «πυλαίο» λοβίο (Εικόνα 11). Πρόκειται για μια τριγωνική διάταξη που δίνει έμφαση στις εξωκρινείς λειτουργίες του ήπατος και ιδιαίτερα στην έκκριση της χολής. Κέντρο της συγκεκριμένης διάταξης αποτελεί η πυλαία τριάδα ενώ στις γωνίες της, εντοπίζονται κλάδοι των ηπατικών φλεβών. Τα εξωτερικά όρια αυτής της διάταξης δεν είναι υπαρκτά, αλλά υποθετικά [1,2], (1, 5, 6).



Εικόνα 10:
Το κλασικό ηπατικό λοβίο. Παρατηρούμε στις γωνίες του εξαγώνου τις διακλαδώσεις της πυλαίας φλέβας της ηπατικής αρτηρίας και των χολικών πόρων ενώ στο κέντρο της δομής συναντούμε τη διακλάδωση της ηπατικής φλέβας.

Πηγή: <http://www.dkimages.com>



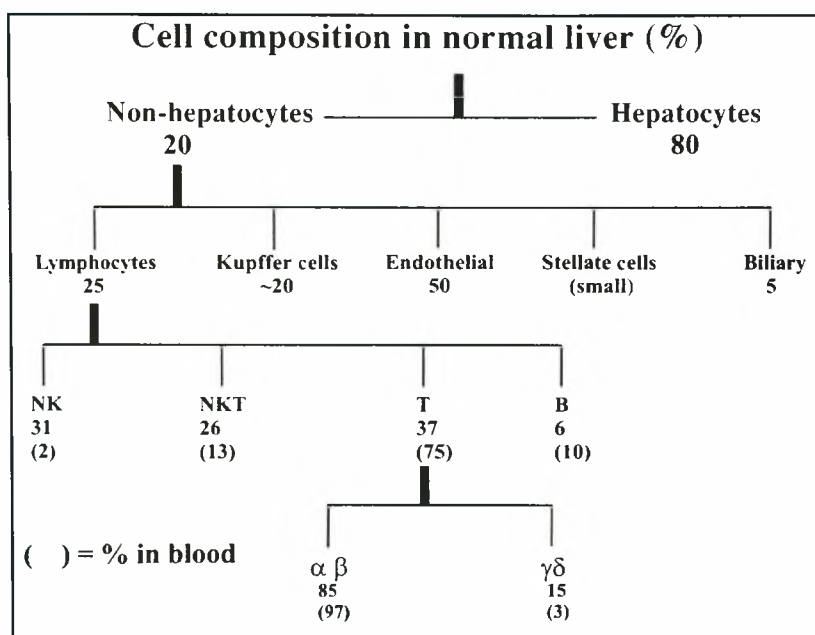
Εικόνα 11:
Οι τρεις διαφορετικές βασικές διαμορφώσεις στο ήπαρ. Ηπατικό λοβίο (liver lobule), πυλαίο λοβίο (portal lobule) και άκινος (acinus)

Πηγή: (7)

Μια τρίτη βασική δομή του ήπατος, προτάθηκε από τον *Rappaport* και ονομάστηκε άκινος (acinus) (Εικόνα II). Η δομή αυτή εμφανίζει ένα ρομβοειδές σχήμα, που στα άκρα της μικρής διαγωνίου της εντοπίζονται πυλαίες τριάδες, ενώ στα άκρα της μεγάλης διαγωνίου εμφανίζονται κλάδοι ηπατικών φλεβών. Η μικρή διαγώνιος, βρίσκεται στα όρια μεταξύ δυο κλασικών λοβίων και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη κατά μήκος της του συστήματος διακλαδώσεων της πυλαίας τριάδας. Σε αντίθεση με το μοντέλο του κλασικού ηπατικού λοβίου, το συγκεκριμένο έχει ως κέντρο του το σύστημα παροχής αίματος στο ηπατικό παρέγχυμα (πυλαίο και αρτηριακό) και όχι το φλεβικό σύστημα άρδευσης. Τα κύτταρα της περιοχής που καλύπτει αυτή η μονάδα, οργανώνονται σε τρεις ομόκεντρες ελλειπτικές ζώνες γύρω από την μικρή διαγώνιο, χωρίς να υπάρχουν ακριβή όρια μεταξύ τους [1,2], (1, 5, 6). Τα κύτταρα της πρώτης ζώνης είναι τα πιο κοντινά στους κλάδους των φλεβών και αρτηριών, που φέρουν αίμα στο ήπαρ και γίνονται έτσι τα πρώτα, που λαμβάνουν θρεπτικά αλλά και τοξίνες από το αίμα. Αυτά τα κύτταρα κυρίως, αναλαμβάνουν την αποθήκευση της γλυκόζης με τη μορφή γλυκογόνου μετά από ένα γεύμα. Είναι επίσης τα πρώτα που εμφανίζουν μορφολογικές αλλαγές, μετά από απόφραξη των χοληφόρων πόρων. Τα κύτταρα της τρίτης ζώνης, είναι τα πιο απομακρυσμένα από το σύστημα διανομής του αίματος και τα πλησιέστερα στην κεντρική φλέβα. Είναι τα πρώτα που εμφανίζουν ισχαιμική νέκρωση και συσσώρευση λίπους, ενώ είναι τα τελευταία που αποκρίνονται σε τοξικές ουσίες και χολεόσταση. Τα κύτταρα στη δεύτερη ζώνη εμφανίζουν μια ενδιάμεση λειτουργική και μορφολογική κατάσταση μεταξύ των δύο προαναφερθέντων τύπων.

1.4. ΚΥΡΙΟΙ ΗΠΑΤΙΚΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ

Η συνολική κυτταρική μάζα του ήπατος αποτελείται κατά 80% από ηπατοκύτταρα, ενώ το υπόλοιπο 20% των μη ηπατοκυττάρων αποτελείται ξεχωριστά από: κολποειδή ενδοθηλιακά (sinusoidal endothelial cells) κύτταρα (50%), κυκλοφορούντα φαγοκύτταρα (~20%) και κύτταρα Kupffer που κατοικούν μόνιμα στο ήπαρ και στα κολποειδή τριχοειδή, επιθηλιακά κύτταρα των χολικών πόρων (Biliary cells) (5%) και λεμφοκύτταρα (25%). Τέλος στους μη ηπατοκυτταρικούς πληθυσμούς του



Εικόνα 12:
 Η ποσοστιαία αναλογία των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών του ήπατος.

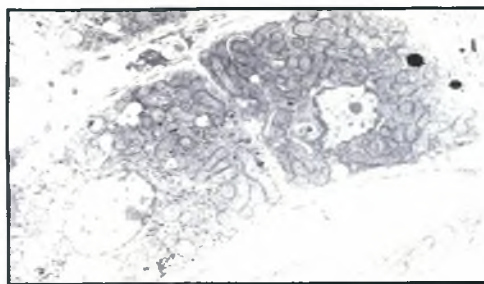
Πηγή: [7]

ήπατος, συναντάμε και ένα μικρό ποσοστό (~1%) κυττάρων που ονομάζονται ηπατικά αστροκύτταρα (Stellate cells ή Ito cells), (Εικόνα 12) [7].

1.4.1. ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΑ

Το ηπατοκύτταρο, αποτελεί ένα από τα πιο πολυσύνθετα και μεταβολικά ενεργά κύτταρα του σώματος. Εκτελεί πλήθος διεργασιών απαραίτητων για τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού, όπως: η διαχείριση και η διανομή των θρεπτικών ουσιών, η σύνθεση των πρωτεϊνών του πλάσματος, καθώς και άλλων σημαντικών μορίων όπως η γλυκόζη, η πέψη και απορρόφηση των λιπαρών της διατροφής καθώς και η αποτοξίνωση διαφόρων πιθανώς επιβλαβών ουσιών, που εισέρχονται από την πέψη στην κυκλοφορία του αίματος [1, 2].

Τα παραπάνω στοιχεία δικαιολογούν την ύπαρξη στο κυτταρόπλασμα μιας μεγάλης ποσότητας μιτοχονδρίων που συμβάλουν στην παραγωγή ενέργειας, ενός εκτενούς αδρού και λείου ενδοπλασματικού δικτύου υπεύθυνου για την σύνθεση και μεταφορά ενός σημαντικού όγκου πρωτεϊνών, καθώς και ενός πλούσιου συστήματος Golgi, που σε συνεργασία με το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, ελέγχει την μεταφορά ουσιών προς τα χολικά σωληνοειδή, για απέκκριση με τη χολή. Δεν είναι λοιπόν τυχαίο το γεγονός, ότι κάτω από το μικροσκόπιο, το ηπατοκύτταρο είναι ένα από τα

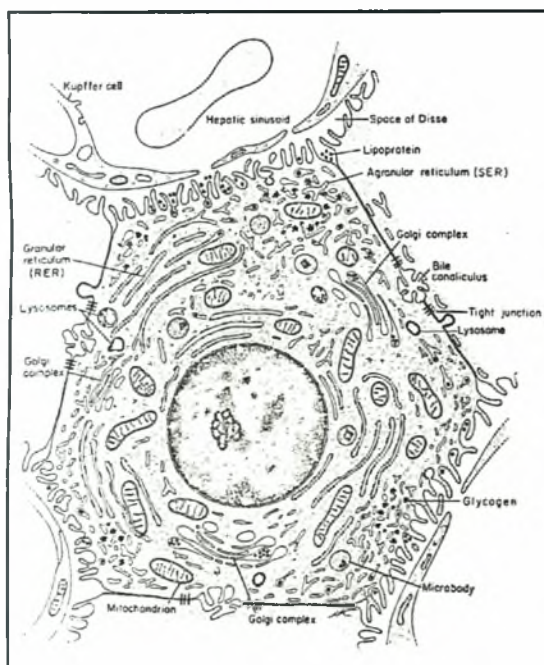


Εικόνα 13:
Δύο γειτονικά ηπατοκύτταρα κάτω από το μικροσκόπιο. Διακρίνεται το μέγεθος των πυρήνων τους και ο μεγάλος αριθμός μιτοχονδρίων που περιέχουν.

Πηγή: (4)

Το 25% των ηπατοκυττάρων του οργανισμού είναι διπύρρηνα, ενώ περίπου το 15% εμφανίζει τετραπλοειδία [1].

Κάθε πλευρά του ηπατοκυττάρου, μπορεί να βρίσκεται σε άμεση επαφή με γειτονικά ηπατοκύτταρα, χολικά σωληνοειδή ή τον χώρο του Disse (ο εξωκυττάριος



Εικόνα 14:
Το ηπατοκύτταρο. Παρατηρούμε την έντονη κοκκίωση του καθώς και την διαφορά στη δομή μεταξύ του βασεοπλευρικού πόλου και του χολικού πόλου της μεμβράνης.

Πηγή: (5)

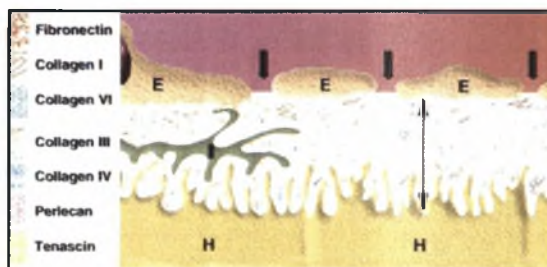
πιο κοκκιώδη κύτταρα που υπάρχουν στον ανθρώπινο οργανισμό (Εικόνα 13).

Η δομή του ηπατοκυττάρου κάτω από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, εμφανίζεται σαν ένα πολυέδρο, με έξι ή και περισσότερες πλευρές, που παρουσιάζει τόσο μορφολογική όσο και λειτουργική διαφοροποίηση. Το μέγεθός του κυμαίνεται από 20-30μm, ενώ ο πυρήνας αποτελεί το 5-10% του συνολικού όγκου του κυττάρου. Έχει σφαιρικό σχήμα και μπορεί να περιέχει έναν ή περισ-

σότερους πυρήνισκους. Το 25% των ηπατοκυττάρων του οργανισμού είναι διπύρρηνα, ενώ περίπου το 15% εμφανίζει τετραπλοειδία [1]. Κάθε πλευρά του ηπατοκυττάρου, μπορεί να βρίσκεται σε άμεση επαφή με γειτονικά ηπατοκύτταρα, χολικά σωληνοειδή ή τον χώρο του Disse (ο εξωκυττάριος χώρος που σχηματίζεται ανάμεσα στο ηπατοκύτταρο και το κολποειδές τριχοειδές αγγείο). Το τμήμα της μεμβράνης που συνορεύει με τα κολποειδή τριχοειδή, αποτελεί τον βασεοπλευρικό πόλο, ενώ αυτό που έρχεται σε επαφή με γειτονικά ηπατοκύτταρα, καθώς και με χολικά σωληνοειδή, οριοθετεί τον χολικό πόλο (Εικόνα 14). Αυτή η μορφολογική διμορφία του ηπατοκυττάρου, εξυπηρετεί τη λειτουργική του ετερογένεια, αφού του επιτρέπει ταυτόχρονα να εκκρίνει χολή στα χολικά σωληνοειδή, να απορροφά συστατικά που φιλτράρονται μαζί με το πλάσμα στον χώρο του Disse, να εκκρίνει πρωτεΐνες και άλλα συστατικά που συνθέτει στα κολποειδή τριχοειδή και από εκεί στην κυκλοφορία και τέλος να επικοινωνεί με γειτονικά ηπατοκύτταρα [1, 2], (5).

1.4.2. Ο ΧΩΡΟΣ ΤΟΥ DISSE

Ο εξωκυττάριος χώρος, που βρίσκεται μεταξύ της βασεοπλευρικής μεμβράνης των ηπατοκυττάρων και των κολποειδών τριχοειδών αγγείων, αποτελεί το 2-4% του ηπατικού παρεγχύματος και ονομάζεται χώρος του Disse προς τιμήν του γερμανού ανατόμου *Joseph Disse* [8, 9]. Παίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της κανονικής λειτουργίας του οργάνου, παρέχοντας δομική καθώς και λειτουργική σταθερότητα. Μέσα στα όρια του μπορούμε να συναντήσουμε ηπατικά αστροκύτταρα, καθώς και ένα συνεχές δίκτυο από μικρολάχνες (προεκβολές) των ηπατοκυττάρων, οι οποίες εκτείνονται μέσα στο χώρο του Disse, αυξάνοντας κατά πολύ την επιφάνεια τους και βοηθώντας την ανταλλαγή ουσιών από και προς αυτά. Αναφορικά τα συστατικά που τον απαρτίζουν είναι κολλαγόνα (τύπου I, II), που σχηματίζουν το ινώδες πλέγμα του ήπατος, κολλαγόνο τύπου IV και σε μεγάλες ποσότητες φιβρονεκτίνη που δημιουργεί περίβλημα γύρω από τις ίνες κολλαγόνου και αλληλεπιδρά με τα κύτταρα καθώς και με ένα πλήθος μορίων (Εικόνα 15) [8].



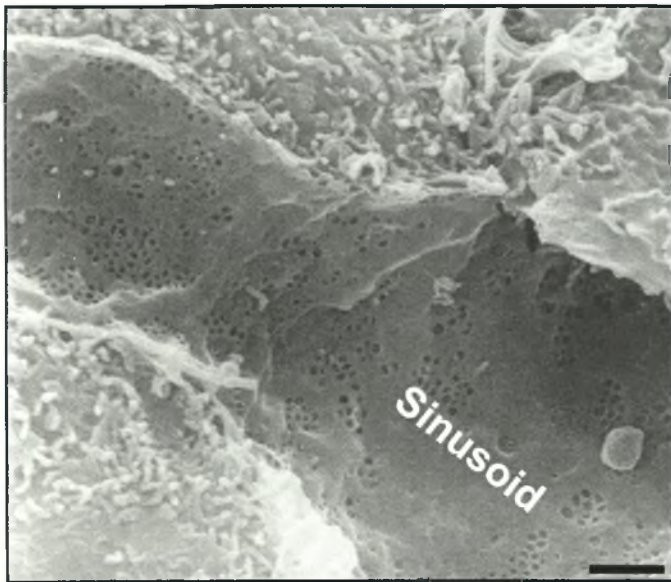
Εικόνα 15:

Ο χώρος του Disse. Με ξεχωριστούς χρωματισμούς επισημαίνονται οι διάφοροι τύποι των ινών κολλαγόνου και τα υπόλοιπα συστατικά του εξωκυττάρου χώρου. Με Η είναι σημειωμένα τα ηπατοκύτταρα, με Ε τα ενδοθηλιακά κύτταρα και με Ι τα ηπατικά αστροκύτταρα.

Πηγή: [9]

1.4.3. ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΚΟΛΠΟΕΙΔΩΝ ΤΡΙΧΟΕΙΔΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ

Τα μικρά αγγεία που βρίσκονται μεταξύ της αρτηριακής και της φλεβικής κυκλοφορίας και τις συνδέουν, ονομάζονται τριχοειδή. Το τοίχωμα των τριχοειδών αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα και μια βασική μεμβράνη. Ανάλογα με τον τύπο κυττάρων και μεμβράνης, τα τριχοειδή χαρακτηρίζονται ως, συνεχή, διάτρητα και ασυνεχή ή κολποειδή.



Εικόνα 16:

Το κολποειδές τριχοειδές αγγείο (sinusoid) όπως φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Εμφανείς είναι οι πολυάριθμες οπές (fenestrae).

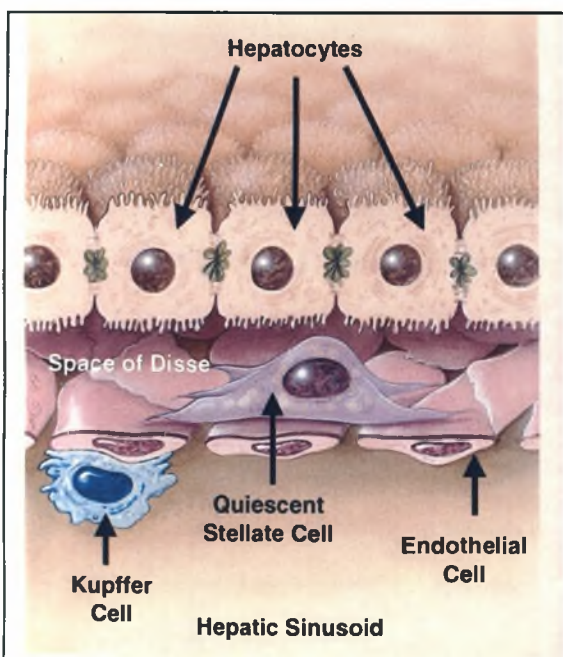
Πηγή: [10]

Στην τρίτη κατηγορία ανήκουν τα κολποειδή τριχοειδή του ήπατος (**Εικόνα 16**), τα οποία χαρακτηρίζονται, από

μεγάλες οπές (150-170nm) της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών τους κυττάρων, με απουσία παρεμβαλλόμενων διαφραγμάτων ή κενών μεταξύ των κυττάρων και τέλος έλλειψη βασικής μεμβράνης [1], (8).

Υπάρχουν τέσσερις τύποι κυττάρων που μπορούμε να συναντήσουμε στην περιοχή των κολποειδών τριχοειδών αγγείων (**Εικόνα 17**):

- Κολποειδή ενδοθηλιακά κύτταρα (Sinusoidal endothelial cells)
- Κυτταρα Kupffer
- Ηπατικά αστροκύτταρα (Hepatic stellate ή Ito ή fat-storing)
- Λεμφοκύτταρα (NK, NKT, CD4, CD8)



Εικόνα 17:

Τέσσερις τύποι κυττάρων υπάρχουν στην περιοχή των κολποειδών τριχοειδών αγγείων: ηπατοκύτταρα (hepatocytes), ηπατικά αστροκύτταρα σε ηρεμία (quiescent stellate cells), ενδοθηλιακά κύτταρα (endothelial cells) και κύτταρα Kupffer (Kupffer cells)

Πηγή: Scott L. Friedman THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 275, No. 4, Issue of January 28, pp. 2247–2250, 2000 Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury

1.4.3.A. ΚΟΛΠΟΕΙΔΗ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα κολποειδή ενδοθηλιακά κύτταρα, αποτελούν το τοίχωμα των κολποειδών ενδοθηλιακών κυττάρων και διαχωρίζονται από τα ηπατοκύτταρα με τον χώρο του Disse. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ενδοθηλιακά κύτταρα του σώματος, τα Κολποειδή ενδοθηλιακά, δεν διαθέτουν διακυτταρικούς συνδέσμους αλλά αλληλεπικαλύπτονται, εμποδίζοντας έτσι την άμεση επαφή των κυττάρων του αίματος με τα ηπατοκύτταρα [10].

Το χαρακτηριστικό όμως των κυττάρων αυτών που τα κάνει μοναδικά σε όλο το σώμα, είναι η ύπαρξη στην κυτταρική τους μεμβράνη πολυάριθμων οπών (fenestrae), μεγέθους 150-170nm, με συχνότητα εμφάνισης 9-13 ανά μm^2 . Οι οπές αυτές έχουν την τάση να εμφανίζονται σε συσσωματώματα των 10-15, παίρνοντας έτσι το όνομα ηθμοειδείς πλάκες (sieve plates) [11]. Οι οπές επιτρέπουν σε συστατικά του πλάσματος, με μέγεθος όχι μεγαλύτερο από αυτό των χυλομικρών να έρχονται ελεύθερα σε επαφή με τα ηπατοκύτταρα, αφού πρώτα περάσουν από τον χώρο του Disse. Το μόνο γεγονός που ελέγχει τη μεταφορά των ουσιών του πλάσματος, είναι το μέγεθος των οπών.

