ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Αναστάσιος Ε. Γερμενής

Διδακτορική Διατριβή

«ΤΟ NLRP3 ΦΛΕΓΜΟΝΟΣΩΜΑ ΣΤΗΝ ΧΡΟΝΙΑ ΙΟΓΕΝΗ ΗΠΑΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ»

υπό

ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑ

Βιολόγου, BSc,MRes

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2017

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

© 2017 ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (2η/11-10-2017 ΓΣ):

1ος Εξεταστής (Επιβλέπων)	**Αναστάσιος Ε. Γερμενής** Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2ος Εξεταστής	**Ματθαίος Σπελέτας** Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3ος Εξεταστής	**Ευθυμία Πετεινάκη** Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
4ος Εξεταστής	**Κωνσταντίνος Ι. Γουργουλιάνης** Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
5ος Εξεταστής	**Γεώργιος Κουκούλης** Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
6ος Εξεταστής	**Χρυσή Χατζόγλου** Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
7ος Εξεταστής	**Σωτήρης Ζαρογιάννης** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Ονοματεπώνυμο: **Μολυβδάς Αδάμ**

Ημερομηνία γεννήσεως: 08 – 10– 1983

Τόπος γεννήσεως: Σινσιννάτι, Οχάιο, ΗΠΑ

Οικογενειακή κατάσταση: Άγαμος

Διεύθυνση κατοικίας: Θησέως 3, Κηφισιά, Αθήνα 14564.

Τηλ.: 2108075195 / 6985126248

Διεύθυνση εργασίας: Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας

Τμήμα Ιατρικής – Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

GR-41500 Βιόπολις - Λάρισα - Ελλάδα

Tel.: +302410-685690

e-mail: adammolyvdas@gmail.com

Μέση εκπαίδευση: Σχολή Μωραΐτη, 2001

International Baccalaureate, Βαθμός απολυτηρίου: 36/45

Ξένες Γλώσσες: Αγγλικά

ΤΙΤΛΟΙ ΚΑΙ ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ

1. M.Sc. by Research in Biomedical Sciences - Edinburgh University, Title: Mice deficient to large conductance voltage and calcium regulated potassium channels are hyporesponsive to the immunological stressor Interleukin 1-β. The degree was awarded in June 2011. Officially recognised by DOATAP (3-1857).
2. B.Sc. in Biological Sciences with Honours (Physiology) - Edinburgh University. Graduated 2007 with a High II.1 grade (67.38%). Thesis Title: Membrane Targeting of the Strex BK channel C-terminus. Officially recognised by DOATAP (3-28/2011).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. The role of the NLRP3 inflammasome and the activation of IL-1β in the pathogenesis of chronic viral hepatic inflammation. **Submitted. Adam Molyvdas**, Urania Georgopoulou, Nikolaos Lazaridis, Prodromos Hytiroglou, Alexios

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Dimitriadis, Pelagia Foka, Themistoklis Vassiliadis, Georgia Loli, Athanasios Phillipidis, Pantelis Zebekakis, Anastasios E. Germenis, Matthaios Speletas, and Georgios Germanidis.

2. Palmitoylation gates phosphorylation-dependent regulation of BK potassium channels. Tian L, Jeffries O, McClafferty H, **Molyvdas A**, Rowe IC, Saleem F, Chen L, Greaves J, Chamberlain LH, Knaus HG, Ruth P, Shipston MJ. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 30;105(52):21006-11. Epub 2008 Dec 19.

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

1. 2012-2013: Research and lab assistant Al. Fleming BSRC – Professor Kollias, Dr Kostourou Athens, Greece.
2. 2011-2012: Compulsory military service, Greek army medical core.
3. 2010-2011: IT in parts department of Subaru Motors Hellas, Athens, Greece.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Germanidis G, **Molyvdas A**, Lasaridis N, Vassiliadis T, Voumvouraki A, Laspa E, et al. P0569: Liver inflammasome expression signaling may be activated in patients with chronic hepatitis B and repressed during long term antiviral treatment. Journal of hepatology. 2015;62:S528-S9. **Poster.**
2. Germanidis G, **Molyvdas A**, Loli G, Hytiroglou P, Vassiliadis T, Lazaridis N, et al. The NLRP3 inflammasome is activated in liver tissue of patients with newly diagnosed chronic hepatitis B virus infection. Journal of hepatology.66(1):S485-S6. **Poster.**
3. **Molyvdas A**, Georgopoulou U, Vassiliadis T, Hytiroglou P, Germenis A E, Germanidis G, Speletas M. OP17: The role of the NLRP3 inflammasome and the activation of IL-1β in the pathogenesis of chronic viral hepatic inflammation. 9th International congress of internal medicine. March 2017. **Oral presentation**.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

«ΤΟ NLRP3 ΦΛΕΓΜΟΝΟΣΩΜΑ ΣΤΗΝ ΧΡΟΝΙΑ ΙΟΓΕΝΗ ΗΠΑΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ»

ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Αναστάσιος Ε. Γερμενής** Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας **(Επιβλέπων)**
2. **Ματθαίος Σπελέτας** Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Ευθυμία Πετεινάκη** Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη Διατριβής για το ΕΑΔΔ **9**

Abstract of dissertation for National Archive of PhD Theses **11**

Συντομογραφίες **13**

Πρόλογος και Ευχαριστίες **16**

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **18**

1. Το ηπατικό μικροπεριβάλλον **19**

2. Οξεία και χρόνια ηπατίτιδα **21**

3. Φλεγμονοσώματα: σηματοδότηση, ενεργοποίηση και ρύθμιση **22**

4. Η οικογένεια κυτταροκινών ιντερλευκίνης-1 (IL-1F) **27**

5. Το φλεγμονόσωμα στα ηπατικά νοσήματα **31**

5.1 Ηπατική ίνωση **31**

5.2 Αλκοολική ηπατική νόσος (ALD) **32**

5.3 Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) **33**

5.4 Ιογενείς ηπατίτιδες **35**

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **37**

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ **38**

1.1 Ασθενείς και μάρτυρες **38**

1.1.1 Βιοψίες 39

1.2 Μέθοδοι **41**

1.2.1 Έκφραση γονιδίων σε βιοψίες 42
1.2.1.1 Εκχύλιση RNA 42
1.2.1.2 Σύνθεση cDNA 45
1.2.1.3 Έκφραση γονιδίων 45
1.2.2 Έκφραση γονιδίων σε καλλιεργημένα κύτταρα 47
1.2.3 Στατιστική ανάλυση 48

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ **49**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

2.1 Γονιδιακή έκφραση των συστατικών του NLRP3 φλεγμονοσώματος στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες 49

2.1.1 Έκφραση του γονιδίου IL1B 50
2.1.2 Έκφραση του γονιδίου CASP1 51
2.1.3 Έκφραση του γονιδίου NLRP3 52
2.1.4 Έκφραση του γονιδίου ASC 53
2.1.5 Έκφραση του γονιδίου IL1RA 54

2.2 Γονιδιακή έκφραση των συστατικών του NLRP3 φλεγμονοσώματος σε σχέση με την φλεγμονή και την ίνωση 55

2.3 Γονιδιακή έκφραση του NLRP3 φλεγμονοσώματος σε σχέση με τα ορολογικά χαρακτηριστικά 67

2.4 Γονιδιακή έκφραση σε κυτταροκαλλιέργιες μετά από in vitro επιμόλυνση με HCV 69

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 71

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 79

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Περίληψη Διατριβής για το ΕΑΔΔ

Τίτλος: Το NLRP3 φλεγμονόσωμα στην χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή.

Εισαγωγή: Η χρόνια ιογενής ηπατίτιδα είναι μια διαδεδομένη ασθένεια με σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Τα τελευταία χρόνια, *in vitro* δεδομένα και δεδομένα από δείγματα περιφερικού αίματος υποδεικνύουν ένα ρόλο για την IL-1β και το NLRP3 φλεγμονόσωμα.

Στόχος: Διερεύνηση του ρόλου της IL-1β και του NLRP3 φλεγμονοσώματος στην παθοφυσιολογία της χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας.

Μέθοδοι: Οι βιοψίες του ήπατος ελήφθησαν από ασθενείς με πρόσφατα διαγνωσθείσα χρόνια ηπατίτιδα Β (CHB), ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β σε ύφεση (CHB-rem) και ασθενείς με νεοδιαγνωσθείσα χρόνια ηπατίτιδα C (CHC). Οι βιοψίες χωρίστηκαν σε δύο μέρη. Το πρώτο μέρος εξετάστηκε ιστολογικά για να προσδιοριστεί ο βαθμός της φλεγμονής και της ίνωσης. Από το δεύτερο μέρος, εκχυλίστηκε RNA και μετατράπηκε σε cDNA. Το cDNA χρησιμοποιήθηκε σε ημι-ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) για τη μέτρηση των επιπέδων *IL1B, CASP1, NLRP3, ASC* και *IL1RA*. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στα *in vitro* πειράματα ήταν Huh7.5, LX2 και THP-1 σε ποικιλία συνδυασμών μονοκαλλιεργειών, συν-καλλιεργειών και τριπλών καλλιεργειών με μία από τις κυτταρικές σειρές που έχουν μολυνθεί με κλώνο JFH-1. Από τις κυτταροκαλλιέργειες εκχυλίστηκε RNA και μετατράπηκε σε cDNA. Για τις κυτταρικές γραμμές, μετρήθηκε η έκφραση των γονιδίων *IL1B* και *NLRP3*.

Αποτελέσματα: Η έκφραση των *IL1B, CASP1* και *NLRP3* είναι σημαντικά διαφορετική μεταξύ των ομάδων ($p = 0.001$, $p = 0.001$ και $p = 0.038$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς με CHB εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα mRNA *IL1B* και *CASP1* συγκριτικά με τους ασθενείς με CHB-rem και CHC. Η έκφραση *IL1B* συσχετίζεται σημαντικά με τα βιοχημικά δεδομένα του ήπατος σε ασθενείς με CHB (AST: $\rho = 0,006$, $r = 0,457$, ALT $\rho = 0,002$, $r = 0,497$). Τέλος, τα επίπεδα mRNA του *IL1B* σε ασθενείς με CHB συσχετίζονται σημαντικά με τον βαθμό φλεγμονής ($p =$

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

0,016) αλλά όχι με το στάδιο της ίνωσης (p = 0,362). Τα *in vitro* αποτελέσματα δείχνουν αύξηση της έκφρασης *IL1B* σε μονοκαλλιέργειες μια αύξηση που εξαφανίζεται σε τριπλές καλλιέργειες.