Η διάμετρος των οπών όπως έχει αποδειχθεί, δεν είναι κάτι το στατικό, αλλά έχει τη δυνατότητα να αυξομειώνεται ως απάντηση σε ένα πλήθος ερεθισμάτων, που μπορεί να περιλαμβάνουν, ορμόνες, φάρμακα, τοξίνες ή ακόμα και ασθένειες. Ο μηχανισμός με τον οποίο μεταβάλεται η διάμετρος των οπών, άρχισε να αποκρυπτογραφείται το 1983 με την ανακάλυψη της παρουσίας ινιδίων ακτίνης στο γειτονικό περιβάλλον των οπών, ενώ το 1986 εντοπίστηκε ένα σύστημα ασβεστίου-καλμοδουλίνης-ακτίνης-μυοσίνης γύρω από τις οπές, το οποίο φαίνεται να ρυθμίζει το μέγεθός τους [10].

Μια τελευταία ιδιότητα που εμφανίζουν τα κολποειδή ενδοθηλιακά κύτταρα, είναι η έκφραση μιας πληθώρας υποδοχέων επιφανείας, καθώς και άφθονων εξειδικευμένων οργανιδίων, όπως ενδοσώματα και λυσοσώματα. Τα στοιχεία αυτά δίνουν στα κολποειδή ενδοθηλιακά κύτταρα ικανότητα ενδοκύττωσης διαφόρων ουσιών (όπως ηπαρίνης και κολλοειδούς αλβουμίνης), μεγαλύτερη και από αυτή των μακροφάγων [11].

1.4.3.B. ΚΥΤΤΑΡΑ KUPFFER

Τα κύτταρα Kupffer, έχουν το όνομα του *Karl Wilhelm von Kupffer* που τα παρήγαγε πρώτος το 1876. Ανήκουν στην οικογένεια των μονοκύτταρων-μακρο-



Εικόνα 18:

Κύτταρα Kupffer κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο με μεγέθυνση 40x, μετά από τρεις μέρες *in vitro*

Πηγή: Ευγενική προσφορά της Βιοχημικού Πολυξένης Δούμπα. Εργαστήριο Χειρουργικής Έρευνας, Α Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο.

φάγων και αποτελούν τα μακροφάγα του ήπατος αλλά και τον μεγαλύτερο πληθυσμό μακροφάγων στο σώμα (σχεδόν 80%). Έχουν ακανόνιστο αστεροειδές σχήμα και εντοπίζονται σε κενά μεταξύ των κολποειδών ενδοθηλιακών κυττάρων, με μικρολάχνες που ακουμπούν στην επιφάνεια των κολποειδών τριχοειδών αγγείων και αποφύσεις που εκτείνονται πέρα από αυτά μέσα στον χώρο του Disse (Εικόνα 18). Διαθέτουν πολυάριθμα λυσοσώματα (σχεδόν το ένα τέταρτο των λυσο-

σωμάτων του ήπατος), φαγοσώματα και υπεροξειδωμάτια [1].

Η προέλευση των Κυττάρων Kupffer, είναι τα μονοκύτταρα βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών. Είναι πολυάριθμα στον αυλό των κολποειδών τριχοειδών που βρίσκονται γύρω από διακλαδώσεις της πυλαίας φλέβας, αλλά με τα κατάλληλα ερεθίσματα μπορούν να μεταναστεύσουν σε περιοχές ηπατικής βλάβης και στους λεμφαδένες, κινούμενα παράλληλα, αλλά και ενάντια στη ροή του αίματος.

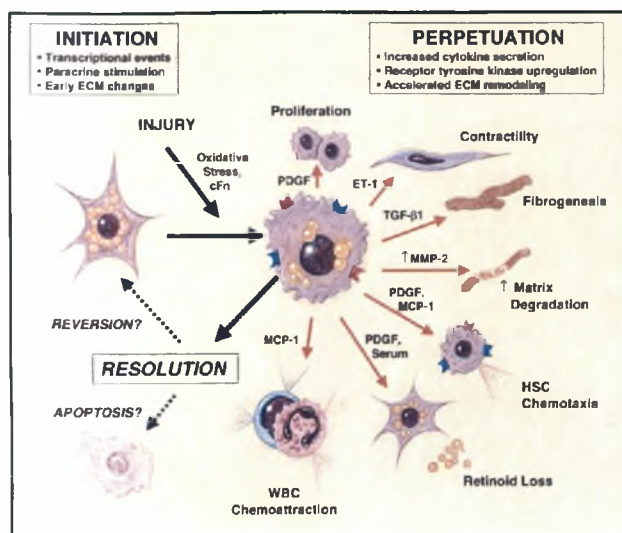
Η κυριότερη λειτουργία των κυττάρων Kupffer είναι η φαγοκύττωση και η κάθαρση από παθογόνα, όπως ενδοτοξίνες, μικροοργανισμοί, ανοσοσυμπλέγματα, καρκινικά κύτταρα, υπολείμματα κυττάρων, καθώς και οποιασδήποτε μορφής, άχρηστων, κατεστραμμένων, τροποποιημένων ή ξένων υλικών. Για την αποτελεσματική επίτευξη του παραπάνω στόχου, είναι εφοδιασμένα με υποδοχείς Fc και C₃ και μπορούν να παράγουν υπεροξειδίο του υδρογόνου, υδρολυτικά ένζυμα και εικοσανοειδή για την καταστροφή των αντιγόνων που φαγοκυτταρώνουν [13]. Γενικότερα θεωρείται, ότι το μεγαλύτερο μέρος της κάθαρσης ξένων υλικών που απορροφώνται από το έντερο ή κυκλοφορούν στο αίμα, πραγματοποιείται όχι από τα παρεγχυματώδη (ηπατοκύττα-

ρα) κύτταρα του ήπατος αλλά από τα κύτταρα Kupffer [12]. Μετά την απορρόφηση ενός μεγάλου αριθμού υλικών, το κύτταρο Kupffer αποκολλάται από το τοίχωμα του τριχοειδούς και μπαίνει στη συστηματική κυκλοφορία, όπου τελικά φιλτράρεται από τους πνεύμονες. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, μετά από απορρόφηση μεγάλων ποσοτήτων από υλικά είναι πιθανόν να διογκωθεί σε τέτοιο βαθμό, που να προκαλέσει απόφραξη του τριχοειδούς και στη συνέχεια να εξελιχθεί σε ένα πολυπύρηνο γιγαντοκύτταρο [11].

Παρ' ότι τα κύτταρα Kupffer εκφράζουν στην επιφάνεια τους μόρια ΜHC Τάξης II, που τους δίνουν τη δυνατότητα, να παρουσιάζουν αντιγόνα σε ευαισθητοποιημένα λεμφοκύτταρα και εκκρίνουν ανοσορυθμιστικές ουσίες, όπως IL-1 και IL-6, δεν είναι το ίδιο ικανά στην αντιγονοπαρουσίαση σε σύγκριση με τα κοινά μακροφάγα. Μια τελευταία ιδιότητα των κυττάρων Kupffer, που θα ήταν καλό να αναφερθεί, είναι ότι λειτουργούν σε συνεργασία με τα ηπατοκύτταρα, στον μεταβολισμό του σιδήρου και της αδενοσίνης. Τα κύτταρα Kupffer, εμφανίζουν μια ετερογένεια στις λειτουργίες τους. Αυτά που βρίσκονται στη ζώνη 1 του άκινου (acinus), έχουν μεγαλύτερη ικανότητα να φαγοκυτταρώνουν από αυτά που βρίσκονται στη ζώνη 3. Αυτό ίσως να συμβαίνει, διότι οι τοξικές ουσίες από την κυκλοφορία του αίματος, συναντώνται πρώτα στη ζώνη 1 [1].

1.4.3.Γ. ΗΠΑΤΙΚΑ ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα ηπατικά αστροκύτταρα, περιγράφηκαν πρώτα με αυτό το όνομα, από τον *Carl von Kupffer* το 1876 ενώ αργότερα το 1951, χαρακτηρίστηκαν ως λιποαποθηκευτικά κύτταρα, από τον Ιάπωνα ανατόμο *Toshio Ito*, από τον οποίο πήραν και το δεύτερό τους όνομα. Τα κύτταρα Ito λέγεται ότι έχουν μεσεγχυματική προέλευση, ενώ στο ήπαρ εντοπίζονται σε διάφορα σημεία στον χώρο του Disse, ανάμεσα στα ηπατοκύτταρα και τα κολποειδή ενδοθηλιακά κύτταρα. Πρόσφατα, παρόμοια κύτταρα έχουν βρεθεί και σε άλλους ιστούς πέραν του ήπατος, όπως, οι πνεύμονες, ο σπλήνας, οι όρχεις, η μήτρα και οι λεμφαδένες. Η βασική λειτουργία των κυττάρων Ito, είναι η ικανότητά τους να αποθηκεύουν βιταμίνη Α με τη μορφή ρετινοειδών (βιταμίνη Α και οι μεταβολίτες της). Συνολικά, αποθηκεύουν το 80% της συνολικής ποσότητας βιταμίνης Α του οργανισμού, σαν σταγονίδια λίπους στο κυτταρόπλασμα,



Εικόνα 19:

Τα ηπατικά αστροκύτταρα (HSC), μετά από ενεργοποίησή ως απάντηση σε τραυματισμό του ήπατος, εμφανίζουν μεγάλο αριθμό φαινοτυπικών αλλαγών, οι κυριότερες εκ των οποίων είναι: Σύσπαση (contractility) και διαφοροποίηση (proliferation) σε μυοϊνοβλάστες, παραγωγή συστατικών του εξωκυττάριου χώρου (fibrogenesis), χημειόταξη (chemotaxis) και προσέλκυση λευκοκυττάρων (WBC). Αν το ερέθισμα που προκάλεσε την ενεργοποίησή τους εξαφανιστεί τότε τα ηπατικά αστροκύτταρα μπορούν να ακολουθήσουν τη διαδικασία της απόπτωσης, ή να επιστρέψουν στην αρχική τους κατάσταση

Πηγή: Scott L. Friedman THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 275, No. 4, Issue of January 28, pp. 2247–2250, 2000 Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury

παραγόντων, όπως ηπατικές λοιμώξεις, αλκοόλ, μεταβολικές διαταραχές και κυτοκίνες όπως ο TGF-β. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα κύτταρα Ito εμφανίζουν το άλλο τους πρόσωπο και μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες (Εικόνα 19). Τα κύτταρα αυτά, προσομοιάζουν λείες μυϊκές ίνες και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες κολλαγόνου, φιμπρονεκτίνης και πρωτεογλυκανών. Η συσσώρευση των παραπάνω ουσιών, οδηγεί σε ίνωση του ιστού, η οποία τελικά, μπορεί να καταλήξει σε μη αντιστρεπτή κίρρωση και ηπατική ανεπάρκεια [18].

Τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί μεγάλη προσοχή στην λίστα με τις ανοσολογικές ιδιότητες των κυττάρων Ito, η οποία φαίνεται να αυξάνει διαρκώς σκοπιά. Τα κύτταρα Ito έχουν τη δυνατότητα να εκκρίνουν χημειοκίνες (MCP-1, IL-6), ενεργοποιώντας το σύστημα του συμπληρώματος αλλά και επιστρατεύοντας κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας. Επίσης τα κύτταρα Ito, δρουν σαν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα

γεγονός που τα κάνει την μεγαλύτερη αποθήκη της στο σώμα. Τα ρετινοειδή ρυθμίζουν ένα εύρος λειτουργιών, όπως, η όραση, η κυτταρική διαφοροποίηση, η διατήρηση της ακεραιότητας των επιθηλίων και η άμυνα κατά των λοιμώξεων. Η έλλειψή τους, μπορεί να οδηγήσει σε γαστρεντερικές λοιμώξεις και σοβαρή διάρροια [14, 15, 16, 17, 18, 19]. Όταν τα κύτταρα Ito βρίσκονται σε ηρεμία, συμβάλουν στην τρισδιάστατη αρχιτεκτονική του ήπατος, εκκρίνοντας πρωτεΐνες του εξωκυττάριου περιβάλλοντος και αποικοδομητικά ένζυμα, τις μεταλοπρωτεΐνάσες. Αυτή όμως η δυναμική ισορροπία που διατηρούν τα κύτταρα Ito, μπορεί να διακοπεί με την επίδραση

εκφράζοντας στην επιφάνειά τους μόρια όπως το CD1d, που προκαλεί διέγερση και απάντηση των NKT (Natural Killer T) κυττάρων καθώς επίσης και μόρια MHC όχι μόνο τάξης I αλλά και II, που τους επιτρέπουν την παρουσίαση αντιγόνων, που προέρχονται από ενδοκυττάρια παράσιτα, βοηθώντας έτσι στην εξάλειψη τέτοιου είδους λοιμώξεων [15, 16, 18].

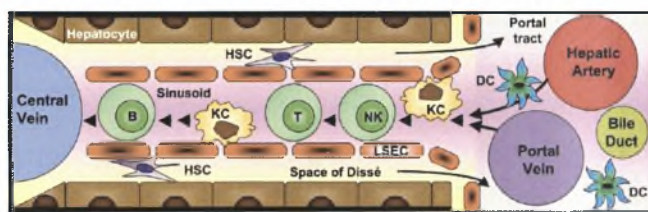
1.4.4. ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

Όλο και περισσότερο στοιχεία, υποδεικνύουν ότι το ήπαρ είναι ένα ανοσολογικό όργανο, κρατώντας έναν ρόλο κλειδί στη φυσική ανοσία του οργανισμού ενάντια παθογόνων και δρώντας έτσι σαν φραγμός για αυτά, μεταξύ του πεπτικού συστήματος και του υπόλοιπου σώματος [20] (Εικόνα 20).

Μέχρι πριν κάποια χρόνια η παρουσία λεμφοκυττάρων στο ήπαρ συσχετιζόταν με ασθένεια. Σύμφωνα όμως με πρόσφατα δεδομένα, στον φυσιολογικό ηπατικό ιστό, υπάρχουν μόνιμοι πληθυσμοί ενδοηπατικών λεμφοκυττάρων, που εμφανίζουν ένα μοναδικό εύρος χαρακτηριστικών [21].

Τα λεμφοκύτταρα που συναντάμε στο ήπαρ μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες.

Στην πρώτη κατηγορία, της επίκτητης ανοσίας ανήκουν διάφοροι πληθυσμοί T λεμφοκυττάρων, όπως, τα T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα γδTCR⁺, καθώς και τα συμβατικά T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα αβ TCR, έχουν την δυνατότητα να προωθούν την διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων και να απελευθερώνουν κυτταροκίνες (IFN-γ, IL-2). Τέλος σε αυτή την κατηγορία κατατάσσεται και ένας πληθυσμός B λεμφοκυττάρων που βρίσκεται στο ήπαρ [21, 22, 23, 24]. Στην δεύτερη κατηγορία, συναντάμε τα μη ειδικά κυτταροκτόνα κύτταρα, που απο-



Εικόνα 20:

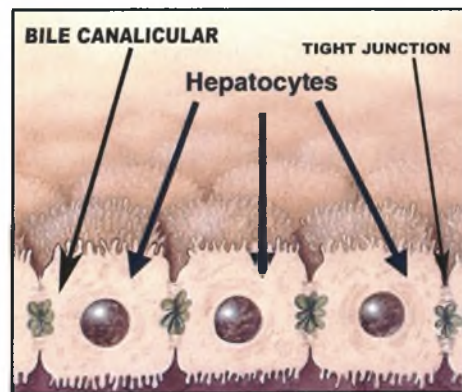
Λεμφοκύτταρα που κυκλοφορούν από τις διακλαδώσεις της πυλαίας φλέβας και της ηπατικής αρτηρίας, προς τη διακλάδωση της ηπατικής φλέβας, μέσα από τα κολποειδή τριχοειδή αγγεία του ήπατος. Στην εικόνα φαίνονται, B λεμφοκύτταρα (B), T λεμφοκύτταρα (T), κύτταρα Kupffer (KC), φυσικά κυτταροκτόνα (NK) και δενδριτικά κύτταρα (DC)

Πηγή: [21]

τελούν περίπου το 50% του συνολικού πληθυσμού των λεμφοκυττάρων του ήπατος. Σε αυτά, αρχικά περιλαμβάνονται τα τυπικά φυσικά κυτταροκτόνα (NK Natural Killer) κύτταρα, που υπάρχουν και στον υπόλοιπο οργανισμό. Μια άλλη κατηγορία NK κυττάρων που βρίσκονται στο ήπαρ ονομάζονται Pit, και είναι μεγάλα και κοκκιώδη κύτταρα που εντοπίζονται στον αυλό των κολποειδών τριχοειδών αγγείων προσκολλημένα σε ενδοθηλιακά κύτταρα ή κύτταρα Kupffer. Οι λειτουργίες των κυτάρων αυτών είναι παρόμοιες με των άλλων NK κυττάρων [25]. Τελευταίο πληθυσμό κυττάρων σ' αυτή τη κατηγορία, αποτελούν τα NKT κύτταρα τα οποία έχουν αρχίσει να θεωρούνται διαφορετικός τύπος κυττάρων, σε σχέση με τα υπόλοιπα NK. Τα NKT διαθέτουν πολλές από τις φαινοτυπικές και φυσιολογικές λειτουργίες των NK, αλλά παράλληλα, εκφράζουν και τον υποδοχέα επιφανείας των T λεμφοκυττάρων (TCR) [21, 24, 25].

1.4.5. ΧΟΛΙΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η χολή ξεκινά το ταξίδι της προς τη χοληδόχο κύστη, εκκρινόμενη από τα ηπατοκύτταρα στα χολικά σωληνοειδή, τα οποία δεν είναι τίποτα περισσότερο από πτυχώσεις των κυτταρικών μεμβρανών γειτονικών ηπατοκυττάρων, που ασφαρίζονται με στενοσυνδέσμους (tight junctions), για να αποφεύγονται οι διαρροές (Εικόνα 21). Όσο προχωράμε προς τις ευρύτερες διακλαδώσεις του χολικού δένδρου, όπως ονομάζεται το σύστημα άρδευσης της χολής από το ήπαρ, από το επίπεδο των καναλιών του Hering και μετά, όλα τα κανάλια και οι πόροι, είναι επενδεδυμένοι με χολικά επιθηλιακά κύτταρα ή χολαγγειοκύτταρα, όπως είναι η εναλλακτική τους ονομασία. Αυτά τα επιθηλιακά κύτταρα, παρ' ότι έχουν κοινή εμβρυϊκή προέλευση με τα ηπατοκύτταρα, διαφέρουν από αυτά ως προς τον φαινότυπο και τις λειτουργίες τους.



Εικόνα 21: Τα χολικά σωληνοειδή (bile canaliculi) σχηματίζονται από τις κυτταρικές μεμβράνες γειτονικών ηπατοκυττάρων (hepatocytes) οι οποίες ασφαρίζονται με στενοσυνδέσμους (tight junctions)

Πηγή: Scott L. Friedman THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 275, No. 4, Issue of January 28, pp. 2247–2250, 2000 Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury

Οι φαινοτυπικές τους διαφορές περιλαμβάνουν, μικρότερο αριθμό μιτοχονδρίων και λιγότερο εκτενώς ανεπτυγμένο ενδοπλασματικό δίκτυο, αλλά ισχυρότερα διαμορφωμένο κυτταροσκελετό [5, 1, 2].

Η ουσιαστικότερη λειτουργία τους εκτός από το να αποτελούν τους αγωγούς μέσα στους οποίους κυλάει η χολή, είναι η τροποποίηση της σύστασής της με προσθήκη νερού, πρωτεϊνών και διττανθρακικών και επαναρρόφηση από αυτήν γλυκόζης, γλουταμινικού και ανιόντων [2].

1.5. ΚΥΡΙΕΣ ΗΠΑΤΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

1.5.1. ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ

Ως μεταβολισμό χαρακτηρίζουμε τις φυσικές και χημικές διεργασίες, που λαμβάνουν χώρα στα κύτταρα του οργανισμού και συντηρούν τη ζωή. Ο μεταβολισμός, αποτελείται από τον αναβολισμό (το στάδιο της δημιουργίας σύνθετων ουσιών από απλούστερες) και τον καταβολισμό (το στάδιο όπου σύνθετα υλικά επεξεργάζονται σε απλούστερα).

Το ηπατοκύτταρο, αποτελεί το κλειδί, για την πλειονότητα των μεταβολικών διεργασιών του οργανισμού και κυριότερα για την διαχείριση και τον μεταβολισμό των ενεργειακών του πηγών (1).