Συμπέρασμα: Η IL-1β πιθανόν να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της χρόνιας ηπατικής φλεγμονής από τον HBV, αλλά όχι από τον HCV.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Abstract of dissertation for National Archive of PhD Theses

Title: The role of the NLRP3 inflammasome and the activation of IL-1β in the pathogenesis of chronic viral hepatic inflammation.

Background: Chronic viral hepatitis is a prevalent disease with major health implications. The mechanisms that are involved in the pathophysiology of chronic viral hepatitis are not fully understood. In recent years, in vitro data and data from peripheral blood samples suggest a role for IL-1β and the NLRP3 inflammasome.

Aim: To investigate the role of IL-1β and the NLRP3 inflammasome in the pathophysiology of chronic viral hepatitis.

Methods: Liver biopsies were obtained from patients with newly diagnosed chronic hepatitis B (CHB), patients with chronic hepatitis B in remission (CHB-rem) and patients with newly diagnosed chronic hepatitis C (CHC). The biopsies were separated in two parts. The first part was examined histologically to determine the grade of inflammation and fibrosis. From the second part, RNA was extracted and converted to cDNA. The cDNA was used in semi-quantitative Real-Time PCR to measure the levels of *IL1B, CASP1, NLRP3, ASC* and *IL1RA.* The cell lines used in the *in vitro* experiments were Huh7.5, LX2 and THP-1 in variety of combinations of monocultures, co-cultures and triple cultures with one of the cell lines infected with JFH-1 clone. From the cell cultures RNA was extracted and converted to cDNA. For cell lines, we focused in the expression of *IL1B* and *NLRP3.*

Results: The expression of *IL1B*, *CASP1* and *NLRP3* are significantly different between our groups (p=0.001, p=0.001 and p=0.038, respectively). CHB patients displayed significantly higher *IL1B* and *CASP1* mRNA levels compared to both CHB-rem and CHC patients. *IL1B* expression significantly correlates with liver biochemical data in CHB patients (AST: p=0.006, r=0.457; ALT p=0.002, r=0.497). Finally, mRNA levels of *IL1B* in CHB patients significantly correlate with the degree of inflammation (p=0.016) but not the stage of fibrosis (p=0.362). The in vitro results show an increase in *IL1B* expression in monocultures an increase that is not observed in triple cultures.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Conclusion: IL-1β might play an important role in the pathogenesis of chronic hepatic inflammation from HBV, but not from HCV.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Συντομογραφίες

AIM2 (Absent In Melanoma 2): Πρωτεΐνη απούσα από το μελάνωμα 2

ALD (Alcoholic Liver Disease): Αλκοολική Νόσος του Ήπατος

ALT (alanine transaminase): αμινοτρανσφεράση της αλανίνης

ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD): Πρωτεΐνη ASC

AST (aspartate transaminase): ασπαρτική αμινοτρανσφεράση

ATP (Adenosine Tri-Phosphate): τριφωσφορική αδενοσίνη

CASP-1 (Caspase-1): κασπάση-1

pro-CASP-1 (pro-Caspase-1): πρώιμη κασπάση-1

CASP-11 (Caspase-11): κασπάση-11

CCL2 (chemokine (C-C motif) ligand 2): χημειοκίνη προσδέτης με C-C μοτίβο 2

DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns): μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με κίνδυνο

DCs (Dendritic Cells): δενδριτικά κύτταρα

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): θρεπτικό DMEM

FCS (Foetal Calf Serum): Ορό εμβρύου μόσχου

HCC (Hepatocellular Carcinoma): ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

HAV (Hepatitis A Virus): ιός της ηπατίτιδας A

HBV (Hepatitis B Virus): ιός της ηπατίτιδας B

HCV (Hepatitis C Virus): ιός της ηπατίτιδας C

HDV (Hepatitis D Virus): ιός της ηπατίτιδας D

HEV (Hepatitis E Virus): ιός της ηπατίτιδας E

HIN200 (hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens with 200 amino acid repeats): πρωτεϊνική δομή HIN200

HMGB1 (High mobility group box 1): πρωτεΐνη HMGB1

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

HSCs (Hepatic Stellate Cells): ηπατικά αστεροειδή κύτταρα

IL-18 (Interleukin-18): Ιντελευκίνη-18

pro-IL-18 (pro-Interleukin-18): πρώιμη Ιντερλευκίνη-18

IL-1F (Interleukin-1 Family): οικογένεια Ιντερλευκίνης-1

IL-1R (Interleukin-1 Receptor): υποδοχέας Ιντερλευκίνης-1

IL-1ra (Interleukin-1 Receptor Antagonist): ανταγωνιστής του πρωτεϊνικού υποδοχέα της IL-1

IL-1α (Interleukin-1α): Ιντερλευκίνη-1α

IL-1β (Interleukin-1β): Ιντερλευκίνη-1β

pro-IL-1β (pro-Interleukin-1β): πρώιμη Ιντερλευκίνη-1β

IL-33 (Interleukin-33): Ιντελευκίνη-33

IL-36 (Interleukin-36): Ιντελευκίνη-36

IL-37 (Interleukin-37): Ιντελευκίνη-37

IL-38 (Interleukin-38): Ιντελευκίνη-38

LRR (leucine-rich repeat): Επαναλαμβανόμενο μοτίβο πλούσιο σε λευκίνη

LSECs (Liver Sinusoidal Endothelial Cells): κολποειδή ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος

MCD (methionine-choline deficient diet): δίαιτα ελλιπής σε μεθιονήνη και χολίνη

MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88): Πρωτεΐνη MyD88

NACHT [NAIP (neuronal apoptosis inhibitor protein), C2TA (class 2 transcription activator, of the MHC), HET-E (heterokaryon incompatibility) and TP1 (telomerase-associated protein 1)]: Πρωτεϊνική δομή NACHT

NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease): Μη αλκοολική Λιπώδης Νόσος του Ήπατος

NASH (Non-Alcoholic Steatohepatitis): Μη Αλκοολική Στεατοηπατίτιδα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

NF-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells): πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας NF-kB

NLRC (NLR family CARD domain-containing protein): NLR πρωτεΐνη που περιέχει και δομή CARD

NLRP (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein): Πρωτεΐνη που περιέχει τις δομές NACHT, LRR και PYD

NLRP3 (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3): Πρωτεΐνη 3 που περιέχει τις δομές NACHT, LRR και PYD

NLRs (NOD-Like Receptors): NOD-ανάλογοι υποδοχείς,

P2X7 (P2X purinoceptor 7): P2X πουρινοϋποδοχέας 7

PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns): μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνα

PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells): Μονοπύρηνα Κύτταρα Περιφερικού Αίματος

PYD (PYRIN domain): Πρωτεϊνική δομή PYRIN

PYHIN (Pyrin and Hin domain protein): Πρωτεΐνη με δομές Pyrin και Hin

ROS (Reactive Oxygen Species): δραστικές ρίζες οξυγόνου

RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium): θρεπτικό RP#MI

ST2 (Interleukin 1 receptor-like 1, also known as IL1RL1): Υποδοχέας ST2

T2DM (Type 2 Diabetes Mellitus): σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

TGF-β1 (Transforming growth factor β1): αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β1

Th2 (T-helper type 2): Τ-βοηθητικά τύπου 2

TLR (Toll Like Receptors): υποδοχείς τύπου Toll

TNF (Tumour Necrosis Factor): παράγοντας νέκρωσης όγκων

Treg (T-regulatory cell): Τ-ρυθμιστικό κύτταρο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Πρόλογος και Ευχαριστίες

Τα ηπατικά νοσήματα αποτελούν ένα παγκόσμιο πρόβλημα με σημαντικές επιπτώσεις τόσο στους πάσχοντες όσο και στην κοινωνία. Οι θάνατοι από ηπατικά νοσήματα βρίσκονται σε άνοδο, και είναι η μόνη κύρια αιτία θανάτου που τα τελευταία 40 χρόνια συνεχώς αυξάνεται. Συνεπώς η έρευνα και αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών των ηπατικών νοσημάτων είναι εξαιρετικά σημαντική. Ειδικότερα η μετάπτωση σε χρονιότητα των ιογενών ηπατιτίδων είναι μια αδιευκρίνιστη διαδικασία για την οποία έχουν ενοχοποιηθεί πολλοί μηχανισμοί και παράγοντες. Πρόσφατα δεδομένα του εργαστηρίου έδειξαν πως υπάρχει ενιαία ρύθμιση της ηπατικής φλεγμονής ανεξάρτητα από τον αιτιολογικό παράγοντα.

Υπάρχουν πολλά δεδομένα που υποστηρίζουν την υπόθεση πως η IL-1β και το φλεγμονόσωμα εμπλέκονται στη παθοφυσιολογία της χρόνιας ιογενούς ηπατικής φλεγμονής. Τα δεδομένα αυτά προέρχονται κυρίως από ζωικά μοντέλα και *in vitro* πειράματα. Υπάρχουν ελάχιστες μελέτες αυτών των μηχανισμών στο ανθρώπινο ήπαρ. Έλλειψη η οποία είναι εξαιρετικά σημαντική. Επιπλέον δεν υπάρχει αξιόπιστο ζωικό μοντέλο ιογενούς ηπατίτιδας αφού οι ηπατοτρόποι ιοί που μολύνουν τον άνθρωπο μολύνουν μόνο τα ανώτερα θηλαστικά. Η ανοσολογία του ανθρώπου και του ποντικού (το ζώο που χρησιμοποιείται στα ζωικά μοντέλα) διαφέρουν διακριτά και οι μηχανισμοί που εντοπίζονται στα ζωικά μοντέλα μπορεί να μην έχουν απόλυτη αντιστοιχία με τους μηχανισμούς του ανθρώπινου οργανισμού.

Ο σκοπός αυτής της διατριβής είναι η μελέτη του ρόλου της κυτταροκίνης IL-1β και των συστατικών του NLRP3-φλεγμονοσώματος στους μηχανισμούς της χρόνιας ιογενούς ηπατικής φλεγμονής. Η διατριβή αυτή εστιάζει στο κενό, που εντοπίζεται στην διερεύνηση αυτών των δεδομένων στον ανθρώπινο ιστό. Η διατριβή διεξήχθη σε ηπατικές βιοψίες ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή.