Μπορούμε να συνοψίσουμε τις μεταβολικές πορείες που ακολουθούν τα ηπατοκύτταρα, σε τρεις μεγάλες κατηγορίες οι οποίες είναι:

- Μεταβολισμός Υδατανθράκων.
- Μεταβολισμός Λιπιδίων
- Μεταβολισμός Πρωτεϊνών

1.5.1.A. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

Οι υδατάνθρακες είναι οργανικά μόρια που αποτελούνται από μόρια άνθρακα, υδρογόνου και οξυγόνου και ταξινομούνται ως μόνο- δι- και πολυσακχαρίτες, ανάλογα με το πόσες ομάδες σακχάρου περιέχουν. Οι μονοσακχαρίτες -γλυκόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη- που λαμβάνονται από την πέψη της τροφής, μεταφέρονται

από το βλεννογόνο του εντέρου στο ήπαρ, μέσω της πυλαίας φλέβας. Η είσοδος της γλυκόζης στα κύτταρα των περισσότερων ιστών, εξαρτάται από την ύπαρξη της ορμόνης ινσουλίνης που παράγεται από τα β κύτταρα του παγκρέατος και είναι υπεύθυνη (μαζί με την γλυκαγόνη που παράγεται από τα α κύτταρα του παγκρέατος), για την ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Ο μεταβολισμός των υδατανθράκων είναι αδύνατον να συμβεί χωρίς την ύπαρξη των βιταμινών Β, που δρουν σαν συνένζυμα καθώς και των στοιχείων φωσφόρου, μαγνησίου, σιδήρου, χαλκού, μαγγανίου, ψευδαργύρου και χρωμίου που είναι απαραίτητοι συμπαράγοντες.

Μετά από ένα γεύμα, η περίσσεια της γλυκόζης στο αίμα λαμβάνεται από τα ηπατοκύτταρα και μετατρέπεται σε ένα μεγάλο πολυμερές, το γλυκογόνο, με μια διαδικασία που ονομάζεται γλυκογένεση. Αυτή η διεργασία, μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο από τα ηπατοκύτταρα. Όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα πέσει σε χαμηλά επίπεδα, ενεργοποιούνται άλλα μονοπάτια στο ήπαρ που οδηγούν στον αποπολυμερισμό του γλυκογόνου προς γλυκόζη, με μια διαδικασία που ονομάζεται γλυκογονόλυση. Όταν τα αποθέματα γλυκογόνου των ηπατοκυττάρων εξαντληθούν, τότε αυτά ενεργοποιούν έναν άλλο μηχανισμό, την γλυκονεογένεση, που αναλαμβάνει να συνθέσει γλυκόζη από άλλα μόρια όπως αμινοξέα. Γλυκόζη από αμινοξέα μπορεί να παραχθεί σε πολύ λίγους τύπους κυττάρων του οργανισμού, όπως είναι αυτά του ήπατος και των νεφρών.

Ο μεταβολισμός της γλυκόζης για την παραγωγή ενέργειας αρχίζει με την γλυκόλυση, όπου απελευθερώνεται ενέργεια από την γλυκόζη με τη μορφή δυο μορίων πυροσταφυλικού, τα οποία στη συνέχεια μπαίνουν στον κύκλο του Krebs (ή κύκλο του κιτρικού οξέος), αφού πρώτα μετατραπούν σε ακετυλο-συνένζυμο Α, διαδικασία όπου απαιτείται το σύμπλεγμα βιταμινών Β. Το υδρογόνο των υδατανθράκων, μεταφέρεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων όπου η ενέργεια ενσωματώνεται στο μόριο του ΑΤΡ, που στη συνέχεια χρησιμοποιείται για να καλύψει της ενεργειακές απαιτήσεις του οργανισμού, μέσω της υδρόλυσης του (1), [1, 2].

1.5.1.B. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Τα λίπη περιέχουν κυρίως άνθρακα και υδρογόνο, οξυγόνο και ορισμένες φορές και άλλα άτομα. Οι τρεις κύριες μορφές λιπιδίων που συναντώνται στις τροφές είναι τα γλυκολιπίδια, τα φωσφολιπίδια και τα στεροειδή.

Παρ' ότι οι περισσότερες διεργασίες που αφορούν τον μεταβολισμό των λιπιδίων, δεν συμβαίνουν αποκλειστικά στο ήπαρ, πολλές από αυτές, εκτελούνται εκεί στο μεγαλύτερο ποσοστό τους.

Ο κύριος όγκος των λιπαρών οξέων, συντίθεται στο ήπαρ. Εκεί η περίσσεια υδατανθράκων και πρωτεϊνών μετατρέπεται σε λιπαρά οξέα, με τελικό στάδιο την εστεροποίηση των τριακυλογλυκερολών, των εστέρων της χοληστερόλης και των φωσφολιπιδίων. Αφού λοιπόν τα λιπαρά οξέα που προκύπτουν πακεταριστούν με τη μορφή των VLDL (λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας), μεταφέρονται για αποθήκευση στον λιπώδη ιστό, όπου περιμένουν μέχρι να χρειαστεί να χρησιμοποιηθούν ως, η κύρια πηγή ενέργειας σε περιόδους νηστείας.

Το πλεόνασμα των μεγάλων ποσοτήτων χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων, που συντίθεται στο ήπαρ και δεν είναι απαραίτητο για τον οργανισμό, δεν πακετάρεται σε λιποπρωτεΐνες αλλά απεκκρίνεται στη χολή με τη μορφή της χοληστερόλης ή μετά από επεξεργασία ως χολικά οξέα.

Το ήπαρ είναι εξαιρετικά ενεργό ως προς την οξειδωση τριγλυκεριδίων, για την παραγωγή ενέργειας. Οι ποσότητες των λιπαρών οξέων που οξειδώνονται, είναι πολύ περισσότερες απ' ότι χρειάζονται τα ηπατοκύτταρα και γι αυτόν το λόγο, μεγάλες ποσότητες από κετονοσώματα, (ακετόνη, οξαλοξικό οξύ και β υδροξυβουτυρικό οξύ) που είναι τα προϊόντα του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων, εξάγονται από το ήπαρ με προορισμό άλλους ιστούς, (όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή ενέργειας), όπως η καρδιά και ο εγκέφαλος (1), [1, 2].

1.5.1.Γ. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Τα αμινοξέα, είναι τα δομικά μόρια των πρωτεϊνών και πρόδρομοι πολλών άλλων μορίων, όπως οι ορμόνες, οι πουρίνες, οι πυριμιδίνες και οι πορφυρίνες. Τα αμινοξέα, μπορούν επίσης να χρησιμεύσουν σαν πηγή ενέργειας (π.χ. κατά τη γλυκονεογένεση) και σαν ρυθμιστές της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών.

Οι άνθρωποι, είναι ικανοί να συνθέτουν 10 από τα 20 αμινοξέα, που συναντώνται στις πρωτεΐνες. Τα υπόλοιπα, -απαραίτητα όπως ονομάζονται- αμινοξέα, λαμβάνονται μέσω του πεπτικού συστήματος από φυτά ή βακτήρια. Σε έναν ενήλικο άντρα 70kg, το ήπαρ διαχειρίζεται καθημερινά περί τα 400g πρωτεΐνης, τα τρία τέταρτα

από αυτά τα 400g, αποικοδομούνται για την απόκτηση των απαραίτητων αμινοξέων.

Στο ήπαρ συντίθεται κάθε ένα από τα μη απαραίτητα αμινοξέα μέσω διακριτών βιοσυνθετικών πορειών, που ξεκινούν από το πυροσταφυλικό και από ενδιάμεσα του κύκλου του Krebs προϊόντα όπως το α-κετογλουταρικό και το οξαλοξικό. Το ηπατοκύτταρο, είναι ιδιαίτερα ενεργό ως προς τη σύνθεση πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα συνθέτει και εκκρίνει περισσότερο από το 90% των κυκλοφορούντων πρωτεϊνών του πλάσματος, ένα ποσοστό που αντιστοιχεί, στο 15% της συνολικής παραγωγής πρωτεϊνών στο σώμα. Η κύρια απεκκρινόμενη πρωτεΐνη που παράγεται από τα ηπατοκύτταρα είναι η αλβουμίνη, καθώς επίσης και πολλοί από τους θρομβοτικούς παράγοντες, που είναι υπεύθυνοι για την πήξη του αίματος.

Μια άλλη ιδιαίτερα σημαντική διαδικασία που συμβαίνει κυρίως στο ήπαρ, αλλά και στον νεφρό, είναι ο καταβολισμός των αμινοξέων, με κυριότερο στοιχείο του τη διαχείριση του αζώτου των αμινοξέων. Το ήπαρ, είναι το μόνο όργανο των θηλαστικών που έχει την δυνατότητα να ενσωματώνει το άζωτο που περιέχεται στις αμινομάδες των αμινοξέων, συνθέτοντας ουρία μέσω του ομώνυμου κύκλου. Καθημερινά 20-30g ουρίας συντίθενται και απεκκρίνονται στα ούρα (1), [1, 2].

1.5.2. ΕΚΚΡΙΣΗ ΧΟΛΗΣ

Η χολή είναι ένα σύνθετο, πικρό, κιτρινοπράσινο υγρό που περιέχει νερό, ηλεκτρολύτες και μια πληθώρα οργανικών ενώσεων, που περιλαμβάνουν, χολικά οξέα, (προέρχονται από τον καταβολισμό της χοληστερόλης και αποτελούν τον κύριο μηχανισμό για τον έλεγχο των επιπέδων της με μετατροπή 500mg καθημερινά), χοληστερόλη, φωσφολιπίδια και χολερυθρίνη. Παράγεται από τα ηπατοκύτταρα και μεταφέρεται στη χοληδόχο κύστη, μέσω του περίπλοκου συστήματος των χοληφόρων πόρων, αφού πρώτα εμπλουτιστεί κατά 30% σε υγρά, από τα κύτταρα που αποτελούν το επιθήλιο των πόρων. Συνολικά ένας ενήλικος άνθρωπος μπορεί να παράγει 400-800g χολής ημερησίως. Όταν η τροφή περνάει από το στομάχι στο λεπτό έντερο, διεγείρεται η έκκριση των ορμονών χολοκυστοκινίνη και σεκρετίνη από τα κύτταρα του δωδεκαδάκτυλου, οι οποίες πυροδοτούν την έκκριση της χολής. Τα χολικά οξέα που περιέχονται στη χολή, αποτελούν έναν ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντα που βοηθάει στην πέψη. Τα χολικά οξέα είναι αμφιπαθή μόρια, αφού

κάθε μόριο οξέος, περιέχει μια υδρόφοβη (λιποδιαλυτή) περιοχή, καθώς και μια υδρόφιλη (υδατοδιαλυτή) περιοχή. Τα μόρια αυτά μπορούν και δρουν η απορροπαστικά ομογενοποιώντας μεγάλα σφαιρίδια λίπους σε πολύ μικρότερα σωματίδια, αυξάνοντας έτσι την επιφάνεια τους, διευκολύνοντας την πέψη τους από τις λιπάσες, είτε αυξάνοντας τη διαλυτότητα των λιπών σε υδατικό περιβάλλον, κάτι που βοηθά την μετακίνησή τους κατά μήκος του εντέρου.

Ένας άλλος πολύ σημαντικός ρόλος της χολής, είναι η απέκκριση στο έντερο και κατά συνέπεια στα κόπρανα πολλών παραπροϊόντων του μεταβολισμού, όπως η χολερυθρίνη (το παραπροϊόν του καταβολισμού της αίμης των ερυθρών αιμοσφαιρίων) (1) [1, 2].

Το 95% των χολικών οξέων της χολής που εκκρίνονται καθημερινά δεν χάνονται, αλλά, απορροφώνται και πάλι στον ειλεό του εντέρου και από εκεί μέσω της φλεβικής κυκλοφορίας και της πυλαίας φλέβας επιστρέφουν στο ήπαρ, απ' όπου ενσωματώνονται ξανά στη χολή έτσι ώστε ένα μόριο χολικού οξέος, μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί μέχρι και 20 φορές (1).

1.5.3. ΕΚΚΡΙΣΗ ΟΡΜΟΝΩΝ

Το ήπαρ εμφανίζει σημαντική ενδοκρινή δράση, συνθέτοντας και εκκρίνοντας, τρεις ιδιαίτερα σημαντικές ορμόνες στην κυκλοφορία. Αυτές είναι οι εξής:

Ινσουλινομορφος αυξητικός παράγοντας-1 (IGF-1): Είναι μια πεπτιδική ορμόνη 79 αμινοξέων, ονομάζεται και σωματομεδίνη, η οποία παράγεται από τα ηπατοκύτταρα και εκκρίνεται, ως αποτέλεσμα της διέγερσης τους από την αυξητική ορμόνη. Η σύνδεση του IGF-1 στον αντίστοιχο υποδοχέα ενός κυττάρου οδηγεί σε μίτωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Υποδοχείς για τον IGF-1, βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα του σώματος, αλλά τα κύτταρα που κυρίως επηρεάζονται από τη δράση του, είναι αυτά του μυελού των οστών και των χόνδρων, καθώς επίσης και του δέρματος, των οστών και των πνευμόνων [27].

Αγγειοτενσινογόνο: Είναι μια α-2 σφαιρίνη που απελευθερώνεται στην κυκλοφορία κυρίως από το ήπαρ και αποτελεί την πρόδρομη μορφή της αγγειοτενσίνης, που σχηματίζεται με τη δράση της ρενίνης. Η αγγειοτενσίνη προκαλεί αγγειοσυστολή, αύξηση της πίεσης του αίματος και απελευθέρωση της αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια [28].

Θρομβοποιητίνη: Ορμόνη γλυκοπρωτεϊνικής φύσης, που παράγεται στο ήπαρ και τα νεφρά. Ελέγχει την παραγωγή και διαφοροποίηση των μεγακαρουκυττάρων, τα οποία είναι η πηγή παραγωγής των αιμοπεταλίων στο μυελό των οστών [29].

1.5.4. ΗΠΑΤΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ

Η ικανότητα του ήπατος να αναγεννάτε, είναι μια ιδιότητα γνωστή στους ανθρώπους από την αρχαιότητα. Η τιμωρία του Προμηθέα για την κλοπή της φωτιάς από τους θεούς, ήταν το ήπαρ του να τρώγεται κάθε μέρα από έναν αετό και την επόμενη μέρα να αναγεννάτε παρέχοντας έτσι αιώνια τροφή στον αετό και αιώνιο μαρτύριο στον Προμηθέα.

Έχει δειχθεί από μελέτες ότι η μάζα του ήπατος ρυθμίζεται με ακρίβεια μέσω σημάτων του σώματος, που μπορεί να έχουν τόσο αυξητικές όσο και μειωτικές επιδράσεις μέχρι την επίτευξη του επιθυμητού από τον οργανισμό αποτελέσματος. Το συχνότερα ακολουθούμενο πρωτόκολλο για την διαπίστωση αυτής της θαυμαστής ιδιότητας είναι η τμηματική ηπατεκτομή, όπου ένα μεγάλο τμήμα του ήπατος ενός αρουραίου αφαιρείται χειρουργικά, (συνήθως τα δυο τρίτα), αφήνοντας τους εναπομείναντες λοβούς άθικτους. Παρ' ότι οι λοβοί που αφαιρέθηκαν δεν αναπληρώνονται ποτέ, οι εναπομείναντες λοβοί μεγεθύνονται και η μάζα του οργάνου αποκαθιστάται μέσα σε 5-7 ημέρες. Σε άλλες παρόμοιες μελέτες, ήπαρ από μεγάλους σκύλους μεταφέρθηκε σε μικρότερους. Τότε παρατηρήθηκε ότι το μέγεθος του οργάνου άρχισε να ελαττώνεται βαθμιαία μέχρι που έγινε κατάλληλο για το νέο του σώμα. Το αντίστροφο συμβαίνει, όταν ήπαρ από μικρό ζώο μεταφέρεται σε μεγαλύτερο [30], (1).

Όλοι ανεξαιρέτως οι κυτταρικοί πληθυσμοί του ήπατος, πολλαπλασιάζονται ώστε

να επιτευχθεί η αναγέννηση του οργάνου. Ο πρώτος πληθυσμός κυττάρων που ξεκινά τον πολλαπλασιασμό, είναι τα ηπατοκύτταρα. Οι πρώτες ομάδες ηπατοκυττάρων που αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται, είναι αυτές που βρίσκονται σε κάθε λοβίο στην περιοχή γύρω από την πυλαία τριάδα, μια και είναι οι πρώτες που λαμβάνουν τα μεταφερόμενα μέσω του αίματος μηνύματα. Το πρώτο διακριτό γεγονός είναι η αύξηση του ρυθμού σύνθεσης του DNA στο πρώτο 24ωρο, γεγονός που υποδηλώνει την έναρξη της αυξημένης μιτωτικής δραστηριότητας των ηπατοκυττάρων.

Κατά την 3^η-4^η μέρα, η ιστολογία του αυξανόμενου ήπατος χαρακτηρίζεται από συσσωματώματα ηπατοκυττάρων συγκεντρωμένα γύρω από τριχοειδή. Τα συσσωματώματα αυτά μέχρι την 7^η μέρα έχουν μετατραπεί σε τυπικές ηπατοκυτταρικές πλάκες πάχους δύο κυττάρων (σε αντίθεση με τις πάχους ενός κυττάρου στο φυσιολογικό ήπαρ), με λοβία μεγαλύτερου μεγέθους από το κανονικό, ενώ τα τριχοειδή μετατρέπονται σε τυπικά κολποειδή τριχοειδή αγγεία [30]. Φαίνεται πως τα ηπατοκύτταρα έχουν τυπικά απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού, ακόμα και μετά από 12 συνεχείς τμηματικές ηπατεκτομές. Αυτό που είναι ακόμα πιο αξιοθαύμαστο, είναι ότι ενώ τα ηπατοκύτταρα βρίσκονται στη φάση του πολλαπλασιασμού έχουν τη δυνατότητα να εκτελούν ταυτόχρονα όλες τις απαραίτητες διεργασίες για την διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού, όπως ή ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα, η σύνθεση πρωτεϊνών του πλάσματος και η έκκριση της χολής [30, 31, 32, 33].

Ένα πλήθος από μελέτες του φαινομένου της ηπατικής αναγέννησης την τελευταία δεκαετία, έχουν αναγνωρίσει κύτταρα που εμφανίζουν ιδιότητες ηπατικού βλαστοκυττάρου με δυνατότητα διαφοροποίησης σε ηπατοκύτταρο ή σε επιθηλιακό κύτταρο των χολικών πόρων. Αυτά έχουν ονομαστεί ωσειδή κύτταρα (oval cells). Συναντώνται στην περιτοναϊκή κοιλότητα έχουν τη δυνατότητα διαφοροποίησης κάτω από πολύ συγκεκριμένες συνθήκες, αλλά δεν μπορούν να αποικίσουν το ήπαρ υπό φυσιολογικές συνθήκες και σύμφωνα με τελευταία δεδομένα, είναι πιθανόν να μην είναι πραγματικά βλαστικά κύτταρα [31, 33].

Η ηπατική αναγέννηση, φαίνεται να ενεργοποιείται από πληθώρα κυκλοφορούντων μιτογόνων παραγόντων. Αυτό υποστηρίζεται από πειράματα κατά τα οποία, τμήματα ήπατος μεταμοσχεύονταν σε περιοχές του σώματος μακριά απ' όπου φυσιολογικά εντοπίζεται το ήπαρ και μετά από τμηματική ηπατεκτομή, αυτά τα τμήματα άρχιζαν να αυξάνουν σε όγκο. Οι κυριότεροι και καλύτερα μελετημένοι μιτογόνοι παράγοντες που εμπλέκονται στην ηπατική αναγέννηση είναι ο αυξητικός παρά-

γοντας των ηπατοκυττάρων (HGF) του οποίου τα επίπεδα βρίσκονται αυξημένα μετά από ηπατεκτομή και προκαλεί αύξηση των ηπατοκυττάρων, ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) που διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ηπατικών ενδοθηλιακών κυττάρων και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) που δρα ως μιτογόνο των χολικών επιθηλίων [30], (1).

1.5.5. ΑΠΟΤΟΞΙΝΩΣΗ ΟΥΣΙΩΝ

Υπάρχει γύρω μας ένα χάος χημικών δομών, στις οποίες είμαστε καθημερινά εκτεθειμένοι και ο αριθμός τους αυξάνεται διαρκώς. Μέχρι το 2000, η λίστα της *Chemical Abstracts Service (CAS)* στην Αμερική για τις γνωστές ουσίες, περιελάμβανε περισσότερες από 30 εκατομμύρια διαφορετικές οργανικές και ανόργανες ενώσεις και σήμερα αυτός ο αριθμός, έχει ανέβει πάνω από τα 35 εκατομμύρια.

Από τα παραπάνω μόρια, μεγαλύτερη ανησυχία προκαλούν αυτά που λαμβάνονται από το σώμα, αλλά δεν ενσωματώνονται στον μεταβολισμό. Αυτά τα χημικά ονομάζονται ξενοβιοτικά. Το σώμα μας είναι εξοπλισμένο με πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς, για να αποφεύγεται η συσσώρευση αυτών των ουσιών.

Παρ' ότι ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών είναι κατά κύριο λόγο ηπατική διεργασία, συμβαίνει και σε ορισμένους άλλους ιστούς, όπως οι νεφροί, το έντερο, οι πνεύμονες και το δέρμα. Τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις αδρανοποίησης των ξενοβιοτοκών, βρίσκονται σε αφθονία στο ήπαρ και κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες. Τις οξειδοοξειδοκτάσες (οξειδοαναγωγάσες), τις υδρολάσες και τις τρανσφεράσες. Οι αντιδράσεις που καταλύονται από τις δύο πρώτες κατηγορίες ενζύμων, ανήκουν στις αντιδράσεις φάσης I και περιλαμβάνουν οξείδωση, αναγωγή και υδρόλυση, ενώ αυτές που καταλύονται από την τρίτη κατηγορία ενζύμων, ανήκουν στις αντιδράσεις της φάσης II και περιλαμβάνουν αντιδράσεις σύζευξης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι αντιδράσεις φάσης II συμβαίνουν διαδοχικά μετά τις αντιδράσεις φάσης I και τελικός σκοπός είναι η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αύξηση της υδατοδιαλυτότητας των ξενοβιοτικών, ώστε να διευκολύνεται η απέκκριση τους από τον οργανισμό [1].

2. ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΝΕΚΡΩΣΗ

2.1. ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ανακαλύφθηκε από τον *C. Vogt* στα μέσα του 19ου αιώνα, όταν παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης των αμφιβίων, η μορφολογία των κυττάρων τα οποία πέθαιναν. Η πρώτη περιγραφή της απόπτωσης στο ήπαρ, έγινε το 1890 με τον χαρακτηρισμό της ιστοπαθολογίας του κίτρινου πυρετού [2].

Η απόπτωση είναι μια ενεργοβόρος διαδικασία, υπαρκτή σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς του σώματος και οδηγεί το κύτταρο στον θάνατό του, μέσα από μια σειρά ελεγχόμενων και προσεκτικά ενορχηστρωμένων βημάτων, τόσο ένδο- όσο και εξωκυτταρικών.

Οι *Kerr* και *Wyllie* το 1972, παρατήρησαν με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, αξιοθαύμαστες αλλαγές σε κύτταρα που αποπίπτανε.

Η αρχική φάση της απόπτωσης χαρακτηρίζεται μορφολογικά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο από πύκνωση και περιφερική διάταξη της χρωματίνης στην πυρηνική μεμβράνη και ακολουθείται από κερματισμό του πυρήνα και του DNA, σε τμήματα 300-500 kb. Το κυτταρόπλασμα παρουσιάζει και αυτό πύκνωση και σχηματίζει πτυχώσεις οι οποίες περιβάλλουν τα τμήματα των πυρήνων. Επέρχεται στη συνέχεια διάσπαση του κυττάρου σε αποπτωτικά σωματίδια, τα οποία αποτελούν τμήματα κυτταροπλάσματος και πυρήνα που περιβάλλονται από μεμβράνη.

Ιστολογικά τα αποπτωτικά σωματίδια φαίνονται σαν στρογγυλές και ωοειδείς κυτταροπλασματικές μάζες, που περιέχουν ή δεν περιέχουν βασεόφιλο πυρηνικό υλικό. Τα μεγαλύτερα διακριτά αποπτωτικά σωματίδια, έχουν αναγνωρισθεί από παλιά σε φυσιολογικούς και παθολογικούς ιστούς και έχουν πάρει διάφορες ονομασίες. Τέτοιες είναι, τα σωματίδια *Councilman* στο ήπαρ, τα καρνολυτικά σωματίδια στις εντερικές κρύπτες, τα σωματίδια *Cinatte* στον ομαλό λειχήνα κ.α. Τα αποπτωτικά σωματίδια στη συνέχεια, μέσω σηματοδοτικών μορίων που εκφράζουν στη μεμβράνη τους, επάγουν τη φαγοκυττάρωσή τους από γειτονικά κύτταρα ή μακροφάγα και καταβολίζονται από τα ένζυμα των λυσοσωμάτων. Σε εναλλακτικές περιπτώσεις όπου δεν συμβαίνει φαγοκυττάρωση, τα κύτταρα που πεθαίνουν χάνουν την επαφή τους με τα γειτονικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να επιπλέουν στον παρακείμενο χώρο, σε καμία όμως περί-

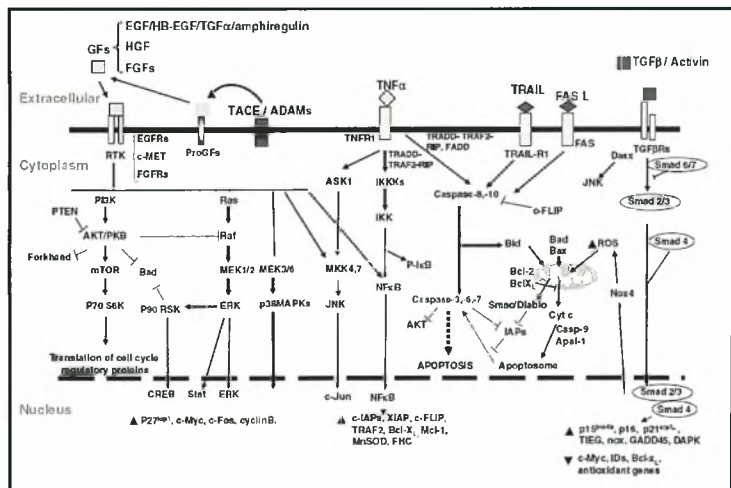
πτωση κατά την απόπτωση δεν παρατηρείται οξεία φλεγμονώδης αντίδραση.

Το μικρό μέγεθος και το σύντομο χρονικό διάστημα της ζωής των αποπτωτικών σωματίων, καθώς και η απουσία φλεγμονής, κάνουν σχετικά ασαφή ιστολογικά την απόπτωση. Ακόμη και μικρή αύξηση στο ποσοστό της απόπτωσης σε έναν ιστό, μπορεί να αντιπροσωπεύει σημαντικές κυτταρικές απώλειες. Το κλείσιμο της συνέχειας των κυττάρων από υπολειμματικά κύτταρα, έχει αποτέλεσμα τη συρρίκνωση του συμπαγούς ιστού, με μικρή συνήθως διαταραχή της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής.

Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία σημαντικών βιολογικά καταστάσεων, όπου ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι απαραίτητος. Κάποιες από αυτές είναι, η σχηματοποίηση των διαφόρων ιστών κατά την ανάπτυξη, η επιλογή συγκεκριμένων πληθυσμών Τ και Β λεμφοκυττάρων, στη διάρκεια της απάντησης του ανοσοποιητικού συστήματος σε αντιγόνα, η αποφυγή της καρκινογένεσης και η απομάκρυνση γενετικά αλλοιωμένων κυττάρων [2, 34, 35].

Η απόπτωση φαίνεται να αποτελεί τον κύριο τύπο κυτταρικού θανάτου στο ήπαρ. Η διαδικασία με την οποία ρυθμίζεται είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και παίρνει σ' αυτήν μέρος ένας τεράστιος αριθμός γονιδίων, πρωτεϊνών και σηματοδοτικών μορίων (Εικόνα 22). Υπάρχουν δύο κατηγορίες γονιδίων που συμμετέχουν στην απόπτωση και διακρίνονται σε αυτά που την επαγουν (p53, c-myc, Fas, Bax, Bad, Bak, Bcl-Xs) και αυτά που την αναστέλλουν (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, MCL-1, A-I, cIAP) ενώ η επαγωγή ή αναστολή της διαδικασίας εξαρτάται από τη σχετική αναλογία των προϊόντων τους [34, 35, 36, 37].

Το κυρίαρχο γεγονός για την πραγματοποίηση της απόπτωσης είναι η ενεργοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων που ονομάζονται κασπάσες (caspases) και διαχωρίζονται στις



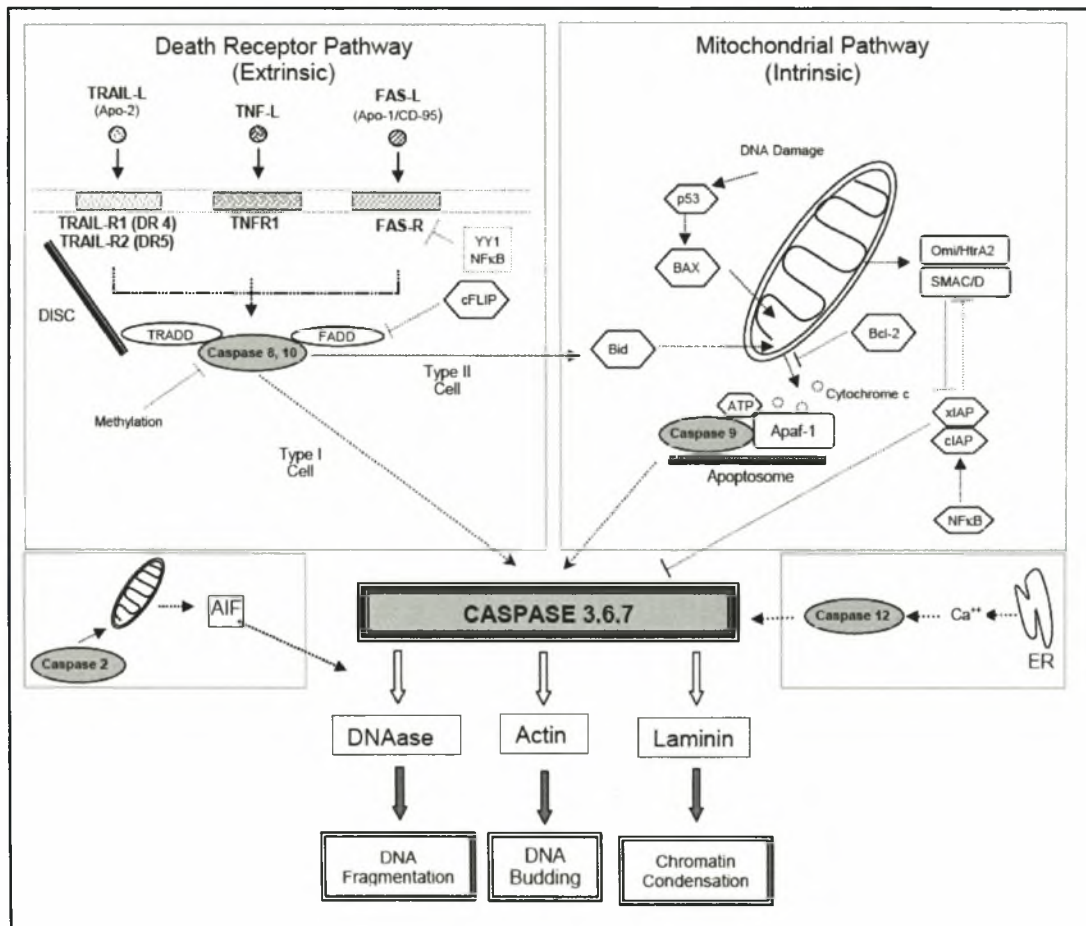
Εικόνα 22:

Εξωκυττάριοι και ενδοκυττάριοι παράγοντες που ελέγχουν την απόπτωση στα ηπατοκύτταρα.

Πηγή: [37]

εναρκτήριες (8 και 10) και τις εκτελεστικές (3, 6 και 7) [35]. Η ενεργοποίηση των παραπάνω ενζύμων μπορεί να προκύψει μέσω δυο τύπων απόπτωσης (Εικόνα 23).

Ο τύπος 1 ονομάζεται και εξωγενές ή μονοπάτι του υποδοχέα θανάτου και ξεκινά με την πρόσδεση ενός προσδέτη (TNF ligant, TRAIL ligant, FasL) στον αντίστοιχο υποδοχέα (TNF receptor, DR4-DR5, Fas) στην κυτταρική μεμβράνη. Το παραπάνω γεγονός οδηγεί μέσω μιας σειράς ενδιάμεσων μορίων στην ενεργοποίηση μέσω πρωτεόλυσης των κασπασών και τον κατακερματισμό του DNA.



Εικόνα 23:

Οι δυο τύποι απόπτωσης. Το μονοπάτι του υποδοχέα θανάτου και το μιτοχονδριακό μονοπάτι. Οι γραμμές που καταλήγουν σε βέλος, υποδεικνύουν επαγωγική δράση, ενώ αυτές που καταλήγουν σε παύλα, υποδεικνύουν ανασταλτική δράση.

Πηγή: [35]

Ο τύπος 2 ονομάζεται και ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι και ξεκινά με την αύξηση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω της δράσης μορίων που προάγουν την απόπτωση (BAX και Bak) και την απελευθέρωση από αυτό του κυτοχρώματος c που ενώνεται με το Apaf-1 και την προ-κασπάση 9 και μαζί με ATP

σχηματίζουν το αποπτώσωμα που ενεργοποιεί τις κασπάσες και οδηγεί στα ίδια αποτελέσματα με τον τύπο 1 δηλαδή τον κατακερματισμό του DNA [35, 38, 39, 40].

2.2. ΝΕΚΡΩΣΗ

Σε αντίθεση με την απόπτωση, η νέκρωση αποτελεί μια μη ελεγχόμενη μορφή κυτταρικού θανάτου και είναι αποτέλεσμα έκθεσης του οργανισμού σε τοξικούς παράγοντες, ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες και μηχανικά τραύματα. Τα γεγονότα που συμβαίνουν κατά τη νέκρωση δεν απαιτούν ενέργεια αλλά έχουν τη μορφή χιονοστιβάδας. Κατά τη νέκρωση τα τραυματισμένα κύτταρα διογκώνονται, οι μεμβράνες των οργανιδίων τους σπάνε απελευθερώνοντας το τοξικό τους περιεχόμενο στο κυτταρόπλασμα και το DNA υδρολύεται. Αφού η νέκρωση δεν περιλαμβάνει τη φαγοκυττάρωση του κυττάρου που πεθαίνει, τελικά η κυτταρική μεμβράνη σπάει από τη διαταραχή της εσωτερικής ομοιόστασης των ιόντων και το τοξικό περιεχόμενο διαχέεται στους γύρω ιστούς προκαλώντας φλεγμονή [2, 34].

3. ΣΗΨΗ

Σήψη καλείται η συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση του ανθρώπινου οργανισμού, όταν αυτός αποκρίνεται σε κάποιον λοιμώδη παράγοντα (βακτήριο, ιό, μύκητα ή παράσιτο). Έχει συχνή κατάληξη το θάνατο, μέσω ανεπάρκειας πολλών οργάνων, (Σύνδρομο πολυοργανικής ανεπάρκειας Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS) και μη αναστρέψιμη πτώσης της αρτηριακής πίεσης (σηπτικό shock).

Κατά τη σήψη, παθογόνοι μικροοργανισμοί ή τοξίνες που παράγονται από αυτούς, βρίσκονται στο αίμα ή τους ιστούς. Αποτελεί την ευρύτερη έννοια της σηψαιμίας, που συνδέεται με την παρουσία των μικροβίων και των τοξινών τους μόνο στο αίμα.

Τα συχνότερα παθογόνα μικρόβια που ευθύνονται για τη σηπτική κατάσταση, είναι το κολοβακτηρίδιο (*Escherichia coli*), η κλεμψοϊέλλα (*Klebsiella*) και η ψευδομονάδα (*Pseudomonas aeruginosa*) [41, 42].

Η ανταπόκριση του οργανισμού σε βακτηριακή λοίμωξη, κινητοποιείται από τις

βακτηριακές τοξίνες, όπως η ενδοτοξίνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων και το σύμπλεγμα λιποτειχοϊκού οξέος-πεπτιδογλυκάνης των Gram-θετικών βακτηρίων.

Στην Gram-αρνητική σήψη, η σύνδεση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) με τον CD14 υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης των μονοκυττάρων και μακροφάγων, οδηγεί σε ενεργοποίησή τους. Επιπλέον, ο LPS ίσως συνδέεται με διαλυτά CD14 και αυτό το σύμπλεγμα αντιδρά και ενεργοποιεί ενδοθηλιακά, επιθηλιακά και κύτταρα λείων μυϊκών ινών. Δεν είναι πλήρως γνωστό πώς τα Gram-θετικά βακτήρια ενεργοποιούν τα μονοκύτταρα, αλλά φαίνεται ότι μηχανισμοί εξαρτώμενοι και ανεξάρτητοι από τους υπο-δοχείς CD14 ίσως παίζουν κάποιο ρόλο. Οι εξωτοξίνες, τέλος, δρουν ως υπεραντιγόνα και κινητοποιούν τους ανοσιακούς μηχανισμούς άμεσα και μαζικά [41].

Στο ήπαρ καταλήγει μέσω της πυλαίας φλέβας το αίμα της εντερικής κυκλοφορίας, καθώς και αίμα από τη συστηματική κυκλοφορία. Τοποθετείται λοιπόν ως όργανο σε μία ιδιαίτερα κεντρική θέση για την ανίχνευση μικροβίων ή μικροβιακών προϊόντων, που προέρχονται είτε από το πεπτικό σύστημα είτε από τα υπόλοιπα όργανα αποτελώντας το κυριότερο σημείο κάθαρσης της βακτηριακής ενδοτοξίνης με παράλληλη έκκριση κυτταροκινών. Το πρώτο όργανο που δέχεται την δράση των κυτταροκινών που παράγει το ήπαρ είναι ο πνεύμονας. Το ήπαρ εμπλέκεται επίσης σε μεγάλο βαθμό, στην παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης. Ίσως λόγω της συχνής του έκθεσης σε μικροβιακά προϊόντα, το ήπαρ είναι πολύ καλά προστατευμένο από τις επιδράσεις της σήψης. Αυτό μπορεί να σχετίζεται και με τα υψηλά επίπεδα των αντιοξειδωτικών που διαθέτει [43].

Η σήψη είναι συχνό ενδονοσοκομειακό νόσημα. Το ποσοστό ασθενών που καταλήγουν από τη σήψη, κυμαίνεται από 20% έως 80%. Το παραπάνω αφορά κυρίως τις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας, όπου αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου.

Η κλινική εικόνα της σήψης, εκδηλώνεται με δύο ή περισσότερες από τις παρακάτω παραμέτρους: 1) πυρετός $>38^{\circ}\text{C}$ ή υποθερμία $<35^{\circ}\text{C}$, 2) ταχυκαρδία (περισσότερες από 90 σφύξεις το λεπτό), 3) ταχύπνοια (περισσότερες από 20 αναπνοές το λεπτό), 4) λευκοκυττάρωση.

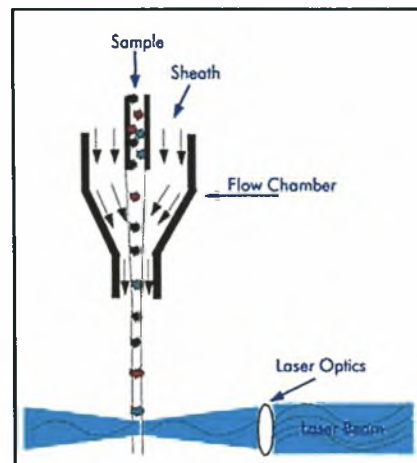
Γενικευμένη φλεγμονώδης αντίδραση, δεν αναπτύσσεται μόνο όταν υπάρχει λοίμωξη, αλλά (αν και όχι τόσο συχνά) μπορεί να προκύψει και σε άλλες καταστάσεις, στις οποίες έχει συμβεί οξεία βλάβη ιστών, όπως: εγκαύματα, τραύματα, ισχαιμία, αιμορραγικό ή αναφυλακτικό shock, οξεία παγκρεατίτιδα [42].

4. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Η κυτταρομετρία ροής, αποτελεί μια αυτοματοποιημένη μέθοδο ανάλυσης φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, κατάλληλα προετοιμασμένων κύτταρων ή σωματιδίων. Η ανάλυση γίνεται με βάση τον εκπεμπόμενο φθορισμό και τη σκέδαση του φωτός. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι το υπό

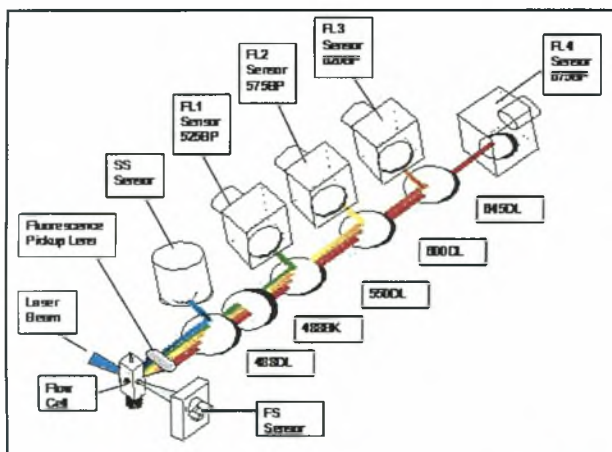
εξέταση δείγμα να είναι σε μορφή εναιωρήματος. Ο κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από τρία βασικά συστήματα:

- Υδροδυναμικό σύστημα ροής που επιτρέπει τη ροή των κυττάρων σε μονήρη διάταξη (Εικόνα 24).
- Οπτικό σύστημα, όπου ακτίνα laser προσπίπτει στην κυτταρική διάταξη και προκαλείται σκεδασμός του προσπίπτοντος φωτός (Εικόνα 25).
- Ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων (Εικόνα 25).



Εικόνα 24: Διάταξη κυψελίδας σε κυτταρομετρητή ροής. Διακρίνεται η κεντρική ροή του δείγματος, η περιβάλλουσα ροή (sheath), η προερχόμενη από laser φωτεινή δέσμη ακτινοβολίας και η σκέδαση της ακτινοβολίας μετά από πρόσπωση ανά κύτταρο.

Πηγή: (8)



Εικόνα 25:

Σχηματική απεικόνιση της οπτικής διάταξης ενός κυτταρομετρητή ροής. Διαθέτει φωτεινή πηγή laser ιόντων Αργού (488nm) και τέσσερις φωτοπολλαπλασιαστές για την ταυτόχρονη ανίχνευση 4 φθορισμικών χρωμάτων.