Το υλικό των βιοψιών προήλθε από την 1η Παθολογική κλινική του ΑΧΕΠΑ σε συνεργασία με τον καθηγητή κ. Γερμανίδη, τον οποίο ευχαριστώ για την άριστη και εποικοδομητική συνεργασία που είχαμε κατά την διάρκεια της διατριβής.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Στο σημείο αυτό θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής καθηγητές Α. Γερμενή, Μ. Σπελέτα και Ε. Πετεινάκη για την συμβολή τους όλη αυτή την τριετία. Ιδιαιτέρως όμως θέλω να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανοσολογίας Καθηγητή κ. Αναστάσιο Γερμενή και τον Καθηγητή Ανοσολογίας κ. Ματθαίο Σπελέτα για την ευκαιρία που μου έδωσαν, τις προϋποθέσεις που δημιούργησαν, και τις παρατηρήσεις και τις συμβουλές τους στις διάφορες φάσεις της εργασίας. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τις συναδέλφους Ευαγγελία Καραμούτη, Ειρήνη Σεβδαλή και Γερασιμίνα Τσιντή καθώς και όλους τους υπόλοιπους συνεργάτες του εργαστηρίου για το πνεύμα συνεργασίας και την γόνιμη και εποικοδομητική ανταλλαγή σκέψεων και κρίσεων.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την υπόλοιπη οικογένειά μου. Χωρίς την υλική και ψυχική στήριξή τους θα ήταν αδύνατο να ολοκληρώσω την διατριβή αυτή.

Αδάμ Μολυβδάς

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

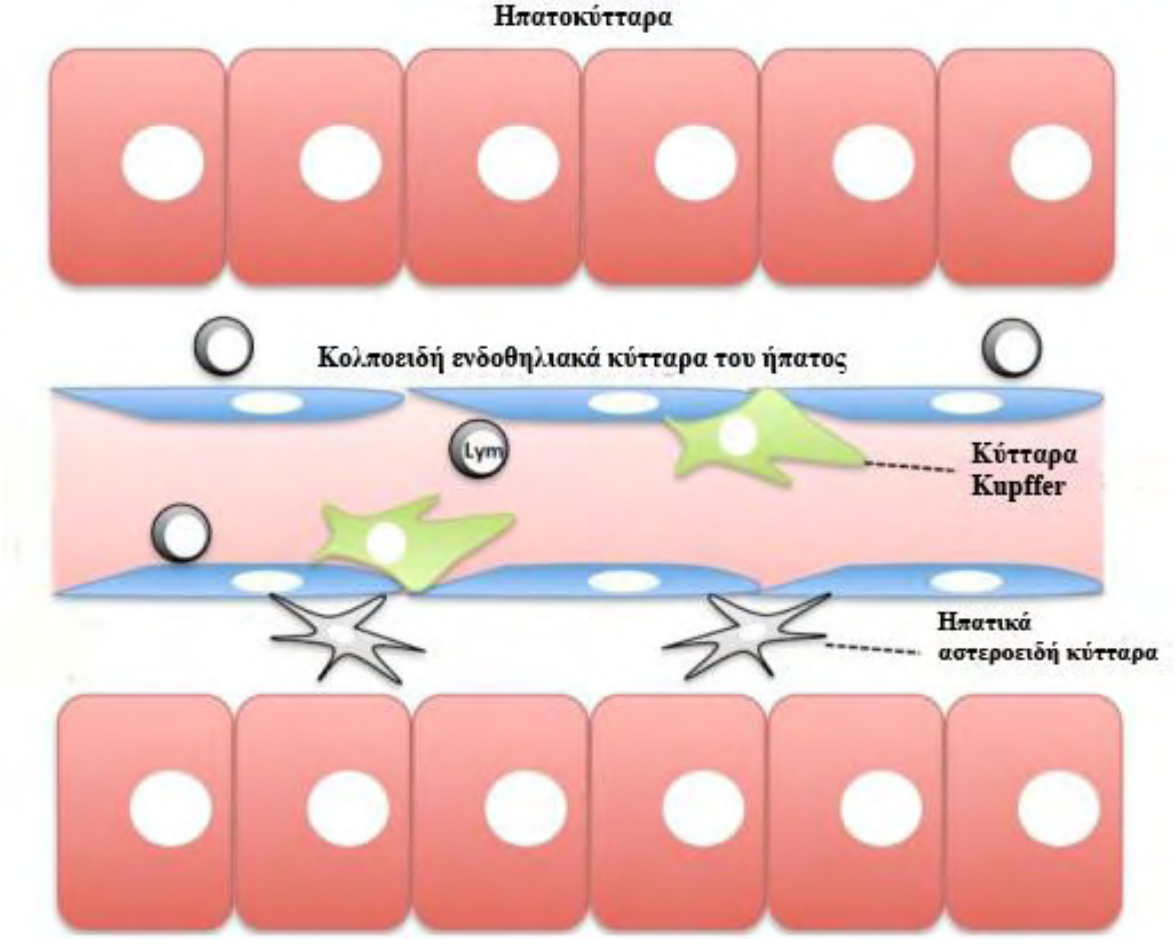
1. Το ηπατικό μικροπεριβάλλον

Το ήπαρ είναι ένα όργανο με ευρύ φάσμα λειτουργιών στο σώμα. Οι λειτουργίες του ήπατος περιλαμβάνουν την απομάκρυνση ή εξουδετέρωση τοξινών και μεταβολιτών, το μεταβολισμό των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων, και τη βιοσύνθεση απαραίτητων πρωτεϊνών του αίματος. Τα ηπατοκύτταρα, τα οποία είναι τα παρεγχυματικά κύτταρα του ηπατικού ιστού, αποτελούν την πλειοψηφία των ηπατικών κυττάρων και είναι υπεύθυνα για τον κύριο όγκο των ηπατικών μεταβολικών λειτουργιών (1, 2). Άλλα ηπατικά κύτταρα περιλαμβάνουν τα κύτταρα Kupffer, τα μυελικά κύτταρα, τα HSCs, και τα LSECs, τα οποία όλα βρίσκονται μέσα στα τριχοειδή αγγεία του ήπατος. Τα κύτταρα Kupffer διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ανίχνευση παθογόνων και στην επαγωγή της ηπατικής ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτά τα ιστικά μακροφάγα, ασκούν την δράση τους με την παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών μετά την αναγνώριση PAMPs ή DAMPs όταν αυτά παρουσιάζονται στο ήπαρ. Άλλα ηπατικά κύτταρα όπως τα DCs και τα λεμφοκύτταρα παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του ήπατος και την ανοσία. Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που απαντώνται φυσιολογικά στον ηπατικό ιστό παρουσιάζονται σχηματικά στην **Εικόνα 1**.

Το ήπαρ αιματώνεται από την ηπατική αρτηρία και την πυλαία φλέβα. Το αίμα που εισέρχεται στον ηπατικό ιστό είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένο σε θρεπτικά συστατικά και παθογόνα. Η υψηλή αιμάτωση του ηπατικού ιστού το καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητο σε προσβολές από μικρόβια, τοξίνες και μεταβολίτες. Ωστόσο, το ήπαρ έχει μια μοναδική αρχιτεκτονική που επιτρέπει τη διατήρηση της ομοιόστασης του μεταβολισμού του σώματος, την προαγωγή διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων, και την επαγωγή της ηπατικής ανοσολογικής ενεργοποίησης και ρύθμισης. Το ηπατικό μικροπεριβάλλον ρυθμίζεται αυστηρά για να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ της ανοχής και της ανοσίας. Οποιαδήποτε διατάραξη αυτής της ισορροπίας, που οφείλεται σε λοίμωξη ή στην απόθεση τοξικών ουσιών, μπορεί να οδηγήσει σε ηπατίτιδα, η οποία, αν αφεθεί ανεξέλεγκτη, μπορεί να οδηγήσει σε προοδευτική βλάβη του ήπατος, κίρρωση και τελικά, ηπατική ανεπάρκεια. Όπως ήδη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

αναφέρθηκε οι μελέτες των μηχανισμών της επίκτητης ανοσίας δεν φαίνεται να δίνουν απαντήσεις μέχρι τώρα στο μηχανισμό της ηπατικής φλεγμονής. Πιθανότατα αυτό γίνεται εξαιτίας της προδιάθεσης για ανοχή που έχει ο ηπατικός ιστός και εξαιτίας του ιδιαίτερου ηπατικού μικροπεριβάλλοντος που φαίνεται να περιλαμβάνει σύνθετους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης. Τα τελευταία χρόνια, στην προσπάθεια κατανόησης της ηπατικής φλεγμονής, έχει διερευνηθεί σε μεγαλύτερο βάθος ο ρόλος των μηχανισμών της φυσικής ανοσίας και ιδιαίτερα της οικογένειας κυτταροκινών ιντερλευκίνης-1.



Εικόνα 1. Μικροσκοπική αναπαράσταση του ηπατικού ιστού. Εμφανίζονται οι κυριοι κυτταρικοί τύποι που απαντώνται φυσιολογικά στο ήπαρ: 1) τα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος, τα ηπατοκύτταρα (Hepatocytes), 2) τα ιστικά μακροφάγα του ήπατος (κύτταρα Kupffer), 3) τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα (stellate cells ή HSCs), 4) τα κολποειδή ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος (sinusoidal endothelial cells ή LSECs) και 5) λεμφοκύτταρα (Lym). Η εικόνα τροποποιήθηκε από το Tsutsui et al (3).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

2. Οξεία και χρόνια ηπατίτιδα

Η ηπατίτιδα είναι η φλεγμονή του ήπατος (4), η οποία μπορεί να προκληθεί από λοιμογόνα αίτια, μεταβολικές διαταραχές, ή έκθεση σε φάρμακα και τοξικές ουσίες και είναι το αποτέλεσμα της απόκρισης των ηπατικών ανοσοκυττάρων στις προσβολές αυτές. Η πορεία και βαρύτητα της ηπατικής φλεγμονής εξαρτάται από την υποκείμενη αιτία. Η φλεγμονή του ήπατος μπορεί να είναι σύντομη και αυτοπεριοριζόμενη (οξεία ηπατίτιδα), ή μπορεί να είναι επίμονη και προοδευτική (χρόνια ηπατίτιδα).

Κοινές κλινικές εκδηλώσεις της οξείας ηπατίτιδας είναι ίκτερος, απώλεια της όρεξης, σκούρα ούρα, κόπωση, κοιλιακό άλγος, ναυτία και έμετος. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, το ήπαρ είναι υπεραιμικό και διογκωμένο και τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων, όπως η ALT και AST, στον ορό είναι αυξημένα. Σε μικροσκοπικό επίπεδο, η φυσιολογική αρχιτεκτονική του ήπατος έχει αλλοιωθεί. Πολλά ηπατοκύτταρα έχουν διογκωθεί, υφίστανται νέκρωση, και αλλάζει ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους (4). Σε αυτό το στάδιο, η ηπατική φλεγμονή χαρακτηρίζεται από μαζική διήθηση μονοπύρηνων κυττάρων (λεμφοκύτταρα και κύτταρα πλάσματος) και αυξημένη δραστηριότητα των ιστικών μακροφάγων του ήπατος (κύτταρα Kupffer).

Η χρόνια ηπατίτιδα είναι οποιαδήποτε μορφή ηπατίτιδας που μοιράζεται κοινά συμπτώματα με την οξεία ηπατίτιδα και διατηρεί ορολογικές και ιστολογικές ενδείξεις (φλεγμονής και νέκρωσης) για περισσότερο από 6 μήνες. Κατά τη διάρκεια χρόνιας ηπατίτιδας, η φλεγμονή περιορίζεται στα πυλαία τριχοειδή και προκαλεί ίνωση. Η χρόνια ηπατίτιδα πιστεύεται ότι χρησιμεύει ως υπόβαθρο για την εμφάνιση της ίνωσης και κίρρωσης, και συνοδεύεται από προοδευτική ηπατική νόσο.

Η ηπατική ίνωση είναι μια πιθανή συνέπεια της διαδικασίας επούλωσης μετά από προσβολή του ιστού (5, 6). Χαρακτηρίζεται από μαζική απόθεση πρωτεϊνών στον εξωκυττάριο διάμεσο ιστό, οι οποίες σχηματίζουν σκληρές ινώδεις ουλές κατά την διαδικασία αναγέννησης των ηπατοκυττάρων. Τα HSCs, που ενεργοποιούνται από μόλυνση ή φλεγμονώδη ερεθίσματα, προάγουν την εναπόθεση κολλαγόνου στο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

ήπαρ. Η επίμονη ηπατική βλάβη παρέχει το κατάλληλο υπόβαθρο για την ανάπτυξη οζιδίων και την επαγωγή της κίρρωσης του ήπατος (4).

Η κίρρωση του ήπατος, η οποία αναπτύσσεται σε διάρκεια 10-20 χρόνων, αποτελεί το τελικό στάδιο της χρόνιας ηπατικής φλεγμονής, και πιστεύεται ότι είναι παράγοντας κινδύνου για ηπατική ανεπάρκεια και την εμφάνιση HCC. Το κιρρωτικό ήπαρ εμφανίζει μειωμένη ηπατική λειτουργία και αυξημένη ενδοηπατική αντίσταση στη ροή του αίματος, η οποία οδηγεί σε πυλαία υπέρταση και ηπατική δυσλειτουργία, και μπορεί να προκαλέσει επιπλοκές που οδηγούν στο θάνατο.

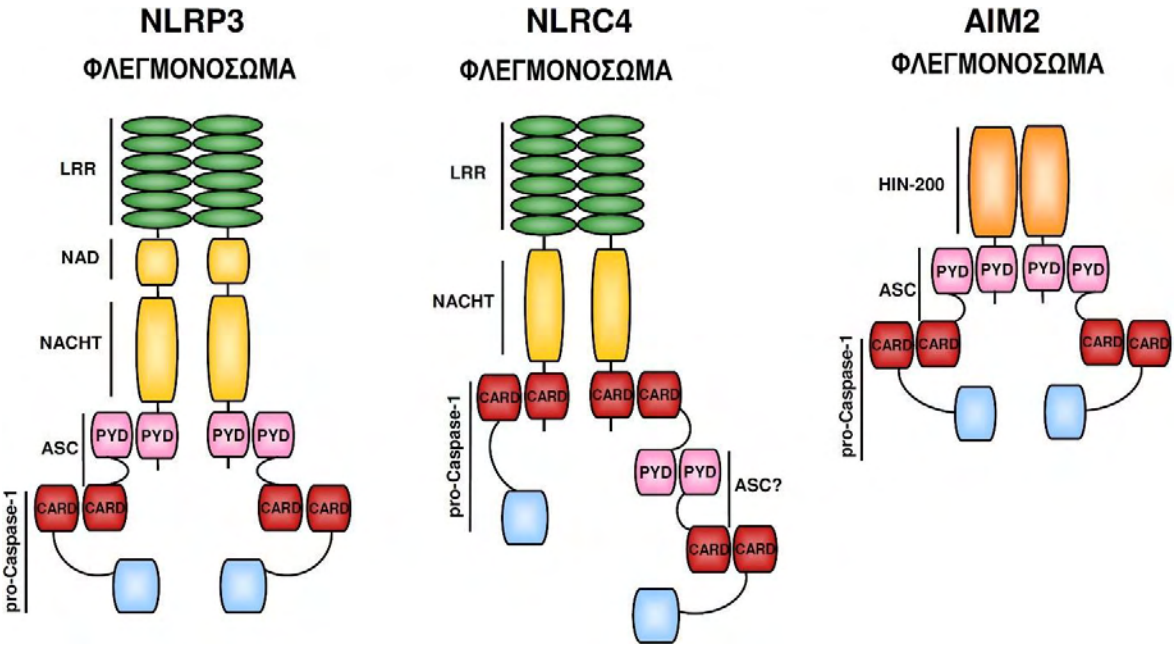
Παρόλη την εκτεταμένη έρευνα που έχει γίνει στην ηπατική φλεγμονή ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί ο ακριβής μηχανισμός της φλεγμονής. Επιπρόσθετα δεν έχει διευκρινιστεί ο μηχανισμός μετάβασης της ιογενούς ηπατικής λοίμωξης από οξεία σε χρόνια. Η επίκτητη ανοσία και οι μηχανισμοί της παρόλο που έχουν μελετηθεί εκτενώς δεν φαίνεται να δίνουν απαντήσεις σε αυτά τα ερωτήματα.

3. Φλεγμονοσώματα: σηματοδότηση, ενεργοποίηση και ρύθμιση

Τα Φλεγμονοσώματα είναι πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα που ανιχνεύουν σήματα κινδύνου μέσω των υποδοχέων NLRs (7). Οι NLRs περιλαμβάνουν μια περιοχή αναγνώρισης συνδέτη, μια κεντρική περιοχή NACHT δέσμευσης νουκλεοτιδίων που είναι υπεύθυνη για τον ολιγομερισμό, και μία N-τερματική περιοχή ενεργοποίησης (**Εικόνα 2**) (8). Για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος χρειάζονται δύο σήματα. Το πρώτο επάγει την μεταγραφή των συστατικών του φλεγμονοσώματος μέσω του NF-kB και το δεύτερο επάγει την συναρμολόγηση και ενεργοποίηση του συμπλόκου (**Εικόνα 3**). Το πρώτο σήμα μπορεί να έρθει, μεταξύ άλλων από υποδοχείς τύπου TLR και υποδοχείς της IL-1β σε μια διαδικασία θετικής ανάδρασης. Μεταξύ των καλύτερα χαρακτηρισμένων σημάτων ενεργοποίησης φλεγμονοσωμάτων σε ηπατικές ασθένειες είναι το ATP, το ουρικό οξύ, το παλμιτικό οξύ, οι κρύσταλλοι χοληστερόλης και ROS (9-14). Μετά την ενεργοποίηση του από φλεγμονώδη σήματα, ο NLR σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το μόριο τελεστή, pro-CASP-1, και σε ορισμένες περιπτώσεις είναι αναγκαία η συμβολή ενός μορίου προσαρμογέα (ASC, επίσης γνωστή ως PYCARD). Το φλεγμονόσωμα μπορεί στη

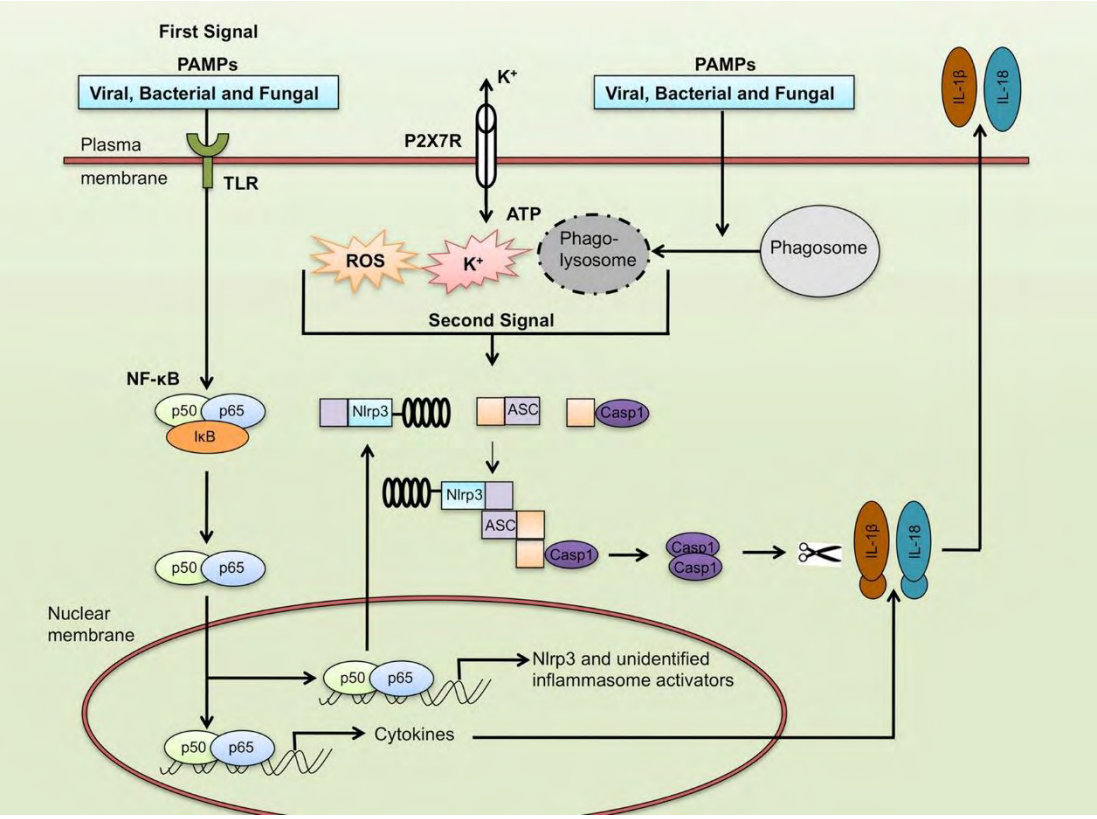
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

συνέχεια να ολιγομεριστεί και να ενεργοποιήσει την CASP-1, η οποία με τη σειρά της, εκκινεί την ωρίμανση των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1β και IL-18 (7). Επιπλέον, η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος επάγει την έκφραση των χημειοκινών, για παράδειγμα την χημειοκίνη CCL2 (επίσης γνωστή ως MCP-1), η οποία είναι ζωτικής σημασίας για τη στρατολόγηση των φλεγμονωδών κυττάρων που προέρχονται από τον μυελό των οστών στον κατεστραμμένο ηπατικό ιστό (15-17). Υπάρχουν πολλοί υποδοχείς φλεγμονοσωμάτων τα πιο καλά μελετημένα φλεγμονοσώματα είναι το NLRP6, το AIM2 και το NLRP3.