Πηγή: (8)

Η βασική εξέταση που έκανε την κυτταρομετρία ροής να κατέχει ξεχωριστή θέση στην καθημερινή κλινική πρακτική, είναι η μελέτη των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων, ενώ σήμερα αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για πολλούς τομείς της ιατρικής όπως: Αιματολογία, Ανοσολογία, Λοι-

μωξιολογία, Ογκολογία, Ουρολογία, Μαιευτική & Γυναικολογία, Παθολογία, Παιδιατρική ενώ πολύτιμη είναι η συμμετοχή της στον τομέα των Μεταμοσχεύσεων. Παθολογοανατομία και Κυτταρολογία έχουν ένα πολύτιμο συνεργάτη στην διαφοροδιάγνωση πολλών νοσημάτων ενώ νέες ειδικότητες οι οποίες μπορούν να αξιοποιήσουν τις δυνατότητες της κυτταρομετρίας ροής είναι η Πνευμονολογία (μελέτη βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος), Νευρολογία (μελέτη ENY), Οφθαλμολογία (μελέτη υδατοειδούς υγρού).

Μέσω της κυτταρομετρίας ροής παρέχεται η δυνατότητα προσδιορισμού σκεδαστικών χαρακτηριστικών και αντιγόνων επιφανείας, αλλά και αντιγόνων του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα σε οποιοδήποτε κυτταρικό πληθυσμό, βάσει του οποίου προκύπτει χαρακτηρισμός του κυτταρικού πληθυσμού. Παράλληλα επιτρέπει τον προσδιορισμό των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και της ανευπλοειδίας στον υπό διερεύνηση κυτταρικό πληθυσμό. Μελετάει επιπλέον και τη λειτουργική ικανότητα των κυττάρων, όπως την ανοσιακή απάντηση σε αντιγόνα και μιτογόνα, τη φαγοκυττάρωση, τη χημειοταξία και την οξειδωτική έκρηξη (8).

4.1 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μέσω της κυτταρομετρίας ροής υπάρχει η δυνατότητα συλλογής δεδομένων, που αφορούν μορφολογικά χαρακτηριστικά των μελετώμενων κυτταρικών πληθυσμών, όπως μέγεθος ή κοκκίωση, καθώς επίσης και πληροφοριών που προσδιορίζουν την κατάσταση των κυττάρων (ζωντανά, αποπτωτικά, νεκρωτικά).

Το βασικό πλεονέκτημα που προσφέρει η κυτταρομετρία ροής είναι ο ποσοτικός χαρακτήρας των μετρήσεων, αφού από ένα μόνο δείγμα ιστού, είναι δυνατόν να ανιχνευθούν από τον κυτταρομετρητή πολλές χιλιάδες κύτταρα (~100.000 στην παρούσα μελέτη), κάθε ένα από τα οποία δίνει μια ξεχωριστή μέτρηση με βάση τις παραμέτρους που εξετάζουμε κάθε φορά. Όπως είναι λοιπόν φυσικό τα αποτελέσματα που προέρχονται από ανάλυση δειγμάτων στον κυτταρομετρητή ροής, παρέχουν μεγαλύτερη ακρίβεια και μειώνουν τις πιθανότητες στατιστικού σφάλματος. Ένα εξ' ίσου σημαντικό πλεονέκτημα που παρέχει στους ερευνητές η κυτταρομε-

τρια ροής, είναι η δυνατότητα ανάλυσης πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα, γεγονός που παρέχει πολλές πληροφορίες για ένα κύτταρο, όπως για παράδειγμα τον τύπο κυττάρου και το αν είναι ζωντανό αποπτωτικό ή νεκρωτικό.

5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής, να εξετάσουμε την επίδραση της απόπτωσης στους κύριους κυτταρικούς πληθυσμούς του ήπατος σηπτικών επίμυων, με στόχο την πληρέστερη κατανόηση της χρονικής κατανομής που εμφανίζει και την απόκτηση μιας γενικευμένης εικόνας του φαινομένου στο ήπαρ, καθώς και τη συσχέτιση της απόπτωσης, με τις λειτουργίες των κυττάρων του οργάνου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΑ

1.1. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Phosphate Buffered Saline (PBS) tablets (P4417) SIGMA-ALDRICH: Για την παρασκευή 1xPBS (PH 7.20 - 7.60) Διαλύουμε μία ταμπλέτα σε 200 ml dH₂O. Το PBS είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα ρυθμιστικά διαλύματα στη βιοχημεία. Είναι ισοτονικό διάλυμα και βοηθάει στη διατήρηση ενός σταθερού pH. Περιέχει Χλωριούχο Νάτριο, Φωσφορικό Νάτριο και σε ορισμένες περιπτώσεις Χλωριούχο Κάλιο και Φωσφορικό Κάλιο.

Paraformaldehyde reagent grade, crystalline (P6148) Sigma-Aldrich: Για την Παρασκευή Παραφορμαλδεϋδης 4% θερμαίνουμε 25ml PBS, προσθέτουμε 2g Παραφορμαλδεϋδη και ανακατεύουμε μέχρι να διαλυθεί. Προσθέτουμε 25 ml αποιονισμένου νερού και φιλτράρουμε το διάλυμα μέσα σε ένα δοχείο τοποθετημένο στον πάγο. Μόλις το διάλυμα κρυώσει είναι έτοιμο για χρήση.

Η Παραφορμαλδεϋδη συντηρεί ή μονιμοποιεί ιστούς ή κύτταρα συνδέοντας ανεπίστρεπτα τις κύριες αμινομάδες των πρωτεϊνών με άλλα γειτονικά άτομα Αζώτου σε πρωτεΐνες ή DNA μέσω μιας γέφυρας -CH₂- .

Saponin purum (16109) Riedel-de Haën: Χρησιμοποιούμε διάλυμα 10% σαπωνίνης σε 1xPBS. Οι σαπωνίνες συναντώνται σε διάφορα σημεία των φυτών και χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να προκαλούν αιμόλυση. Σε εργαστηριακές μελέτες χρησιμοποιούνται για την διάτρηση των μεμβρανών κύτταρων ή κυτταρικών οργανιδίων αν και δεν δημιουργούν οπές στην πυρηνική μεμβράνη γι αυτό και χρησιμοποιούνται κατά την ιστοχημεία ώστε να επιτρέπεται η πρόσβαση των αντισωμάτων στις ενδοκυττάρια πρωτεΐνες.

1.2. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

Polyclonal Rabbit Anti-Human Albumin/FITC (F0117) DAKO: Πολυκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε λαγό το οποίο έχει ως στόχο την αλβουμίνη του πλάσματος η οποία παράγεται από τα ηπατοκύτταρα και κατά συνέπεια συναντάται σε μεγάλες ποσότητες σε αυτά.

MOUSE ANTI-HUMAN MACROPHAGES:FITC (MCA874F). AbD serotec: Μονοκλωνικό αντίσωμα ισότυπου IgG1 κατασκευασμένο σε ποντικό. Έχει στόχο την πρωτεΐνη L1 ή καλπροτεκτίνη μια πρωτεΐνη του κυτταροπλάσματος που αποτελείται από μια άλφα αλυσίδα 12kD και μια βήτα αλυσίδα 14kD. [44] Η καλπροτεκτίνη είναι πρωτεΐνη που δεσμεύει ασβέστιο και εμφανίζει βακτηριοστατικές καθώς και μυκτοστατικές ιδιότητες *in vitro*. Συναντάται σε αφθονία στα ουδετερόφιλα όπου αποτελεί το 60% της πρωτεΐνης του κυτοσόλιου, χαμηλότερες συγκεντρώσεις απαντώνται στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα των ιστών. Το αντίσωμα κατασκευάζεται από τη σύντηξη κυττάρων του σπλήνα ανοσοποιημένων ποντικών BALB/c, με κύτταρα μυελώματος της κυτταρικής σειράς NS1 από ποντικό. Αν και το αντίσωμα έχει ως κύριο στόχο ανθρώπινα κύτταρα αντιδρά και με κύτταρα αρουραίου.

GOAT ANTI-RABBIT IgG (WHOLE MOLECULE) FITC CONJUGATE AFFINITY ISOLATED ANTIBODY (F 0382). SIGMA-ALDRICH: Αντίσωμα που έχει αναπτυχθεί στην κατσίκα και χρησιμοποιείται σαν δευτερεύον αντίσωμα για την σήμανση των μη άμεσα σημασμένων με χρωστική αντισωμάτων. Την φθορίζουσα χρωστική του αντισώματος αποτελεί η **Ισοθειοκυανική Φλουοροσκεΐνη (FITC)**, ένα φθοριόχρωμα με συχνές εφαρμογές στην κυτταρομετρία και την μικροσκοπία.

Rabbit Anti-Cow Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (Z0334) DAKO: Πολυκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε λαγό που έχει ως στόχο την GFAP μια δομική πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού που εντοπίζεται στο κυτοσόλιο. Αρχικά η GFAP είχε εντοπιστεί στα αστροκύτταρα του εγκεφάλου μετέπειτα έρευνες όμως έδειξαν ότι εντοπίζεται και στα κύτταρα Ito του ήπατος που αλλιώς ονομάζονται και ηπατικά αστροκύτταρα [45].

MOUSE ANTI-RAT RECA-1 (MCA970R). AbD serotec: Μονοκλωνικό αντίσωμα ισότυπου IgG1 κατασκευασμένο σε ποντικό. Έχει στόχο το **RECA-1**, ένα αντιγόνο της κυτταρικής επιφάνειας που εκφράζεται σε όλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αρουραίου. Κατασκευάζεται από τη σύντηξη κυττάρων του σπλήνα ανοσοποιημένων ποντικών με κύτταρα μυελώματος της κυτταρικής σειράς SP2/0 από ποντικό.

GOAT ANTI MOUSE IgG1: FITC (STAR81F). AbD serotec: Πολυκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε κατσίκια και χρησιμοποιείται σαν δευτερεύον αντίσωμα για την σήμανση των μη άμεσα σημασμένων με χρωστική αντισωμάτων. Την φθορίζουσα χρωστική του αντισώματος αποτελεί η **Ισοθειοκυανική Φλουοροσκεΐνη (FITC)**, ένα φθοριόχρωμα με συχνές εφαρμογές στην κυτταρομετρία και την μικροσκοπία.

7-AAD (559925) BD Pharmigen: [46] Η 7-Αμινο-Ακτινομυκίνη είναι μια φθορίζουσα χρωστική που προσδέεται στο δίκλωνο DNA ενδιάμεσα από βάσεις κυτοσίνης και γουανίνης και χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει αν τα κύτταρα που εξετάζονται είναι ζωντανά (μηδενική χρώση), αποπτωτικά (αχνή χρώση) ή νεκρωτικά (έντονη χρώση). Το πλεονέκτημα που εμφανίζει η χρωστική αυτή είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί παράλληλα με αντισώματα σημασμένα με Φυκοερυθρίνη (PE) ή Φλουοροσκεΐνη (FITC) σε ανάλυση δυο χρωμάτων με ελάχιστη αλληλοεπικάλυψη.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΗΨΗΣ ΣΕ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥΣ ΕΠΙΜΥΕΣ

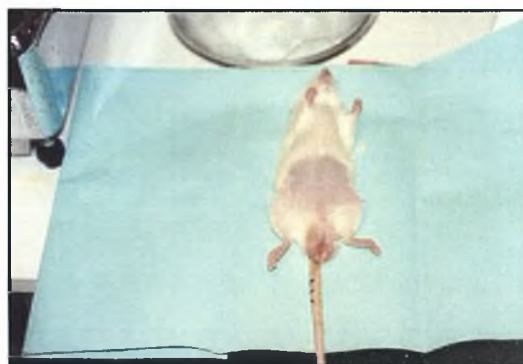
2.1.1. ΖΩΑ

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί αρουραίοι Wistar ελεύθεροι παθολογίων με βάρος 250g. Οι αρουραίοι παρέμειναν σε σταθερό περιβάλλον εντός του εργαστηρίου για 7 τουλάχιστον ημέρες πριν το πείραμα, σε σταθερές συνθήκες

θερμοκρασίας(20° C), ενώ είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και φαγητό καθ' όλο αυτό το διάστημα. Τα πειραματόζωα απομακρύνθηκαν από την τροφή και το νερό 24 ώρες πριν από τη διεξαγωγή της επέμβασης. Όλες οι απαραίτητες μεθοδολογίες σύμφωνα με τη φροντίδα και τον χειρισμό των ζώων εφαρμόστηκαν με βάση τις οδηγίες του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας, τις Ευρωπαϊκές Οδηγίες για Πειραματισμό σε Ζώα, υπό την επίβλεψη του Υπουργείου Υγείας της Ελλάδος και την έγκριση των αρμοδίων υπηρεσιών βιοηθικής της νομαρχίας Αθηνών.

2.1.2. ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΣΗΨΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΤΥΦΛΟΥ (Cecal Ligation and Puncture C.L.P.)

Αναισθησία προκλήθηκε με ενδομυϊκή χορήγηση κεταμίνης (60mg/kg σωματικού βάρους) και ξυλαζίνης (3mg/kg σωματικού βάρους) (Εικόνα 26). Υπό συνθήκες πλήρους ασηψίας έγινε μέση τομή μήκους 4 cm (Εικόνα 27), κινητοποίηση του τυφλού και εν συνεχεία μηχανική προώθηση του κοπρανώδους υλικού από το ανιόν προς το τυφλό (Εικόνα 28). Ακολούθησε απολίνωση κάτω από την ειλεοτυφλική βαλβίδα με ράμμα 3-0 μετάξι (Εικόνα 29). Η απολίνωση στο σημείο αυτό έγινε κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να διατηρείται η συνέχεια του λεπτού στο παχύ έντερο, αποτρέποντας τυχόν εντερική απόφραξη. Στη συνέχεια, με βελόνη 18G το τυφλό τρώθηκε σε δύο σημεία της αντιμεσεντερίου επιφανείας του (Εικόνα 30). Με λεπτές κινήσεις εξωθήθηκε κοπρανώδες υλικό μέσα από τις δύο οπές και το όργανο επανα-



Εικόνα 26:

Αρουραίοι βάρους 250 gr, στους οποίους προκλήθηκε αναισθησία, με ενδομυϊκή χορήγηση κεταμίνης-ξυλαζίνης.

Πηγή:

Εργαστήριο Χειρουργικής Έρευνας, Ά Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο.

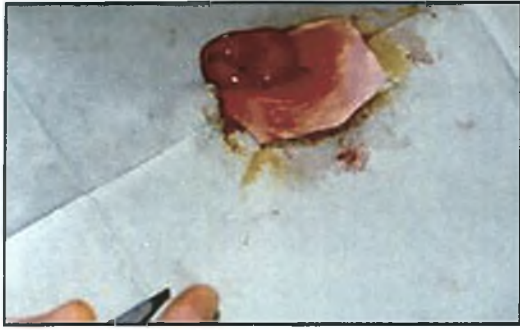


Εικόνα 27:

μέση τομή μήκους 4 cm, σε αναισθητοποιημένο αρουραίο.

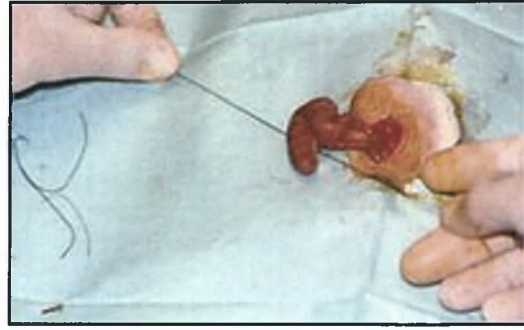
Πηγή:

Εργαστήριο Χειρουργικής Έρευνας, Ά Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο.



Εικόνα 28:
κίνητοποίηση του τυφλού και μηχανική προώθηση του κοπρανώδους υλικού, από το ανιόν προς το τυφλό.

Πηγή:
Εργαστήριο Χειρουργικής Έρευνας, Ά Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο.

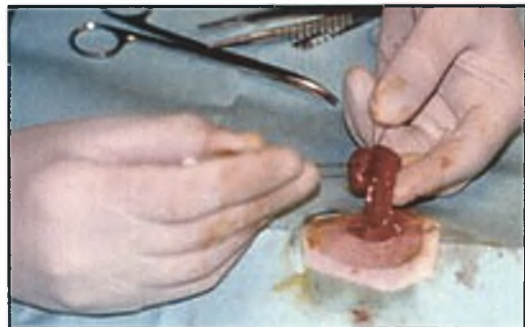


Εικόνα 29:
απολίνωση του τυφλού, κάτω από την ειλεοτυφλική βαλβίδα με ράμμα 3-0 μετάξι.

Πηγή:
Εργαστήριο Χειρουργικής Έρευνας, Ά Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο.

τοποθετήθηκε στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Η σύγκλειση του χειρουργικού τραύματος έγινε κατά στρώματα με ράμματα Nylon 3.0. Ακολούθησε υποδόρια έγχυση 0.9% NaCl σε δοσολογία 3 cc/100g βάρους σώματος, για την αντικατάσταση τυχόν απολεσθέντων υγρών κατά την επέμβαση. Μετά το τέλος της επέμβασης, όλα τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν σε κλουβιά με ελεύθερη πρόσβαση στην τροφή και το νερό.

Ευθανασία: Τα σηπτικά πειραματόζωα τα οποία υποβλήθηκαν σε απολίνωση και διπλή τρώση του τυφλού διαιρέθηκαν σε έξι υποομάδες (n=5 σε κάθε υποομάδα) και θανατώθηκαν με αφαίμαξη από την αριστερή κοιλία έπειτα από γενική αναισθησία στις 6, 12, 24, 36, 48 και 60 ώρες μετά την επέμβαση έτσι ώστε να μελετηθεί η πορεία της σήψης σε σχέση με το χρόνο. Αμέσως μετά τη θανάτωση κάθε πειραματόζωου του αφαιρέθηκε το ήπαρ και τοποθετήθηκε στους -80°C. Επίσης ήπαρ αφαιρέθηκε και από αρουραίους (n=5) στους οποίους δεν είχε προκληθεί σήψη και οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου.



Εικόνα 30:
τρώση του τυφλού, σε 2 σημεία της αντιμεσεντερίου επιφανείας του, με βελόνα.

Πηγή:
Εργαστήριο Χειρουργικής Έρευνας, Ά Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο.

2.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα στάδια που ακολουθούνται για την προετοιμασία των δειγμάτων ώστε αυτά να αναλυθούν μέσω του κυτταρομετρητή ροής είναι τα εξής:

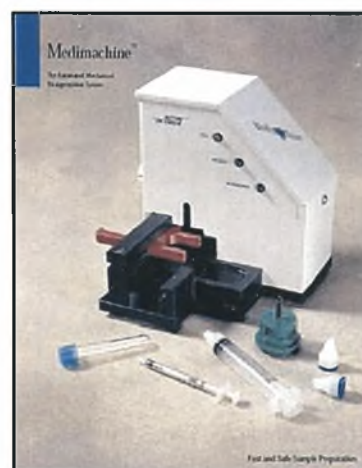
- Ομογενοποίηση δείγματος και απομόνωση κυττάρων.
- Μονιμοποίηση και διάτρηση κυτταρικών μεμβράνων.
- Επώαση κυττάρων με αντισώματα και φθορίζουσες χρωστικές.
- Μέτρηση έντασης φθορισμού στον κυτταρομετρητή ροής.

2.2.1. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1. Μέρος του ήπατος κόπηκε σε τμήματα 2,5 mm³ κατά προσέγγιση, τα οποία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ένα Medicon (BD Biosciences, San Jose, CA) (Εικόνα 31) μαζί με 1ml 1xPBS. Το Medicon είναι ένας θάλαμος από πολυστυρένιο που περιέχει έναν περιστροφικό αναδευτήρα ο οποίος προωθεί το περιεχόμενο μέσα από έναν δίσκο από ανοξείδωτο ατσάλι που διαθέτει περίπου 100 εξαγωνικές οπές η κάθε μία εκ των οποίων περικλείεται από έξι μικρολεπίδες. Στη συνέχεια το Medicon εισήχθη στο Medimachine (BD Biosciences) (Εικόνα 32) και περιστράφηκε στις 100rpm για 15s. Το κυτταρικό εναιώρημα που προέκυψε φιλτραρίστηκε με τη βοήθεια ενός Filcon (BD



Εικόνα 31:
Medicon (BD Biosciences, San Jose, CA).



Εικόνα 32:
Medimachine (BD Biosciences).

Biosciences) (Εικόνα 33), Μιας συσκευής φιλτραρίσματος μιας χρήσης.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δυο φορές ώστε να απομονωθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων.



Εικόνα 33:
Falcon (BD Biosciences).

2. Το αιώρημα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε στις 2000gpm για 10min.
3. Έγινε απόρριψη του υπερκειμένου.
4. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 3-4ml 1xPBS
5. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 5 σωληνάκια κυτταρομετρίας στα οποία προστέθηκαν 70-180 μl από το εναιώρημα των κυττάρων ανάλογα με την πυκνότητα των κυττάρων που παρατηρούταν στο εκάστοτε δείγμα.

2.2.2. ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Για να μπορέσουν τα αντισώματα που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια να περάσουν στο εσωτερικό των κυττάρων και να προσδεθούν στους στόχους τους, απαιτείται η αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών καθώς επίσης και η μονιμοποίηση των κυττάρων ώστε να σταματήσουν όλες οι φυσιολογικές τους διεργασίες.

Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων σε ένα διάλυμα μονιμοποίησης και διάτρησης των κυτταρικών μεμβρανών το οποίο αποτελείται από:

- 625μl 4% Παραφορμαλδεΰδη
- 25μl 10% Σαπωνίνη
- 1850μl 1xPBS

Από το παραπάνω διάλυμα προστέθηκαν 250μl σε κάθε σωληνάκι κυτταρομετρίας.

Τα σωληνάκια επώαστηκαν για 20min στους 4°C.

Στη συνέχεια στα σωληνάκια προστέθηκαν 500μl 1xPBS, και φυγοκεντρήθηκαν στις 2000rpm για 10min και έπειτα απορρίφθηκε η περίσσεια υπερκειμένου.

2.2.3. ΕΠΩΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

Τα πέντε σωληνάκια κυτταρομετρίας στα οποία μοιράστηκε το δείγμα μας σημαίνουν ως εξής ανάλογα με τα αντισώματα και τις χρωστικές που προστέθηκαν σε καθένα από αυτά.

Cells only. Περιέχει μόνο μονιμοποιημένα κύτταρα χωρίς την προσθήκη καμίας χρωστικής ή αντισώματος το σωληνάκι αυτό χρησιμοποιείται ως τυφλό.

Albumin/7-AAD.

Macrophages/7-AAD.

Τα παραπάνω σωληνάκια κατασκευάζονται με αντισώματα τα οποία είναι άμεσα σημασμένα με φθορίζουσα χρωστική.

GFAP/7-AAD.

RECA-1/7-AAD.

Τα παραπάνω σωληνάκια, περιέχουν αντισώματα τα οποία δεν είναι σημασμένα με φθοριοχρώματα (GFAP, RECA-1) και έτσι ο φθορισμός επιτυγχάνεται έμμεσα, με την επιπλέον προσθήκη φθοριοχρώματος.

Αναλυτικά ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

Albumin/7-AAD. Προστέθηκαν 1μl Albumin.

Macrophages/7-AAD. Προστέθηκαν 7μl macrophages.

- Τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν για 20min σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανάδευση.
- Προστέθηκαν 2μl 7-AAD σε κάθε σωληνάκι και πραγματοποιήθηκε επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανάδευση.
- Συμπληρώθηκαν 500μl 1xPBS και τα δείγματα ήταν έτοιμα για μέτρηση.

GFAP/7-AAD. Έγινε αραίωση του GFAP 1:100 (0,25μl GFAP + 25μl 1xPBS) και προστέθηκαν 25μl.

RECA-1/7-AAD. Προστέθηκαν 2μl RECA-1.

- Τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν για 60min σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανάδευση.
- Προστέθηκαν 500μl 1xPBS, και τα σωληνάκια φυγοκεντρήθηκαν στις 2000rpm για 10min και έπειτα απορρίφθηκε η περίσσεια υπερκευμένου.
- Προστέθηκαν 25μl από τη χρωστική FITC (**F 0382. SIGMA-ALDRICH**) σε αραίωση 1:100 (0,5μl FITC + 50μl 1xPBS) σε κάθε σωληνάκι με GFAP.
- Προστέθηκαν 25μl από τη χρωστική FITC (**STAR81F. AbD serotec**) σε αραίωση 1:100 (0,5μl FITC + 50μl 1xPBS) σε κάθε σωληνάκι με RECA-1.
- Τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν για 90min σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανάδευση.
- Προστέθηκαν 500μl 1xPBS, και τα σωληνάκια φυγοκεντρήθηκαν στις 2000rpm για 10min και έπειτα απορρίφθηκε η περίσσεια υπερκευμένου.
- Προστέθηκαν 2μl 7-AAD σε κάθε σωληνάκι και πραγματοποιήθηκε επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανάδευση.
- Συμπληρώθηκαν 500μl 1xPBS και τα δείγματα ήταν έτοιμα για μέτρηση.

2.2.4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΤΑΣΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ ΡΟΗΣ

Οι μετρήσεις της έντασης φθορισμού έγιναν στον κυτταρομετρητή ροής COULTER® EPICS® XL-MCL™ (Εικόνα 34). Οι φθορίζουσες χρωστικές διεγέρθηκαν με ένα laser Αργού στα 488nm. Ο φθορισμός της χρωστικής FITC ανιχνεύθηκε μέσα από ένα φίλ-



Εικόνα 34:

Ο κυτταρομετρητής ροής που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα COULTER® EPICS® XL-MCL™

τρο στα 520nm και ο φθορισμός του 7AAD ανιχνεύθηκε μέσα από ένα φίλτρο στα 650nm. Για τη συλλογή των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ένα καρτεσιανό σύστημα συντεταγμένων όπου αναλύθηκε η οριζόντια και η κατακόρυφη διασπορά των κυττάρων προκειμένου να εξαιρεθούν τα τμήματα των κατεστραμμένων κυττάρων καθώς και τυχόν συσσωματώματα ή άλλα σωματίδια από τον γενικό κυτταρικό πληθυσμό. Για κάθε δείγμα μετρήθηκαν τουλάχιστον 10.000 κύτταρα.

Τα δεδομένα παρουσιάζονται σε ποσοστιαία αναλογία επί του συνόλου των κυττάρων του ομογενοποιημάτος.

2.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

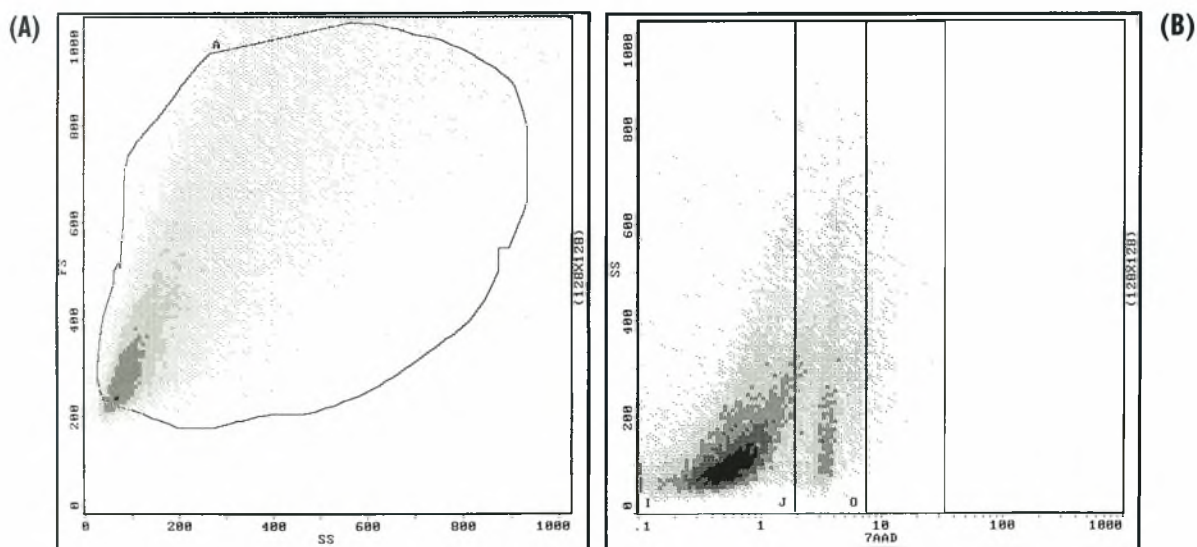
Τα δεδομένα παρουσιάζονται, σαν μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα. Για τον έλεγχο της χρονικής κατανομής των μεταβλητών χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές μέθοδοι (**Kruskal-Wallis Test**). Για τον έλεγχο μεταξύ δυο ποσοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχες μη παραμετρικές μέθοδοι (**Mann-Whitney test**). Στατιστικά σημαντικές διαφορές θεωρούνται εκείνες στις οποίες η τιμή p είναι $< 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

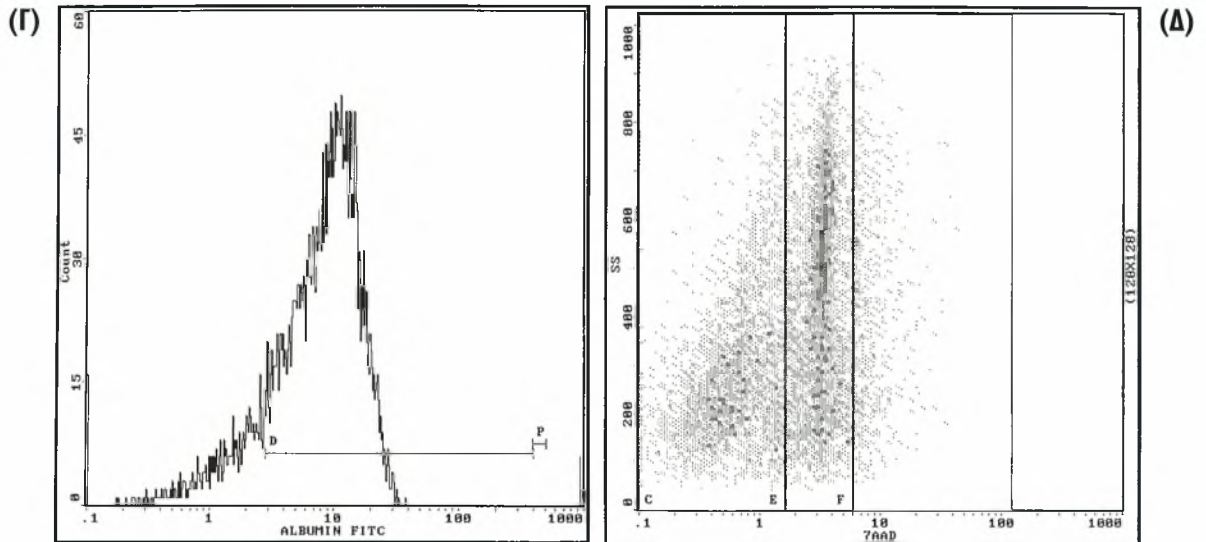
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σ τον κυτταρομετρητή ροής, ο κάθε κυτταρικός πληθυσμός, εμφανίζεται με τη μορφή κουκίδων σε ένα καρτεσιανό σύστημα συντεταγμένων, με βάση την οριζόντια και κατακόρυφη διασπορά του. Ανάλογα με τις παραμέτρους που μελετάμε σε κάθε διάγραμμα του κυτταρομετρητή ροής, μπορεί να εμφανίζεται, εκτός από το μέγεθος του κυττάρου που ανιχνεύεται και η ένταση του φθορισμού του σε κάποια χρωστική, η οποία μας δίνει δεδομένα για τον τύπο ή την βιωσιμότητα του κυττάρου.

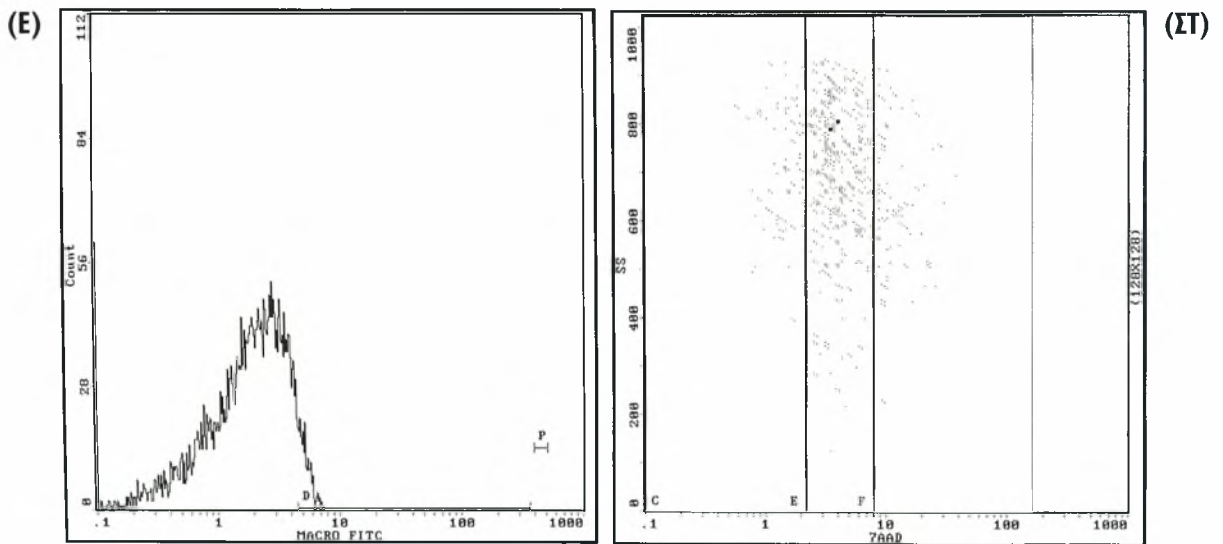
Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα δέκα διαγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν στον κυτταρομετρητή ροής, για την επιλογή του εκάστοτε κυτταρικού πληθυσμού και την μελέτη της απόπτωσης και της νέκρωσης, με βάση την ένταση φθορισμού που προέρχεται από την πρόσδεση των αντισωμάτων στα κύτταρα.



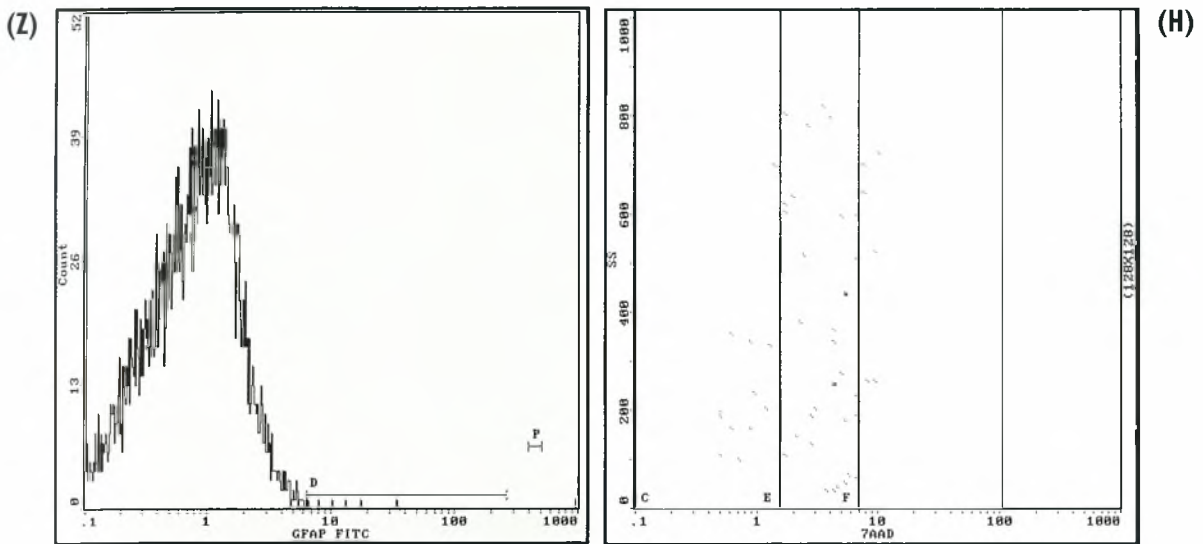
(Α) Οι κουκίδες αποτελούν το σύνολο των ηπατικών κυτταρικών πληθυσμών, με βάση την οριζόντια (SS) και κατακόρυφη (FS) διασπορά τους. Όσο πιο μεταποτισμένα είναι τα κύτταρα, στις μεγαλύτερες τιμές των αξόνων, τόσο μεγαλύτερο είναι και το μέγεθός τους. **(Β)** Η ολική απόπτωση και νέκρωση των ηπατικών κυτταρικών πληθυσμών, με βάση τον φθορισμό του 7-AAD. Ο τομέας I αντιπροσωπεύει τα ζωντανά κύτταρα, ο J τα αποπτωτικά και ο O τα νεκρωτικά.



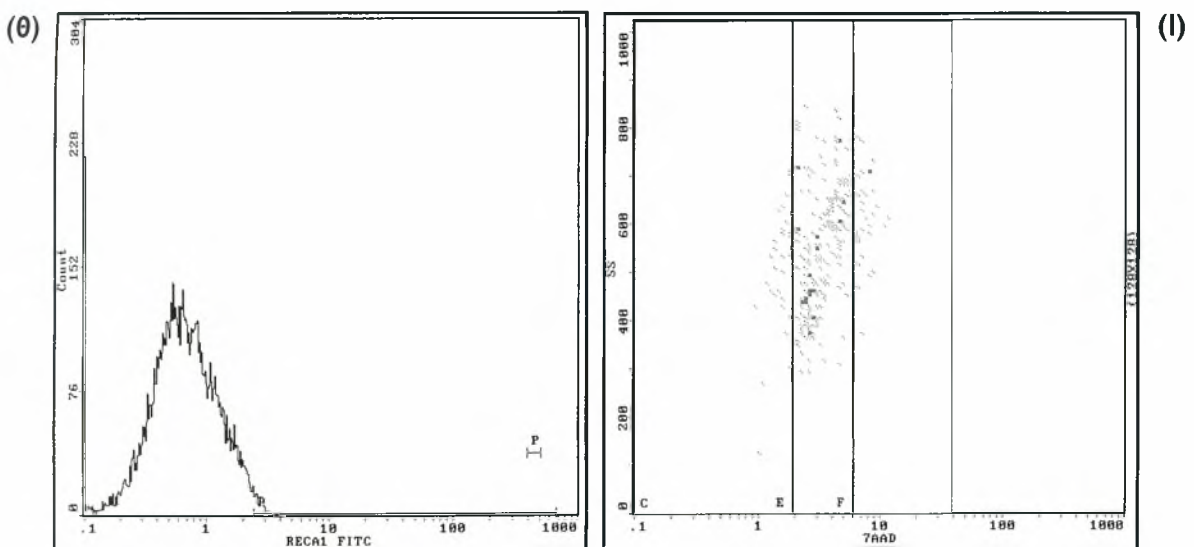
(Γ) Επιλογή των ηπατοκυττάρων, με βάση την έκφραση αλβουμίνης. (Δ) Απόπτωση και νέκρωση των ηπατοκυττάρων, με βάση τον φθορισμό του 7-AAD. Ο τομέας C αντιπροσωπεύει τα ζωντανά κύτταρα, ο E τα αποπτωτικά και ο F τα νεκρωτικά.



(Ε) Επιλογή των μακροφάγων, με βάση την έκφραση καλπροτεκτίνης (LI). (ΣΤ) Απόπτωση και νέκρωση των μακροφάγων, με βάση τον φθορισμό του 7-AAD. Ο τομέας C αντιπροσωπεύει τα ζωντανά κύτταρα, ο E τα αποπτωτικά και ο F τα νεκρωτικά.



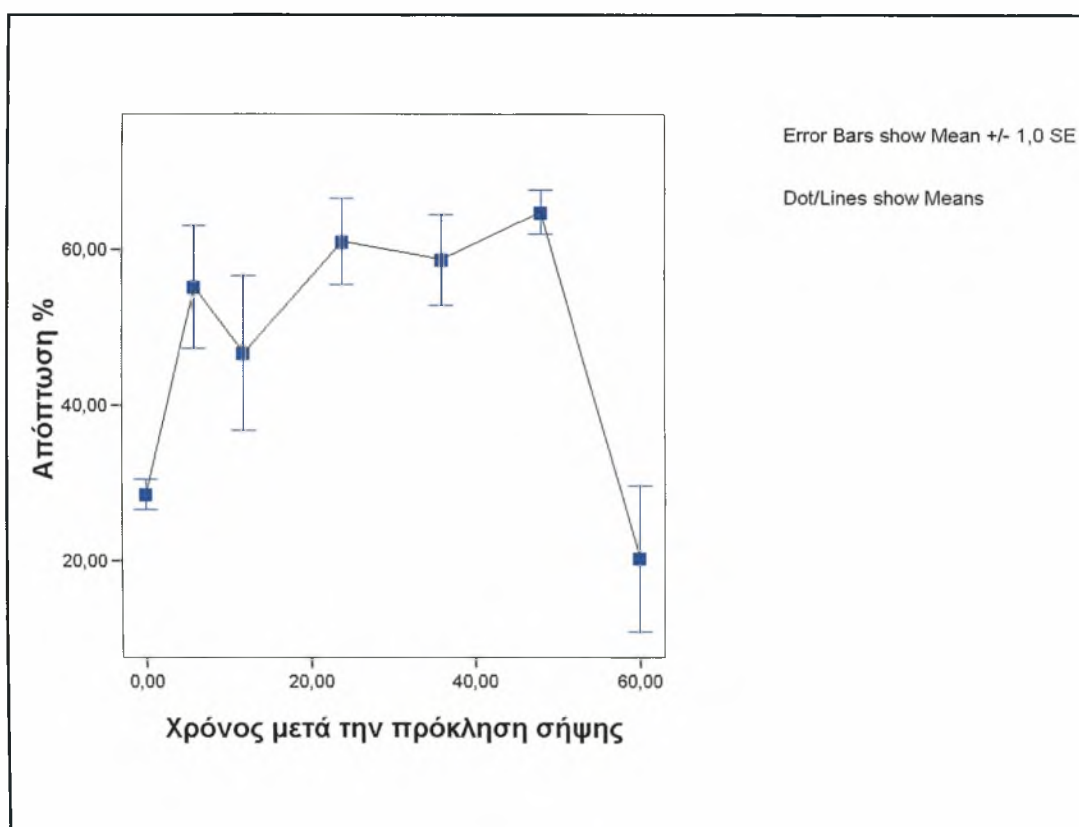
(Z) Επιλογή των κυττάρων Ito, με βάση την έκφραση της GFAP. **(H)** Απόπτωση και νέκρωση των κυττάρων Ito, με βάση τον φθορισμό του 7-AAD. Ο τομέας C αντιπροσωπεύει τα ζωντανά κύτταρα, ο E τα αποπτωτικά και ο F τα νεκρωτικά.