Εικόνα 2. Δομή Φλεγμονοσωμάτων. Γραφική αναπαράσταση των δομών τριών χαρακτηριστικών φλεγμονοσωμάτων. Το NLRP3-φλεγμονόσωμα αποτελείται από τον υποδοχέα NLRP3 (με τις δομές LRR, NAD, NACHT και PYD), το ASC και την pro-CASP-1. Το NLRC4-φλεγμονόσωμα αποτελείται από τον υποδοχέα NLRC4 (με τις δομές LRR, NACHT και CARD) και την pro-CASP-1, το ASC αν και δεν είναι αναγκαίο μπορεί να μεταβάλει την δραστηριότητα του NLRC4-φλεγμονοσώματος. Το AIM2-φλεγμονόσωμα αποτελείται από τον υποδοχέα AIM2 (με την δομή HIN-200), το ASC και την pro-CASP-1. Η εικόνα έχει τροποποιηθεί από Eitel et al (18).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42



Εικόνα 3. Μηχανισμοί σηματοδότησης που προτείνονται για την ενεργοποίηση του NLRP3-φλεγμονοσώματος. Τα εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά PAMPs ή DAMPs ανιχνεύονται από TLRs (πρώτο σήμα) που οδηγούν σε ενεργοποίηση του NF-κB και μεταγραφή κυτταροκινών. Επιπλέον, προτείνεται η NF-κB να ρυθμίζει εκ των προτέρων την έκφραση NLRP3, η οποία μπορεί να είναι ένας περιοριστικός παράγοντας για τη ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος. Ένα ευρύ φάσμα παθογόνων προκαλεί την ενεργοποίηση του NLRP3. Τα αποτελέσματα της έκθεσης σε PAMPs ή DAMPs περιορίζονται σε λίγους μηχανισμούς που επάγουν την ενεργοποίηση του NLRP3. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την εκροή K^+, τη λυσοσωμική βλάβη και την παραγωγή ROS (δεύτερο σήμα). Το σύμπλοκο του NLRP3-φλεγμονοσώματος αποτελείται από το μόριο προσαρμογέα ASC και την pro-CASP-1 και οδηγεί σε παραγωγή ενεργής CASP-1, με αποτέλεσμα την επεξεργασία και την έκκριση των κυτταροκινών IL-1β και IL-18. Η εικόνα έχει τροποποιηθεί από Anand et al (19).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Το NLRP6-φλεγμονόσωμα συμμετέχει σε φλεγμονοσωμική σηματοδότηση (20) και έχει κρίσιμο ρόλο στην λοίμωξη, την αυτοφλεγμονή και την καρκινογένεση (21-24). Ο συνδέτης για τον NLRP6 δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί (25). Αν και εκφράζεται έντονα σε ουδετερόφιλα και Τ-κύτταρα (20), ο ρόλος του NLRP6 στη NASH έχει αποδοθεί κυρίως στην έκφραση του στο εντερικό επιθήλιο και στο ρόλο του στη φυσιολογία του εντέρου, η οποία περιλαμβάνει τη διαμόρφωση της αλληλοεπικοινωνίας εντέρου-ήπατος (22-24, 26). Το NLRP6-φλεγμονόσωμα, προς το παρόν, δεν είναι γνωστό αν έχει άμεσο ρόλο στο ήπαρ.

Το AIM2-φλεγμονόσωμα είναι ένας κυτταροπλασματικός αισθητήρας διπλής έλικας DNA, ο οποίος διεγείρεται από DNA για να προκληθεί ενεργοποίηση της CASP-1 (27-29). Ο AIM2 ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών PYHIN (πρωτεΐνη που περιέχει την περιοχή Pyrin και Hind) και περιέχει ένα τομέα HIN200 όπου δεσμεύεται το DNA, και μια περιοχή Pyrin που συνδέεται με το ASC μόριο-προσαρμογέα για την ενεργοποίηση της CASP-1 (**Εικόνα 2**) (28). Ο AIM2 συνδέεται άμεσα με τον συνδέτη του και θα μπορούσε να συμβάλει στην παθογένεση των αυτοάνοσων νοσημάτων μέσω της αναγνώρισης του DNA θηλαστικών (30). Το AIM2-φλεγμονόσωμα μπορεί να ενεργοποιηθεί με δίκλωνο RNA μέσω του γονιδίου υποδοχέα ελικάσης που επάγεται από ρετινοϊκό οξύ 1, μετά από σύνδεση με το μόριο προσαρμογέα ASC, που με τη σειρά του οδηγεί σε ενεργοποίηση της CASP-1 (31). Το AIM2-φλεγμονόσωμα έχει συσχετιστεί με την ιογενή ηπατίτιδα (32).

Το NLRP3-φλεγμονόσωμα έχει μελετηθεί εκτενώς στα ηπατικά νοσήματα (33-35), αν και άλλοι τύποι φλεγμονοσωμάτων έχουν επίσης εμπλακεί σε διαταραχές του ήπατος, όπως είναι το AIM2-φλεγμονόσωμα (17, 36) και το NLRP6-φλεγμονόσωμα (26). Στο NLRP3-φλεγμονόσωμα, η συνιστώσα NLR αντιπροσωπεύεται από τον NLRP3 (επίσης γνωστό ως κρυοπυρίνη), ο οποίος λειτουργεί ως αισθητήρας συνδέτη (**Εικόνα 2**) (37). Όταν το NLRP3-φλεγμονόσωμα σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το μόριο προσαρμογέα ASC, η CASP-1 ενεργοποιείται (7). Η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος είναι μια διαδικασία δύο βημάτων στην οποία ένα βακτηριακό σήμα, για παράδειγμα λιποπολυσακχαρίτης, αυξάνει την έκφραση NLRP3 μέσω του NF-κB (**Εικόνα 3**) (38). Το γεγονός αυτό επιτρέπει σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

ένα δεύτερο σήμα, συνήθως μοριακό μοτίβο που σχετίζεται με βλάβη (DAMP) που προέρχεται από κατεστραμμένα κύτταρα, να ενεργοποιήσει το NLRP3-φλεγμονόσωμα, μέσω ενός από τα τρία κύρια μονοπάτια. Το πρώτο μονοπάτι είναι μέσω του P2X πουρινοϋποδοχέα 7 (P2X7) του ATP, που οδηγεί σε εκροή καλίου, στην πρόσληψη της πρωτεΐνης πόρων της μεμβράνης pannexin 1 και ενεργοποίηση του NLRP3 (39-41). Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την ενδοκυττάρωση κρυστάλλων χοληστερόλης, ουρικού οξέος ή αμυλοειδούς (10, 39, 42, 43). Η φαγοκυττάρωση αυτών των κρυστάλλων από τα μακροφάγα οδηγεί σε λυσοσωμική διάσπαση η οποία απελευθερώνει τα συστατικά τους, συμπεριλαμβανομένης της λυσοσωμικής πρωτεάσης καθεψίνης B, η οποία ενεργοποιεί τον NLRP3 και μεταβάλλει το ενδοκυτταρικό pH (41). Στον τρίτο μηχανισμό, η πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης της θειοαναγωγάσης αποκολλάται από την θειοαναγωγάση, με ROS-εξαρτώμενο τρόπο, και συνδέεται με τον NLRP3 προκαλώντας ενεργοποίηση (44, 45). Αν αυτός ο μηχανισμός είναι ένας ευδιάκριτα ανεξάρτητος τρόπος ενεργοποίησης του NLRP3 ή μέρος μιας διαδικασίας σηματοδότησης που προήλθε από έναν από τους άλλους δύο μηχανισμούς είναι ασαφές.

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι μυελικά κύτταρα του περιφερικού αίματος εκφράζουν σε μεγάλη αφθονία τα συστατικά του φλεγμονοσώματος CASP-1, NLRs, ASC, και pro-IL-1β / pro-IL-18. Επιπλέον, η έκφραση NLR διαφέρει από ιστό σε ιστό και μεταξύ κυτταρικών τύπων έτσι ώστε το φλεγμονόσωμα μπορεί να διεγείρεται και να συναρμολογείται σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των επιθηλιακών κυττάρων και ίσως των λεμφοκυττάρων (46, 47). Είναι σημαντικό ότι, το ήπαρ έχει υψηλά επίπεδα CASP-1 σε σχέση με πολλούς άλλους ιστούς (48). Από την άποψη της έκφρασης της οικογενείας υποδοχέων NLR, οι πρώιμες μελέτες έδειξαν ότι το ήπαρ εκφράζει NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP0, NLRP12, και NLRC4 σε επίπεδο mRNA (49, 50). Τα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος, τα ηπατοκύτταρα, εκφράζουν κασπάση-1, και ASC (11, 48, 51-53). Μελέτες προτείνουν ότι το φλεγμονόσωμα μπορεί να επαχθεί και να ενεργοποιηθεί σε ηπατοκύτταρα. Εκτός από τα ηπατοκύτταρα, υπάρχουν φλεγμονοσώματα στα HSC (51, 54) και τα LSEC (51, 55, 56). Οι ινοβλάστες, οι οποίοι εμπλέκονται στην ίνωση του ήπατος, επίσης εκφράζουν συστατικά του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

φλεγμονοσώματος (57). Τα κύτταρα Kuppfer ενεργοποιούν σθεναρά το NLRP3 φλεγμονόσωμα και παράγουν υψηλά επίπεδα της IL-1β (53).