(θ) Επιλογή των ενδοθηλιακών κυττάρων, με βάση την έκφραση του RECA-I. **(I)** Απόπτωση και νέκρωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, με βάση τον φθορισμό του 7-AAD. Ο τομέας C αντιπροσωπεύει τα ζωντανά κύτταρα, ο E τα αποπτωτικά και ο F τα νεκρωτικά.

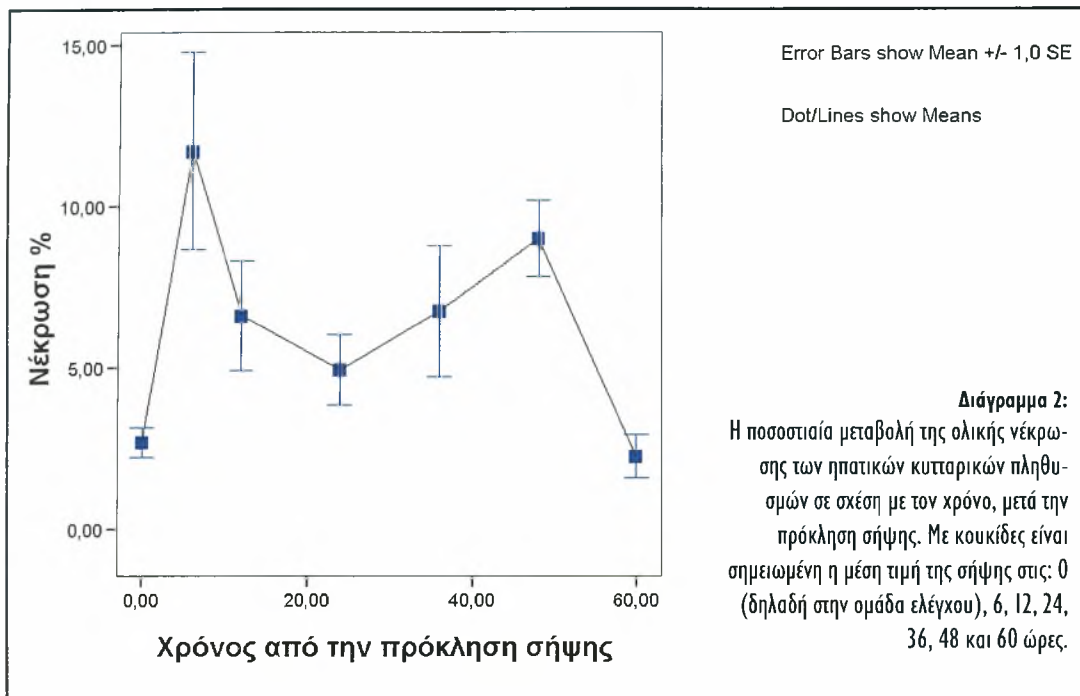
Με βάση την εικόνα της απόπτωσης και της νέκρωσης, που εμφανίζουν οι διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί του ήπατος, σε συγκεκριμένες ώρες (ομάδα ελέγχου, 6, 12, 24, 36, 48, 60) μετά την πρόκληση σήψης σε αρσενικούς επίμυες, ακολούθησε συγκέντρωση και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Η κατανομή της ολικής απόπτωσης, μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των αρουραίων στους οποίους προκλήθηκε σήψη, βρέθηκε να αυξάνεται ($p=0,029$). Η ολική απόπτωση (**Διάγραμμα 1**) σε σχέση με τον χρόνο, φαίνεται να αυξάνεται απότομα μετά την πρόκληση της σήψης και να παραμένει αυξημένη μέχρι τις 60 ώρες, όπου μειώνεται σε χαμηλά επίπεδα ($p=0,01$).



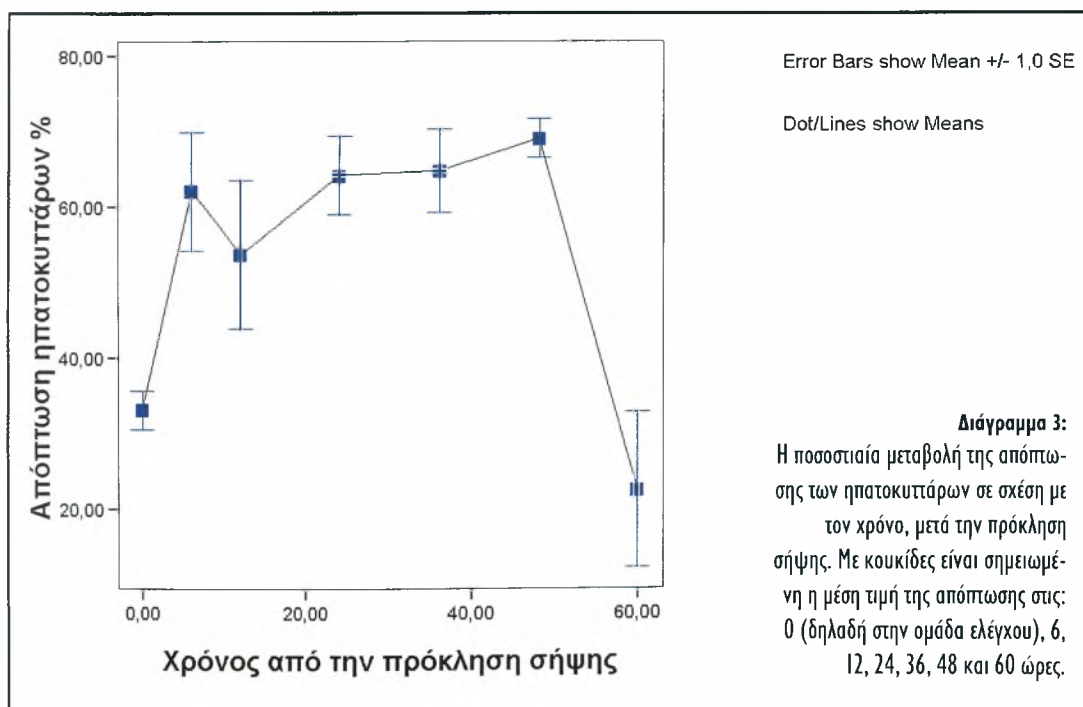
Διάγραμμα 1:
Η ποσοστιαία μεταβολή της ολικής απόπτωσης των ηπατικών κυτταρικών πληθυσμών σε σχέση με τον χρόνο, μετά την πρόκληση σήψης. Με κουκίδες είναι σημειωμένη η μέση τιμή της απόπτωσης στις: 0 (δηλαδή στην ομάδα ελέγχου), 6, 12, 24, 36, 48 και 60 ώρες.

Μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των σηπτικών επίμυων, η ολική νέκρωση αυξάνεται ($p=0,025$). Η αύξηση της ολικής νέκρωσης (**Διάγραμμα 2**) με τον χρόνο, ακολουθεί δικόρυφη κατανομή με μέγιστες τιμές στις 6 και τις 48 ώρες, ενώ και αυτή

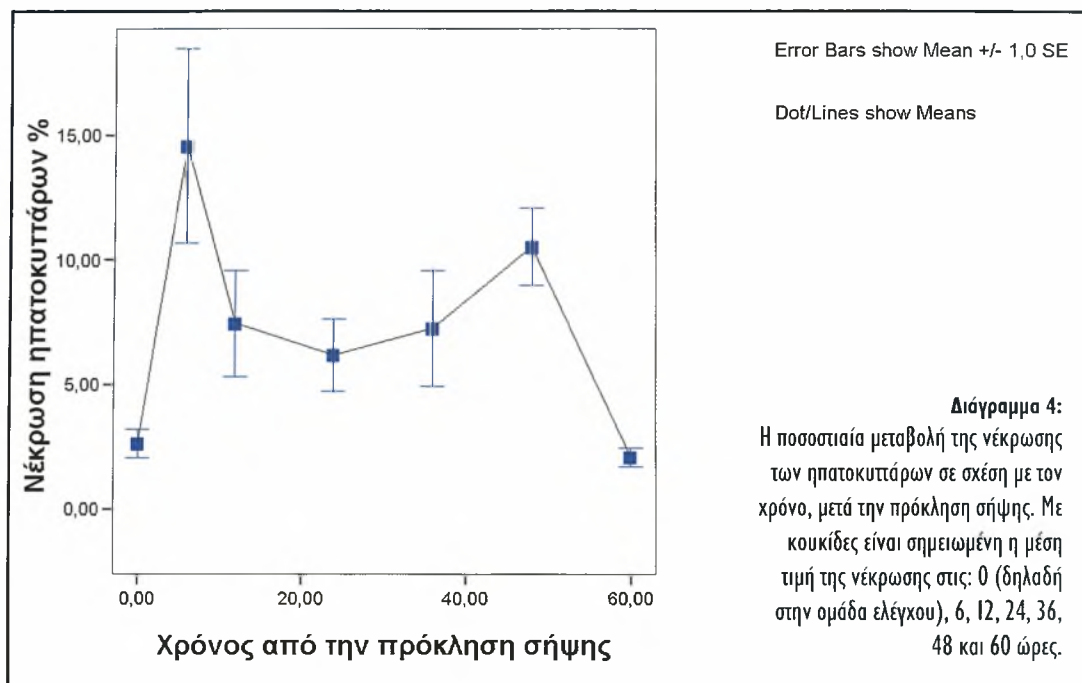


όπως και η απόπτωση πέφτει σε χαμηλά επίπεδα στις 60 ώρες ($p=0,007$).

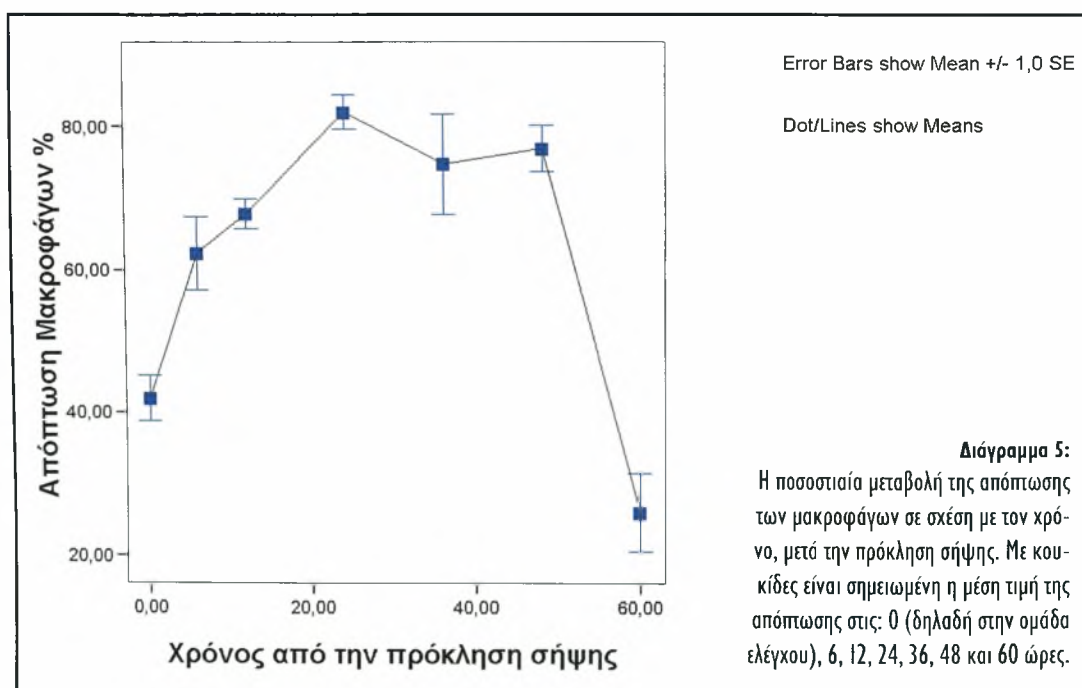
Η απόπτωση των ηπατοκυττάρων αυξάνεται στους σηπτικούς αρουραίους σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0,019$). Η εικόνα της απόπτωσης στα ηπατοκύτταρα (Διάγραμμα 3), εμφανίζει σταθερά αυξημένες τιμές σε σχέση με το χρόνο, όπως και η ολική απόπτωση και μειώνεται στις 60 ώρες ($p=0,012$).



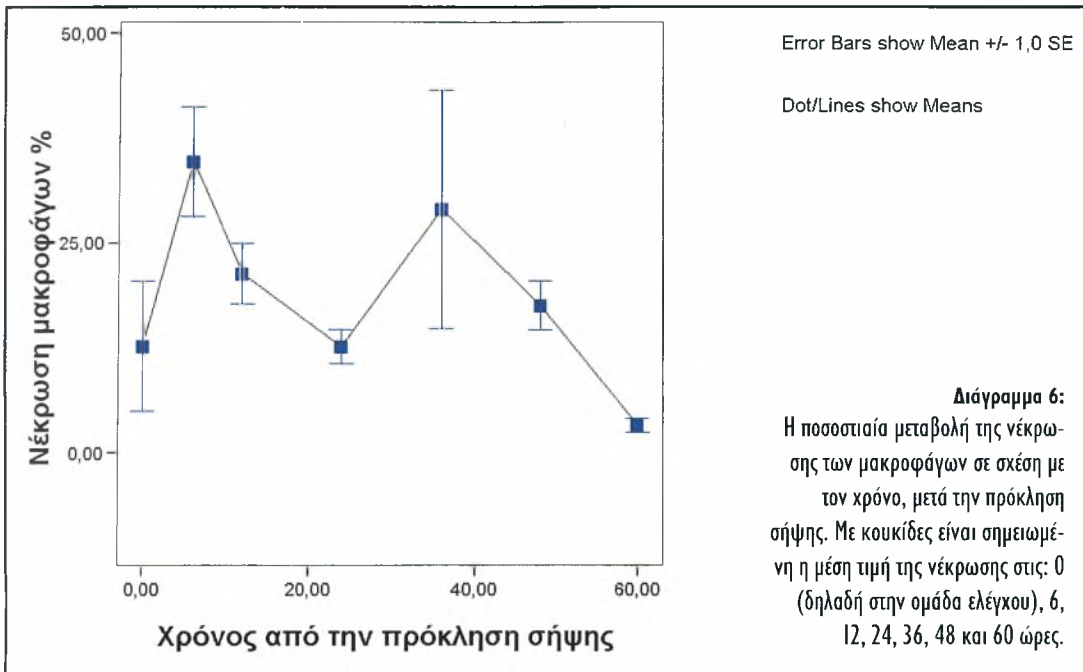
Η νέκρωση των ηπατοκυττάρων (**Διάγραμμα 4**) όπως και η ολική νέκρωση, ακολουθεί δικόρουφη κατανομή σε σχέση με το χρόνο με μεγαλύτερες τιμές στις 6 και τις 48 ώρες ($p=0,004$). Επίσης η νέκρωση των ηπατοκυττάρων, αυξάνεται στους σηπτικούς αρουραίους σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0,008$).



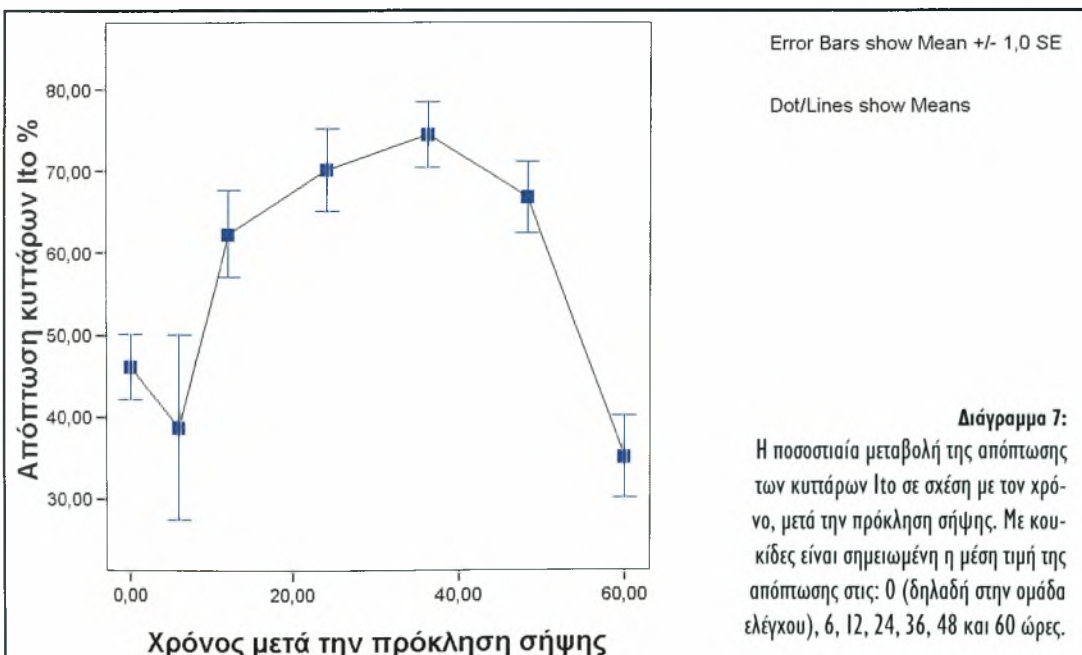
Η απόπτωση των μακροφάγων (**Διάγραμμα 5**) βρέθηκε να αυξάνεται σταδιακά από τις 6 μέχρι τις 48 ώρες, ενώ μειώθηκε απότομα στις 60 ώρες ($p<0,001$).



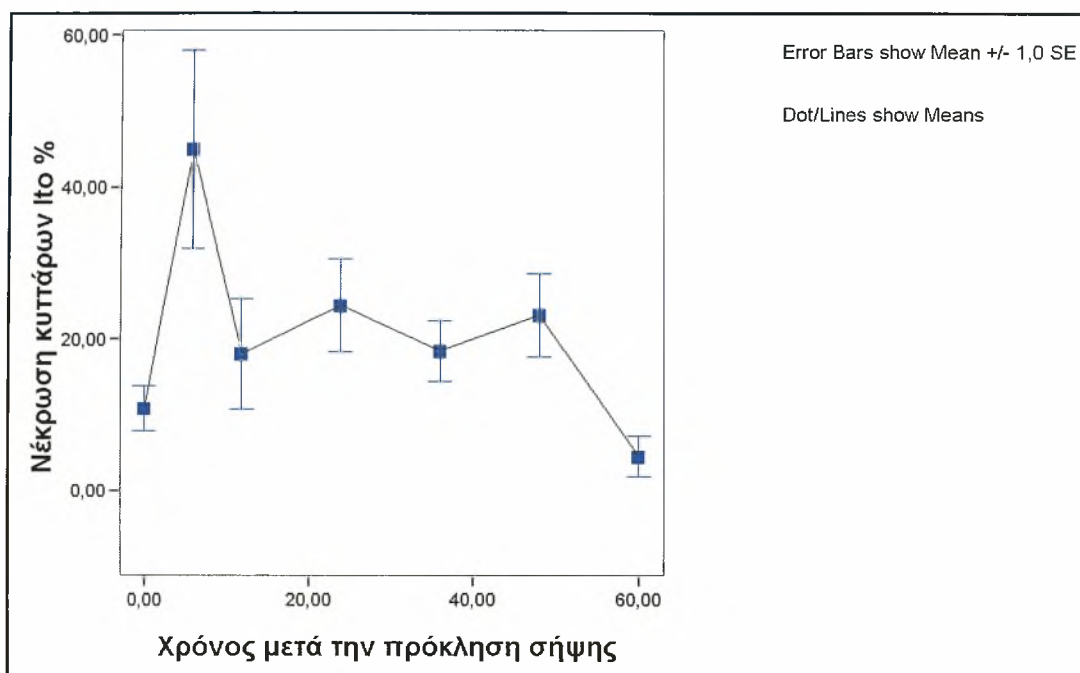
Αντίθετα η νέκρωση των μακροφάγων (Διάγραμμα 6) παρουσιάζει δύο κορυφές στις 6 και τις 36 ώρες και μειώνεται στις 60 ώρες ($p=0,009$). Η απόπτωση των μακροφάγων, αυξήθηκε στους σηπτικούς αρουραίους σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0,008$), ενώ η μεταβολή της νέκρωσης στις δύο ομάδες δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική.



Η αύξηση της απόπτωσης των κυττάρων Ito (Διάγραμμα 7), ξεκινά μετά από μια μικρή πτώση στις 6 ώρες και συνεχίζεται σταδιακά μέχρι τις 48 ώρες όπου μειώνεται και τελικά πέφτει σε χαμηλές τιμές στις 60 ώρες ($p=0,003$).