4. Η οικογένεια κυτταροκινών ιντερλευκίνης-1 (IL-1F)

Οι κυτταροκίνες της IL-1F είναι ανοσιακοί μεσολαβητές με πλειοτροπικές λειτουργίες. Επηρεάζουν σχεδόν όλα τα κύτταρα και όργανα στο σώμα (58-61) και είναι σημαντική κινητήρια δύναμη στην παθογένεση πολλών αυτοφλεγμονωδών νοσημάτων, αυτοάνοσων νοσημάτων, λοιμώξεων, και της στείρας φλεγμονής (**Πίνακας 1)** (62). Οι κυτταροκίνες της IL-1F περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την IL-1α, την IL-1β, τον IL-1ra, την IL-18, την IL-33, την IL-36, την IL-37 και την IL-38 (63). Αυτοί οι μεσολαβητές είναι κυρίως φλεγμονώδεις. Είναι σημαντικοί σε όλες σχεδόν τις φλεγμονώδεις καταστάσεις και ασκούν τις συγκεκριμένες επιδράσεις τους μέσω της οικογένειας των υποδοχέων της IL-1 (IL-1R 1-10) (63). Επίσης, εμπλέκονται στη διαφοροποίηση και λειτουργία πολλών κυττάρων του ανοσιακού συστήματος, καθοδηγούν πολλές πολύπλοκες φλεγμονώδεις διαδικασίες, και είναι κρίσιμοι ρυθμιστές της απόκρισης της οξείας φάσης της φλεγμονής.

Η IL-1α και IL-1β προσδένονται στον ίδιο υποδοχέα (IL-1R τύπου I; IL-1RI), και έχουν παρόμοιες βιολογικές λειτουργίες, κυρίως φλεγμονώδεις δραστηριότητες. Η IL-1α είναι βιολογικά δραστική χωρίς την ανάγκη μετα-μεταγραφικής τροποποίησης. Αντίθετα, τα πρόδρομα μόρια της IL-1β (pro-IL-1β) και της IL-18 (pro-IL-18) είναι ανενεργά και απαιτείται ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος για την πρωτεολυτική διάσπαση των πρώιμων μορφών σε ώριμες (ενεργείς). Τέλος η IL-33 είναι ενεργή πρωτεΐνη όταν παράγεται, αλλά η πρωτεολυτική διάσπαση μετά από ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος την καθιστά ανενεργή. Φαίνεται να υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί πρωτεολυτικής διάσπασης των IL-1F κυτταροκινών, αλλά ο ρόλος τους και η σημασία τους στα ηπατικά νοσήματα δεν έχει διερευνηθεί (64).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Πίνακας 1. Μέλη της οικογενείας Κυτταροκινών Ιντερλευκίνης-1 (IL-1F)

Οικογενειακό Όνομα	Όνομα	Υποδοχέας/ Συνυποδοχέας	Δράση	Σύνθεση ως πρόδρομο μόριο	Τροποποίηση αναγκαία για ενεργότητα
IL-1F1	IL-1α	IL-1RI/IL-1RacP	Φλεγμονώδης	Ναι	Όχι
IL-1F2	IL-1β	IL-1RI/IL-1RacP	Φλεγμονώδης	Ναι	Ναι
IL-1F3	IL-1Ra	IL-1RI	Ανταγωνιστής IL-1α,β	Όχι	Όχι
IL-1F4	IL-18	IL-18Rα/IL-18Rβ	Φλεγμονώδης	Ναι	Ναι
IL-1F5	IL-36Ra	IL-1Rrp2	Ανταγωνιστής IL-36	Ναι	Ναι
IL-1F6	IL-36α	IL-1Rrp2/IL-1RAcP	Φλεγμονώδης	Ναι	Ναι
IL-1F7	IL-37	IL-18Rα, IL-18BP	Αντιφλεγμονώδης	Ναι	Ναι
IL-F8	IL-36β	IL-1Rrp2/IL-1RAcP	Φλεγμονώδης	Ναι	Ναι
IL-F9	IL-36γ	IL-1Rrp2/IL-1RAcP	Φλεγμονώδης	Ναι	Ναι
IL-F10	IL-38	IL-1Rrp2	? Ανταγωνιστής	Ναι	? Όχι
IL-F11	IL-33	ST2/IL-1RAcP	Φλεγμονώδης	Ναι	Όχι

Ο κύριος ρόλος του φλεγμονοσώματος σε νοσήματα του ήπατος έχει αποδοθεί στην παρουσία του σε ανοσοκύτταρα του ήπατος και την ικανότητά του να προκαλεί φλεγμονή μέσω της φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-1β (16, 65). Η φλεγμονώδης επίδραση της IL-1β είναι πιθανόν να οφείλεται στη συνεργασία της με τη δράση της TLR σηματοδότησης που ενισχύει σημαντικά τη φλεγμονή μέσω φλεγμονωδών κυτταροκινών που προάγονται από διάφορους λιποπολυσακχαρίτες (16, 17, 66-68). Η σηματοδότηση της IL-1β ενισχύεται περαιτέρω από αυτοκρινείς ή παρακρινείς μηχανισμούς. Για παράδειγμα, η μεσολαβούμενη από φλεγμονόσωμα απελευθέρωση της IL-1β αυξάνει την παραγωγή της pro-IL-1β, σε μια διαδικασία θετικής ανατροφοδότησης, καθώς και άλλων συστατικών του φλεγμονοσώματος, φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών, περιλαμβανομένων των TNF και CCL2 (15, 60, 67). Στην ηπατική νόσο, η IL-1β προάγει την στρατολόγηση των φλεγμονωδών κυττάρων στο ήπαρ και ενεργοποιεί τα HSCs, τα οποία συμβάλλουν στην ίνωση (17, 69). Επιπλέον, η IL-1β μπορεί να επάγει συσσώρευση τριγλυκεριδίων στα ηπατοκύτταρα (16, 17) και, σε συνδυασμό με τον TNF, προκαλεί ηπατοκυτταρικό θάνατο (17, 66, 70). Η σηματοδότηση της IL-1 ρυθμίζεται από τον IL-1Ra, ο οποίος είναι ένας ενδογενής ανταγωνιστής της φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-1β (71). Ο IL-1Ra ανταγωνίζεται τόσο με την IL-1α όσο και την

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

IL-1β στο επίπεδο του υποδοχέα ώστε να εμποδίσει την σηματοδότηση του IL-1R1 (60).

Η IL-1β ενεργοποιείται από την CASP-1. Αυτό υποστηρίζεται από πειράματα που χρησιμοποιούν διαγονιδιακά ποντίκια με ανεπάρκεια *Casp-1* που στερούνται ενεργοποίησης της IL-1β (33, 37, 72). Ωστόσο, σε μερικές μελέτες της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης σε ορισμένες βακτηριακές λοιμώξεις, η ανεπάρκεια CASP-1 δεν εμπόδισε την ενεργοποίηση της IL-1β. Η διαφορά αυτή έχει εξηγηθεί από την παρουσία άλλων IL-1β πρωτεολυτικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της ελαστάσης των ουδετερόφιλων, της πρωτεϊνάσης-3, της καθεψίνης G και της CASP-11 (73-79). Ωστόσο, μέχρι σήμερα, δεν έχουν παρουσιαστεί στοιχεία που να υποστηρίζουν την αιτιώδη συμμετοχή της ουδετεροφιλικής ελαστάσης, της πρωτεϊνάσης-3 ή της καθεψίνης στην ωρίμανση της IL-1β σε ασθένειες του ήπατος.

Το φλεγμονόσωμα επεξεργάζεται και άλλα υποστρώματα εκτός από την IL-1β, όπως είναι οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-18 και IL-33 (80). Οι κυτταροκίνες αυτές μπορεί να συμμετέχουν στην ανάπτυξη της ηπατικής νόσου.

Η IL-18 φαίνεται να εμπλέκεται στην ρύθμιση του μικροβιώματος του εντέρου σε αντίθεση με τη σηματοδότηση μέσω IL-1β. Χρησιμοποιώντας δίαιτα MCD, που αποτελεί μοντέλο NASH, σε ποντίκια με ανεπάρκεια στη σηματοδότηση της IL-1β δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στη βαρύτητα της νόσου σε σύγκριση με ποντίκια άγριου-τύπου, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση της βαρύτητας της NASH σε IL-18-ανεπαρκή ποντίκια στην MCD δίαιτα (26). Επιπλέον, η ανεπάρκεια IL-18 μετέβαλε τη βακτηριακή σύνθεση του εντέρου υπέρ ενός μικροβιώματος που επάγει κολίτιδα, η οποία οδήγησε σε αυξημένη μετατόπιση βακτηριακών προϊόντων από το έντερο στο ήπαρ, που οδηγεί σε φλεγμονή (26). Ο ρόλος της IL-18 έχει επίσης μελετηθεί σε ένα ζωικό μοντέλο ηπατικής βλάβης που προκαλείται από την παρακεταμόλη (επίσης γνωστή ως ακεταμινοφαίνη). Μετά από θανατηφόρο δόση παρακεταμόλης, τα IL-18-ανεπαρκή ποντίκια είχαν καλύτερη επιβίωση από την ομάδα ελέγχου αγρίου τύπου και το όφελος επιβίωσης ήταν στατιστικά σημαντικό (55). Επιπλέον, σε μια *in vitro* μελέτη, τα μονοκύτταρα μπορούσαν να εντοπίσουν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

ηπατοκύτταρα μολυσμένα με HCV και απάντησαν με την παραγωγή της IL-18 με ένα φλεγμονοσωμικά εξαρτώμενο τρόπο (81).