Η νέκρωση στα κύτταρα Ito (**Διάγραμμα 8**) εμφανίζει μια κορυφή στις 6 ώρες μετά την πρόκληση της σήψης, ενώ πέφτει σε σταθερά επίπεδα από τις 12 μέχρι τις 48 ώρες με μία τελική μείωση στις 60 ώρες ($p=0,049$). Η μεταβολή της απόπτωσης και της νέκρωσης μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των σηπτικών αρουραίων δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική.

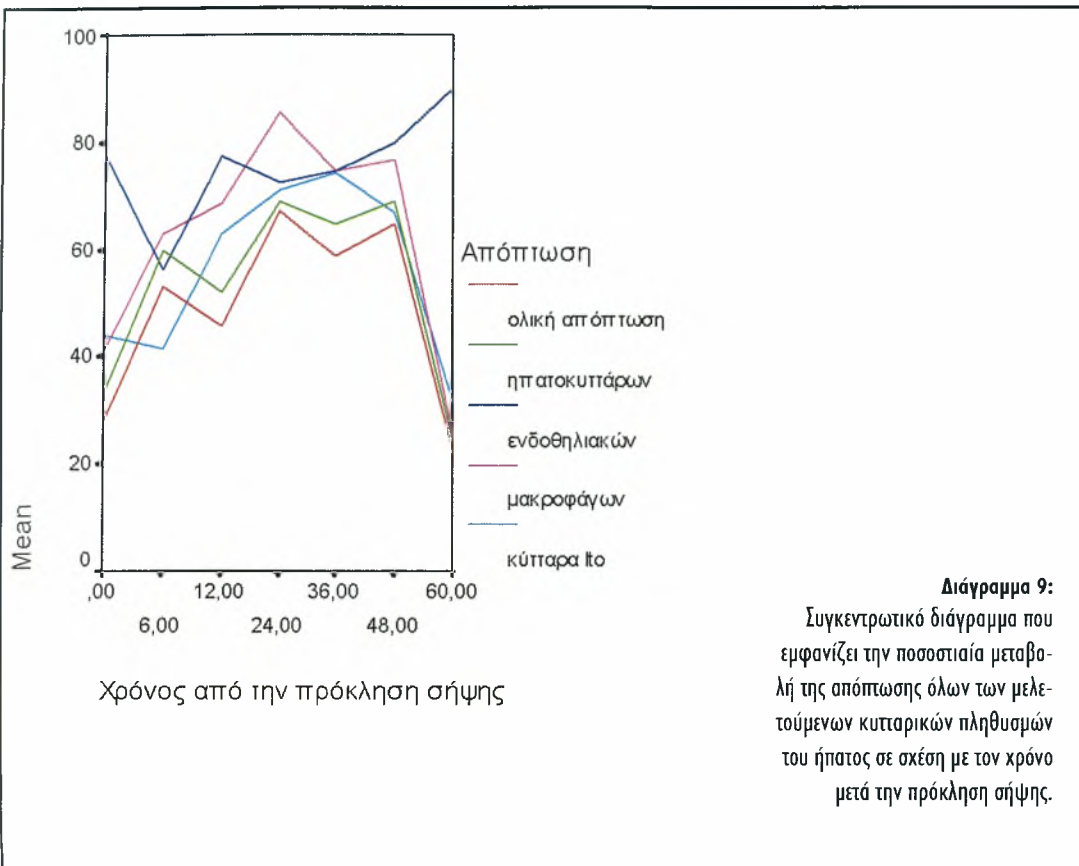


Διάγραμμα 8:

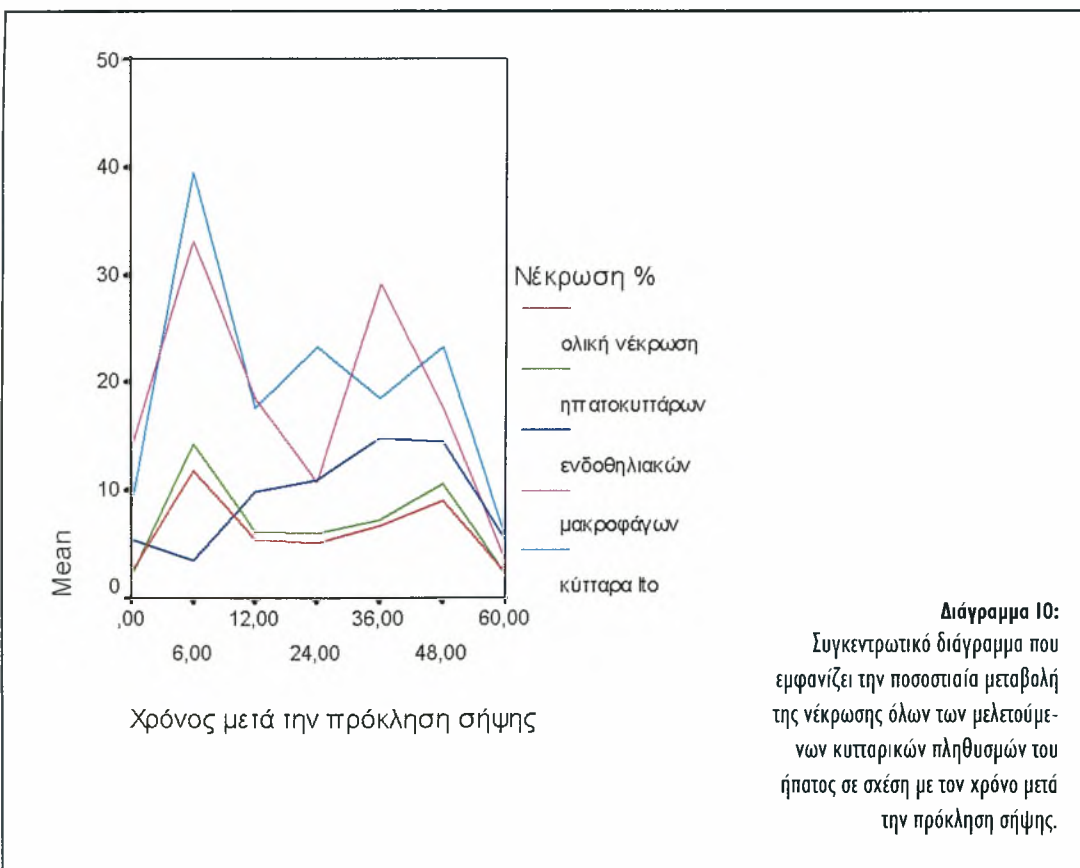
Η ποσοστιαία μεταβολή της νέκρωσης των κυττάρων Ito σε σχέση με τον χρόνο, μετά την πρόκληση σήψης. Με κουκίδες είναι σημειωμένη η μέση τιμή της νέκρωσης στις: 0 (δηλαδή στην ομάδα ελέγχου), 6, 12, 24, 36, 48 και 60 ώρες.

Η απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων μειώνεται απότομα στις 6 ώρες, επανέρχεται στα αρχικά της επίπεδα στις 12 ώρες και αυξάνεται σταδιακά μέχρι τις 60 ώρες. Η νέκρωση των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από μια πτώση στις 6 ώρες, αυξάνεται μέχρι τις 48 ώρες και τελικά μειώνεται στα αρχικά επίπεδα στις 60 ώρες. Οστόσο οι χρονικές αυτές κατανομές δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές.

Τέλος η απόπτωση (**Διάγραμμα 9**) και η νέκρωση (**Διάγραμμα 10**) όλων των πληθυσμών ξεχωριστά τοποθετούνται σε κοινά διαγράμματα ώστε να μπορούμε να πάρουμε μια συνολική εικόνα της επίδρασης της σήψης στους διαφορετικούς ηπατικούς κυτταρικούς πληθυσμούς.



Διάγραμμα 9: Συγκεντρωτικό διάγραμμα που εμφανίζει την ποσοστιαία μεταβολή της απόπτωσης όλων των μελετούμενων κυτταρικών πληθυσμών του ήπατος σε σχέση με τον χρόνο μετά την πρόκληση σήψης.



Διάγραμμα 10: Συγκεντρωτικό διάγραμμα που εμφανίζει την ποσοστιαία μεταβολή της νέκρωσης όλων των μελετούμενων κυτταρικών πληθυσμών του ήπατος σε σχέση με τον χρόνο μετά την πρόκληση σήψης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά την πρόκληση σήψης μέσω του πειραματικού μοντέλου που ακολουθήθηκε (CLP), η ραγδαία αύξηση του μικροβιακού φορτίου και των τοξινών στην κυκλοφορία, προάγουν την φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού και προωθούν τον θάνατο πολλών κυτταρικών πληθυσμών του οργανισμού. Σύμφωνα με την παρούσα μελέτη, διαπιστώνουμε ότι η απόπτωση είναι ο κύριος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου που ακολουθείται κατά τη σήψη, στους εξεταζόμενους κυτταρικούς πληθυσμούς του ήπατος. Αντίθετα η νέκρωση η οποία παρά την ποσοστιαία της αύξηση, παραμένει σε σχετικά χαμηλά επίπεδα στους περισσότερους τύπους κυττάρων του οργάνου.

Συγκεκριμένα η ολική νέκρωση δεν ξεπερνάει το 15% στις 6 ώρες από την πρόκληση σήψης, ενώ η ολική απόπτωση υπερβαίνει το 60% στις 48 ώρες μετά την πρόκληση σήψης.

Η αύξηση του ποσοστού της νέκρωσης στους περισσότερους πληθυσμούς κυττάρων παρατηρείται στις 6 ώρες, ενώ το ποσοστό της απόπτωσης αρχίζει να αυξάνεται αργότερα και αγγίζει τις μέγιστες τιμές του στις 48 ώρες. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί, από το γεγονός ότι η νέκρωση δεν αποτελεί ένα ελεγχόμενο τύπο κυτταρικού θανάτου, αλλά απαντάται συνήθως σαν απόκριση του κυττάρου σε τραύμα. Για αυτό το λόγο κατά τις πρώτες ώρες μετά την πρόκληση σήψης, τα ποσοστά της νέκρωσης αυξάνονται ως αποτέλεσμα οξείας φλεγμονώδους αντίδρασης του οργανισμού, με αποτέλεσμα τον θάνατο πολλών κυττάρων μέσω του μη ελεγχόμενου μηχανισμού της νέκρωσης.

Αντίθετα, η απόπτωση αποτελεί έναν ελεγχόμενο μηχανισμό κυτταρικού θανάτου και η μεγαλύτερη αύξησή της σημειώνεται στις 48 ώρες, όταν πλέον τα κύτταρα έχουν εξαντλήσει τις δυνατότητες άμυνάς τους απέναντι στα παθογόνα και λόγω των βλαβών τους αποπίπτουν, ώστε να περιοριστούν οι επιδράσεις της σήψης στον οργανισμό.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειώσουμε, ότι η σήψη που προκαλείται στους αρουραίους μέσω του πειραματικού μοντέλου C.L.P., λόγω των δραματικών επιδράσεων της στον οργανισμό, οδηγεί σε θάνατους περιορισμένο αριθμό ζώων πριν να φτάσει η στιγμή αυτά να θανατωθούν, ώστε να τους αφαιρεθεί το ήπαρ. Αυτό κυρίως οφείλεται, σε αδυναμία του οργανισμού στην καταπολέμηση των μικροβιακών παραγόντων και στον αυξημένο κυτταρικό θάνατο, που οδηγεί σε βλάβες και ανεπάρκεια πολλών οργάνων. Αυτό όμως που αξίζει κυρίως να παρατηρήσουμε, είναι πως τα ζώα που θα επιβιώσουν μέχρι τις 60 ώρες, θεωρείται πως έχουν διαφύγει τον κίνδυνο. Η εικόνα αυτή είναι ξεκάθαρη στα πειραματικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν, αφού παρατηρείται σαφής μείωση της απόπτωσης και της νέκρωσης, σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς, στα δείγματα που προέρχονταν από ζώα που θανατώθηκαν στις 60 ώρες μετά την πρόκληση σήψης.

Εξετάζοντας ξεχωριστά τα δεδομένα που προέκυψαν για την απόπτωση και τη νέκρωση, στους διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς του ήπατος, διαπιστώνουμε ότι τα ηπατοκύτταρα, είναι ο τύπος κυττάρου, που αντιπροσωπεύει και τη γενική εικόνα της απόπτωσης και της νέκρωσης του συνόλου των κυττάρων του ήπατος. Αυτό είναι φυσικό, αν σκεφτούμε ότι τα ηπατοκύτταρα, αποτελούν το 80-85% της συνολικής κυτταρικής σύστασης του οργάνου.

Τα δεδομένα από την ανάλυση των κυτταρικών πληθυσμών, μας αποκαλύπτουν ότι η μεταβολή της απόπτωσης είναι μικτή και κάθε τύπος κυττάρου, εμφανίζει αύξηση της απόπτωσης με διαφορετικό ρυθμό και ένταση, γεγονός που αντικατοπτρίζει τις ξεχωριστές λειτουργίες κάθε κυτταρικού τύπου. Πιο συγκεκριμένα το ποσοστό αύξησης της απόπτωσης των ηπατοκυττάρων, είναι μεγαλύτερο (στις 6 ώρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου), από αυτό που εμφανίζουν τα μακροφάγα και τα κύτταρα Ito (των οποίων η απόπτωση εμφανίζει ποσοστιαία μείωση στις 6 ώρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου). Αυτή η αντίσταση που επιδεικνύουν τα μακροφάγα και τα κύτταρα Ito στην απόπτωση, μπορεί να αποδοθεί στην εμπλοκή τους, στους μηχανισμούς ανοσίας του οργανισμού, μια και εμφανίζουν μεγάλες δυνατότητες φαγοκυττάρωσης και λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, εκφράζοντας στις κυτταρικές τους μεμβράνες μόρια MHC τάξης I και II και εκκρίνοντας κυτταροκίνες, που βοηθούν στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων.

Συμπερασματικά, η περαιτέρω μελέτη και στατιστική ανάλυση της επίδρασης του φαινομένου της απόπτωσης, σε κάθε κυτταρικό τύπο του ήπατος μας παρέχει πλη-

ροφορίες, για τον τρόπο που επιδρά η σήψη στους διάφορους πληθισμούς του ήπατος και μελλοντικά μπορεί να βοηθήσει στην ανάπτυξη μιας στοχευμένης θεραπείας της απόπτωσης στη σήψη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] David Zakim Thomas D. Boyer Hepatology A Textbook of liver disease SAUNDERS
- [2] Irwin M. Arias THE LIVER BIOLOGY AND PATHOBIOLOGY LIPPINCOT WILLIAMS & WILKINS PUBLICATIONS
- [3] Charles E. Corneliu Hepatic Ontogenesis Hepatology Vol.5, No.6, pp.1213-1221, 1985
- [4] M.S. Rao, et al. Characterization of Pancreatic-Type Tissue in the Liver of Rat Induced by Polychlorinated Biphenyls The Journal of Histochemistry and Cytochemistry Vol. 34, No. 2, pp. 197-201, 1986
- [5] Tomoharu Tamagawa et al. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro Human Cell 2007; 20: 77-84
- [6] Ye Chen et al. Differentiation of Mouse Bone Marrow Stromal Stem Cells Into Hepatocytes Induced by Conditioned Culture Medium of Hepatocytes Journal of Cellular Biochemistry 102:52-63 (2007) In Vitro
- [7] IAN R MACKAY Hepatoimmunology: A perspective Immunology and Cell Biology (2002) 80, 36-44
- [8] Antonio Martinez-Hernandez et al. The hepatic extracellular matrix. Virchows Archiv A Pathol Anat (1993) 423: 1-11
- [9] Antonio Martinez-Hernandez et al. The extracellular matrix in hepatic regeneration FASEBJ. 9, 1401-1410 (1995)
- [10] Filip Braet et al. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review Comparative Hepatology 2002, 1:1
- [11] Shigeki Arii et al. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury J. Hepatobiliary Pancreat. Surg (2000) 7: 40-48
- [12] A. C. Munthe-Kaas Phagocytosis in rat Kupffer cells in vitro Experimental Cell

Research 99 (1976) 319-327

[13] Rakesh Bhatnagar et al. Superoxide Release by Zymosan-Stimulated Rat Kupffer Cells in vitro Eur. J. Biochem. 119 171 -175 (1981)

[14] Lisa Riccalton-Banks et al. A simple method for the simultaneous isolation of stellate cells and hepatocytes from rat liver tissue Molecular and Cellular Biochemistry 248: 97–102, 2003.

[15] Previews Immunity 26, January 2007

[16] Florian Winau et al. Ito Cells Are Liver-Resident Antigen-Presenting Cells for Activating T Cell Responses Immunity 26, 117–129, January 2007

[17] Haruki Senoo et al. Vitamin A-Storing Cells (Stellate Cells) Vitamins and Hormones, Volume 75

[18] Florian Winau et al. Starring stellate cells in liver immunology Current Opinion in Immunology 2008, 20:68–74

[19] Haruki Senoo Structure and function of hepatic stellate cells Med Electron Microsc (2004) 37:3–15

[20] Bin Gao et al. Liver: An Organ with Predominant Innate Immunity Hepatology, (REVIEWS) Vol. 47, No. 2, 2008

[21] Vito Racanelli et al. The Liver as an Immunological Organ Hepatology, Vol. 43, No. 2, Suppl. 1, 2006

[22] Ketan Sheth et al. The liver as an immune organ Current Opinion in Critical Care 2001, 7:99–104

[23] Suzanne Norris et al. Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes Journal of Hepatology 1998; 28: 84–90

[24] Mohamed A Morsy et al. Isolation, purification and flow cytometric analysis of human intrahepatic lymphocytes using an improved technique Laboratory Investigation (2005) 85, 285–296

[25] Derek G. Doherty et al. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver Immunological Reviews 2000 Vol. 174: 5–20

[26] George A. Parker et al. Invited Review: Liver Immunobiology Toxicol Pathol 2005; 33; 52

[27] Andrew A. Butler et al. Insulin-Like Growth Factor-I: Compartmentalization Within the Somatotrophic Axis News Physiol Sci 17: 82_85, 2002;

[28] Nidia Basso et al. History About the Discovery of the Renin-Angiotensin System

Hypertension 2001;38:1246-1249

[29] Miyazaki H et al. Thrombopoietin: biology and clinical potentials. *Int J Hematol.* 1999 Dec;70(4):216-25

[30] George K. Michalopoulos et al. *Liver Regeneration Science* 276, 60 (1997)

[31] Shafritz et al. Liver Stem Cells and Prospects for Liver Reconstitution by Transplanted Cells *Hepatology* 43:89-98 (2006)

[32] Thorgeirsson, S. S. Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J.* 10,1249-1256(1996)

[33] Michael Oertel et al. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation *Biochimica et Biophysica Acta* 1782 61–74 (2008)

[34] Nakopoulou L. Et al. Apoptosis, cancer and therapy, Review article *Αρχαία Παθολογικής Ανατομικής Τόμος 11ος Τεύχος 1ο*

[35] Sergio Huerta et al. Screening and Detection of Apoptosis *Journal of Surgical Research* 139, 143–156 (2007)

[36] R. Schulte-Hermann et al. Apoptosis in the liver and its role in hepatocarcinogenesis *Cell Biology and Toxicology.* 1997; 13: 339-348

[37] Isabel Fabregat et al. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer *Liver International* ISSN 1478-3223

[38] Caroline Oberholzer et al. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration *The FASEB Journal* Vol. 15 April 2001

[39] Marion MacFarlane TRAIL-induced signalling and apoptosis *Toxicology Letters* 139 (2003) 89_97

[40] Saeid Ghavami et al. Apoptosis in liver diseases – detection and therapeutic applications *Med Sci Monit,* 2005; 11(11): RA337-345

[41] A. Lekkou et al. The pathogenesis of sepsis syndrome and the role of immunomodulation *Archives of Hellenic Medicine* 2002, 19(6):614–625

[42] RogerC. Bone, et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis *Chest* 1992; 101:1644-55

[43] Edward Abraham et al. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction *Crit Care Med* 2007 Vol. 35, No. 10

[44] Editorial Faecal calprotectin: a bright future for assessing disease activity in Crohn's disease *Q J Med* 2002; 95:557–558

[45] Neubauer et al. Glial fibrillary acidic protein - a cell type specific marker for Ito

cells in vivo and in vitro *Journal of Hepatology* 1996; 24: 719-730

[46] Philpott et al. The Use of 7-Amino Actinomycin D in Identifying Apoptosis: Simplicity of Use and Broad Spectrum of Application Compared With Other Techniques *Blood* 87 (6): 2244. (1996)

ΔΙΚΤΥΑΚΟΙ ΤΟΠΟΙ

- (1) <http://www.vivo.colostate.edu>
- (2) <http://en.wikipedia.org/wiki/Liver>
- (3) <http://panacea.med.uoa.gr>
- (4) <http://www.meddean.luc.edu/lumen/meded/orfpath/pathtitl.htm>
- (5) <http://www.uwgi.org/gut/default.asp>
- (6) <http://www.courseweb.uottawa.ca/medicine-histology/English/Gastrointestinal/Liver.htm>
- (7) http://www.med-ed.virginia.edu/public/CourseSitesDocs/CellandTissueStructure/handouts/unrestricted/original/MMHndt_Liver.html
- (8) <http://www.exetasis.gr/kuttarometria>