Η IL-33 κατά κύριο λόγο εκφράζεται από επιθηλιακά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των ηπατοκυττάρων (82), και ενεργοποιεί ποικιλία κυττάρων: αιμοποιητικά κύτταρα, ιστιοκύτταρα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, φυσικά κυτταροτοξικά, φυσικά κυτταροτοξικά Τ κύτταρα, $CD8^+$ Τ κύτταρα, Th2 κύτταρα και μη αιμοποιητικά κύτταρα (83). Η IL-33 δρα στον πυρήνα και στον εξωκυττάριο χώρο, και εμφανίζεται σε δύο μορφές: πλήρους μήκους IL-33 (pro-IL-33) και ώριμης IL-33. Ο πυρηνικός χώρος είναι ο αποκλειστικός τομέας της ενδοκυτταρικής pro-IL-33, αλλά η πυρηνική λειτουργία της pro-IL-33 είναι ασαφής (84). Όταν εκκρίνεται από τα κύτταρα, η pro-IL-33 συνήθως έχει ήδη διασπαστεί πρωτεολυτικά σε ώριμη IL-33, η οποία δεν μπορεί να εντοπιστεί στον πυρήνα. Η επεξεργασία και η απελευθέρωση της pro-IL-33 φαίνεται να είναι κυτταροειδική και διάφορες πρωτεάσες, συμπεριλαμβανομένης και της CASP-1, μπορούν να επεξεργαστούν την pro-IL-33 σε ώριμη IL-33 (85, 86). Η εξωκυττάρια pro-IL-33 και IL-33 δεσμεύονται στον ST2 υποδοχέα τους, ενεργοποιώντας τον MyD88 και την αντίστοιχη οδό σηματοδότησης, η οποία προάγει την παραγωγή διαφόρων κυτταροκινών και χημειοκινών ή προκαλεί κυτταρική διαφοροποίηση και ενεργοποίηση (83). Τόσο η pro-IL-33, όσο και η ώριμη IL-33, προάγουν την φλεγμονή αλλά εμφανίζουν διαφορές στις ειδικές δραστηριότητες τους. Η pro-IL-33 προάγει την φλεγμονή διαφορετικά από την ώριμη IL-33 με ένα ST2-ανεξάρτητο τρόπο, ενώ η ώριμη IL-33 επάγει την ισχυρή Th2 φλεγμονώδη απόκριση. Οι μηχανισμοί πίσω από αυτό το φαινόμενο δεν είναι γνωστοί (87). Σε ασθένειες του ήπατος, η λειτουργία της IL-33 είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Στις λίγες διαθέσιμες μελέτες μέχρι σήμερα, η IL-33 έχει μελετηθεί στο ήπαρ ως σήμα κινδύνου (αλαρμίνη) μετά από την απελευθέρωσή της από νεκρωτικά κύτταρα (82).

Σε ζωικά μοντέλα της ALD, της ηπατικής ίνωσης και της βλάβης από ισχαιμία-επαναιμάτωση, τα επίπεδα της IL-33 ήταν σημαντικά αυξημένα (16, 88, 89). Αναστολή της σηματοδότησης της IL-33 μείωσε την βλάβη που προκλήθηκε από την ισχαιμία-επαναιμάτωση αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των κυττάρων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Kupffer και του NF-κB (90). Σε άλλη μελέτη με ηπατική ίνωση η επαγόμενη από τετραχλωριούχο άνθρακα ηπατική ίνωση επιταχύνθηκε (91). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε διαφορά σε οξεία ηπατική βλάβη επαγόμενη από κονκαναβαλίνη-Α, μεταξύ ποντικών άγριου τύπου και διαγονιδιακών με ανεπάρκεια IL-33 (92). Ο ρόλος της IL-33 στα περισσότερα ηπατικά νοσήματα δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα.

5. Το φλεγμονόσωμα στα ηπατικά νοσήματα

Τα τελευταία χρόνια το φλεγμονόσωμα βρίσκεται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος. Έχει γίνει εκτεταμένη έρευνα στο ρόλο του φλεγμονοσώματος στα ηπατικά νοσήματα. Τα περισσότερα δεδομένα προέρχονται από ζωικά μοντέλα και *in vitro* δεδομένα. Φαίνεται μάλιστα να υπάρχει σημαντική σύνδεση μεταξύ του φλεγμονοσώματος και της παθογένεσης των ηπατικών νοσημάτων (35, 93).

5.1Ηπατική ίνωση

Ηπατική ίνωση μπορεί να ρυθμιστεί τόσο άμεσα όσο και έμμεσα από το φλεγμονόσωμα. Η άμεση οδός διαμεσολαβείται από έκφραση φλεγμονοσώματος στα HSCs, τον κύριο πληθυσμό κυττάρων στο ήπαρ που προάγουν την ίνωση (54, 94). Κανονικοί ενεργοποιητές του φλεγμονοσώματος, όπως οι κρύσταλλοι ουρικού οξέος, μπορούν να ενεργοποιήσουν τα HSCs (54). Η αύξηση της έκφρασης του TGF-β1, μιας σημαντικής κυτταροκίνης που προάγει την ίνωση, ενεργοποιεί τα HSCs, και επάγει την παραγωγή του κολλαγόνου και την απόθεση του στο διάμεσο ιστό. Αυτές οι αλλαγές δεν εμφανίζονται όταν τα HSCs στερούνται το μόριο ASC (54). Η έμμεση οδός πιστεύεται ότι διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση HSC από την IL-1β και IL-18 που παράγεται από τα κύτταρα Kupffer. Οι γενικοί μηχανισμοί της ινωγένεσης πιθανώς να εφαρμόζονται στην πλειονότητα των χρόνιων ηπατικών ασθενειών. Ωστόσο, δεν υπάρχουν άμεσες αποδείξεις που στηρίζουν ή απορρίπτουν την συμμετοχή του φλεγμονοσώματος στην ίνωση του ήπατος σε παθήσεις εκτός από τις ALD και NASH (16).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

5.2Αλκοολική ηπατική νόσος (ALD)

Η μαζική κατανάλωση αλκοόλ προκαλεί ηπατική στεάτωση και η παρατεταμένη έκθεση στο αλκοόλ οδηγεί σε στεατοηπατίτιδα, ίνωση και κίρρωση. Τα προχωρημένα στάδια της ALD, όπως κίρρωση ή σοβαρή αλκοολική ηπατίτιδα, θεωρούνται μη αναστρέψιμα, με συχνά θανατηφόρα αποτελέσματα λόγω ηπατικής ανεπάρκειας (95). Η ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας και της φλεγμονής είναι σημαντικοί παράγοντες για την εξέλιξη της ALD (96). Οι ασθενείς με οξεία αλκοολική ηπατίτιδα εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα TNF, IL-1 και IL-8, αυξημένη έκφραση της CASP-1 και του NLRP3 στο ήπαρ, αυξημένο αριθμό των ουδετερόφιλων στο αίμα, και ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και μακροφάγων (95, 97, 98). Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι ασθενείς με τις πιο σοβαρές μορφές αλκοολικής ηπατίτιδας έχουν σημαντική αύξηση στα επίπεδα της IL-1β στον ορό, σε σύγκριση με υγιή άτομα (98). Η φλεγμονή είναι, ως εκ τούτου, ένας σημαντικός παράγοντας για την εξέλιξη της ALD, και η παρουσία της αυξημένης IL-1β και η ουδετεροφιλία, απουσία βακτηριακής μόλυνσης, δείχνει ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος (99). Ομοίως, η παρουσία των δομών Mallory-Denk στο ήπαρ, ένα χαρακτηριστικό της αλκοολικής ηπατίτιδας, συσχετίζεται με αυξημένη έκφραση των συστατικών του φλεγμονοσώματος NLRP3, ASC, CASP-1 και IL-1β σε οξεία αλκοολική ηπατίτιδα (97).

Ο βασικός ρόλος της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος στην εξέλιξη της ALD έχει επιβεβαιωθεί χρησιμοποιώντας πειραματικά ζωικά μοντέλα. Η χρόνια χορήγηση αιθανόλης σε ποντίκια άγριου τύπου προκαλεί στεάτωση, ηπατική βλάβη και αυξημένη ηπατική έκφραση των γονιδίων *IL-1β, Casp-1, Asc* και *Nlrp3* (16). Παρομοίως, η έκθεση των ποντικών σε αιθανόλη προκαλεί αυξημένη δραστηριότητα της *Casp-1* στο ήπαρ, υποδεικνύοντας ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος (16). Συνολικά, τα διαθέσιμα μέχρι σήμερα δεδομένα δείχνουν ότι ο παθογόνος ρόλος του φλεγμονοσώματος στην ALD διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση του στα κύτταρα Kupffer. Οι ενεργοποιητές του φλεγμονοσώματος στην ALD δεν έχουν ακόμη καθοριστεί πλήρως. Οι λιποπολυσακχαρίτες που προέρχονται από το έντερο, οι οποίοι σηματοδοτούν μέσω του TLR4 (100, 101), είναι πιθανό να είναι το πρώτο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

σήμα που επάγει την έκφραση της IL-1β (16, 102). Ο ρόλος των στείρων σημάτων στη φλεγμονή του ήπατος που προκαλείται από αλκοόλ παραμένει ασαφής. Ωστόσο, τα τρέχοντα δεδομένα υποστηρίζουν ένα ρόλο για τα PAMPs (που προέρχονται από το έντερο) και τα DAMPs (πιθανώς προερχόμενα από τα ηπατοκύτταρα) στη φλεγμονή του ήπατος που οφείλεται στην έκθεση σε αλκοόλη.

5.3Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD)

Η συμβολή της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος σε μη αλκοολική νόσο του ήπατος έχει μελετηθεί εκτενώς (103, 104). Υπάρχουν αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα που δείχνουν ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του μεταβολικού συνδρόμου και στην αντοχή στην ινσουλίνη (105). Οι δύο αυτές καταστάσεις προδιαθέτουν ένα άτομο στην ανάπτυξη NAFLD και NASH. Η φλεγμονή πιστεύεται ότι συνδέει την παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο και τον T2DM (106). Για παράδειγμα, οι αυξήσεις στα επίπεδα της IL-1β και η ενεργοποίηση του NLPR3 φλεγμονοσώματος σχετίζονται με το μεταβολικό σύνδρομο (14). Ομοίως, η ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος βρέθηκε σε μονοκύτταρα αίματος ασθενών με T2DM (107).

Είναι ενδιαφέρον ότι, σε ζώα με πρώιμη NAFLD, τα οποία έχουν ηπατική στεάτωση αλλά στερούνται φλεγμονής, η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος δεν είναι ακόμη εμφανής στο ήπαρ. Ως αποτέλεσμα, η ιστοειδική ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος θα μπορούσε να συμβάλει στην εξέλιξη της νόσου και της επέκτασης σε άλλα όργανα εντός του φάσματος του μεταβολικού συνδρόμου-NAFLD-NASH (11, 108). Σε μοντέλα της NAFLD στα πρώιμα στάδια της νόσου, παρατηρήθηκε αύξηση στο ήπαρ του mRNA των συστατικών του φλεγμονοσώματος, όπως του NLRP3, του ASC και CASP-1, αλλά χωρίς ενδείξεις πλήρους ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος (δηλαδή διάσπαση της CASP-1), αποκαλύπτοντας ότι μόνο περιορισμένα σήματα ήταν διαθέσιμα για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος στο λιπώδες ήπαρ (11, 36, 108). Αντίθετα, οι ερευνητές βρήκαν στοιχεία που αποδεικνύουν αυξημένη έκφραση των συστατικών

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

του φλεγμονοσώματος και ενεργοποίηση όταν η NAFLD είχε προχωρήσει σε NASH (108, 109).

Δεδομένου του κυτταρικού περιβάλλοντος του ήπατος, η κατανόηση της ιδιαιτερότητας της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος στην NASH είναι σημαντική. Παρόλο που όταν το φλεγμονόσωμα και οι λειτουργίες του είχαν αρχικά μελετηθεί στην ALD και φαίνεται να υπάρχει ειδικότητα για τα κύτταρα Kupffer (16, 110), ο ρόλος του NLRP3 φλεγμονοσώματος στην NAFLD και NASH είναι πιο περίπλοκος από ότι αρχικά είχε προβλεφθεί.

Ο ρόλος του φλεγμονοσώματος στη NASH, διαμεσολαβείται τόσο από παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος όσο και από κύτταρα του ανοσιακού συστήματος (11, 26, 36). Στο ζωικό μοντέλο της NASH με διατροφή MCD, συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος και ηπατικά παρεγχυματικά κύτταρα, αλλά και τα κύτταρα που προέρχονται από μυελό των οστών (36). Ένας ειδικός ρόλος του φλεγμονοσώματος στα ηπατοκύτταρα στη NASH, υποστηρίζεται περαιτέρω από μελέτες που αποδεικνύουν ότι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα ρυθμίζουν προς τα πάνω και ενεργοποιούν το σύμπλοκο του φλεγμονοσώματος στα ηπατοκύτταρα προκαλώντας παραγωγή IL-1β (11). Το φλεγμονόσωμα στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να συμβάλει στην NASH αλλάζοντας την διαμόρφωση της εντερικής μικροχλωρίδας (26).

Τέλος, σύμφωνα με πληθυσμιακές μελέτες, η NAFLD και NASH είναι πιο διαδεδομένη στους άνδρες από ότι στις γυναίκες (111). Ενδιαφέρον είναι ότι το φλεγμονόσωμα ενεργοποιείται στα αρσενικά, αλλά όχι στα θηλυκά ποντίκια που τρέφονται με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά που προκαλεί NAFLD και NASH, γεγονός που υποδηλώνει ότι το φύλο και οι διαφορές τους θα μπορούσαν να ρυθμίσουν την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος (103, 108).

Οι προσδέτες και τα εναύσματα της ενεργοποίησης των φλεγμονοσωμάτων στην NAFLD και στην NASH είναι μόνο εν μέρει κατανοητοί. Σε ζωικά μοντέλα, οι ελλείψεις σε Myd88, TLR2, TLR4 και TLR9 εξασθενίζουν τη NASH (17, 36, 112). Οι συνδέτες για την ενεργοποίηση των TLR περιλαμβάνουν λιποπολυσακχαρίτες από την μικροχλωρίδα του εντέρου και ενδεχομένως άλλα σήματα μικροβιακού

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

κινδύνου, καθώς και στείρα σήματα κινδύνου ενεργοποίησης των TLR, όπως το HMGB1 (17, 36, 112). Το δεύτερο σήμα για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος πιθανώς σχετίζεται με βλάβη των ηπατοκυττάρων που προκαλείται από κορεσμένα λιπαρά οξέα, ROS ή εστέρες χοληστερόλης (11, 35). Αυτά τα σήματα κινδύνου μπορεί να συσσωρευτούν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου για να προκαλέσουν, και αργότερα να διαιωνίσουν την φλεγμονή μέσω TLRs, φλεγμονοσωμάτων και υποδοχέων κυτταροκινών.

5.4Ιογενείς ηπατίτιδες

Η ιογενής ηπατίτιδα είναι η πιο κοινή μορφή ηπατίτιδας και συνιστά φλεγμονή του ήπατος που προκαλείται από τους ιούς της ηπατίτιδας. Οι πιο σημαντικοί ηπατοτρόποι ιοί είναι ο ιός της ηπατίτιδας A (HAV), ο ιός της ηπατίτιδας B (HBV), ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV), ο ιός της ηπατίτιδας D (HDV), και ο ιός της ηπατίτιδας E (HEV). Μόνο ο HBV και ο HCV προκαλούν χρόνια φλεγμονή.

Η λοίμωξη με HBV είναι ετερογενής και έχει διάφορες παρουσιάσεις (113). Η αλληλεπίδραση HBV-ξενιστή είναι μία κρίσιμη και σύνθετη σχέση που καθορίζει την έκταση της ηπατικής φλεγμονής, την παθολογία του ήπατος, και την απόκριση στη θεραπεία (114). Τα μυελικά κύτταρα, κυρίως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του HBV. Έχει αποδειχθεί στο μοντέλο λοίμωξης από HBV των χιμπατζήδων, ότι οξεία λοίμωξη με HBV προκαλεί παροδική ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας που συνδυάζεται με κάθαρση του ιού, με το τελευταίο να εξαρτάται από τα Τ κύτταρα (114-117). Οι κυτταρικοί μηχανισμοί της επίκτητης ανοσίας φαίνεται να μην εξηγούν την παθογένεση της χρόνιας ιογενούς ηπατικής φλεγμονής. Χαρακτηριστικά σε ανθρώπινες βιοψίες όσο αυξάνει η φλεγμονή στο ιστό τόσο, αυξάνει και ο πληθυσμός των Τ ρυθμιστικών (Treg) κυττάρων (118, 119).

Αρκετές μελέτες έχουν ενοχοποιήσει το ρόλο του φλεγμονοσώματος και των κυτταροκινών IL-1β και IL-18 στην πρόοδο της νόσου HBV. Μία μελέτη εξέτασε το ρόλο του AIM2-φλεγμονοσώματος κατά τη διάρκεια της λοίμωξης με HBV. Σε αυτή τη μελέτη, PBMCs απομονώθηκαν από υγιείς δότες και από ασθενείς με οξεία ή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

χρόνια HBV (32). Στην οξεία HBV βρέθηκαν υψηλά επίπεδα AIM2 που συνοδεύονταν από υψηλά επίπεδα IL-1β και IL-18 στον ορό σε σύγκριση με τη χρόνια HBV. Επιπλέον, βρέθηκε μια θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης AIM2 και IL-1β και IL-18, γεγονός που υποδηλώνει συμμετοχή του AIM2-φλεγμονοσώματος στην λοίμωξη από HBV. Ενδιαφέρον είναι ότι η θεραπεία με ιντερφερόνη τύπου-1 σε ασθενείς με λοίμωξη HBV μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ή μόνιμη εξάλειψη της αντιγραφής του HBV (120, 121). Παρόλο που δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί ο μηχανισμός, αυτό το εύρημα εγείρει ενδιαφέροντα ερωτήματα.

Ο HCV προκαλεί μία φλεγμονώδη νόσο όπου η οξεία λοίμωξη εξαιρετικά συχνά εξελίσσεται σε χρόνια λοίμωξη, που χαρακτηρίζεται από επίμονη ηπατική φλεγμονή (122). Όπως και η χρόνια HBV λοίμωξη, η χρόνια HCV λοίμωξη προδιαθέτει στην εμφάνιση ίνωσης και καρκίνου του ήπατος. Υπάρχουν πολλές μελέτες που συνδέουν τον HCV με το φλεγμονόσωμα (52, 53, 123, 124). *In vitro* έχει δειχθεί πως τα αντιγόνα του HCV είναι ικανά να προκαλέσουν ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος (52, 124). Σε ασθενείς με κίρρωση του ήπατος εξαιτίας χρόνιας λοίμωξης με HCV έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα IL-1β (53).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1.1Ασθενείς και μάρτυρες

Χρησιμοποιήθηκαν βιοψίες ήπατος από 44 ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα. Χρησιμοποιήθηκαν βιοψίες από ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (HBV) και από ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (HCV). Οι ασθενείς χωρίσθηκαν σε τρείς ομάδες. Ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β στη διάγνωση πριν λάβουν οποιαδήποτε θεραπεία (CHB, n=22). Ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β σε παρατεταμένη (πάνω από 240 εβδομάδες) ύφεση μετά από θεραπεία με entecavir (CHB-rem, n=13). Ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C στη διάγνωση πριν λάβουν οποιαδήποτε θεραπεία (CHC, n=9). Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β είχαν λοίμωξη από τον γονότυπο D και HBe-Ag αρνητική λοίμωξη. Κανένας ασθενής δεν παρουσίαζε ταυτόχρονη λοίμωξη από άλλους ιούς της ηπατίτιδας (A, D ή E) ή από HIV. Κανένας από τους ασθενείς δεν λάμβανε αντι-ιϊκή ή ανοσοτροποποιητική θεραπεία κατά τους τελευταίους 3 μήνες πριν από την δειγματοληψία του ήπατος. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ηπατικά νοσήματα παρατίθενται στον **Πίνακα 2**.

Πίνακας 2. Κλινικά, Ιστοπαθολογικά, Ορολογικά και Δημογραφικά δεδομένα των ασθενών της μελέτης.

	CHB	**CHB-rem**	**CHC**
Αριθμός Ασθενών	22	13	9
Φύλο (Αρρεν/θήλυ)	11/11	9/4	7/2
*Ηλικία**	44.5, 22-65	49, 23-73	40, 32-54
*AST (U/mL)**	48, 17-1969	24, 19-51	53, 24-237
*ALT (U/mL)**	59.5, 15-1478	29, 17-49	90, 32-213
Βαθμός φλεγμονής			
I-0	0	0	0
I-1	3	9	1
I-2	13	4	3
I-3	4	0	5
I-4	2	0	0
*Ίνωση**	3, 0-6	2, 0-4	3, 1-4
*Βαθμός HAI**	6.5, 2-15	3, 1-7	9, 2-12

** διάμεση τιμή, εύρος*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Σε όλους τους ασθενείς έγινε πλήρης κλινικοεργαστηριακός έλεγχος, ελήφθησαν κλινικές πληροφορίες και μετρήθηκαν βασικές εργαστηριακές παράμετροι, όπως οι τιμές της AST και της ALT (**Πίνακας 2**). Για τον προσδιορισμό του φορτίου του HBV DNA (προ θεραπείας) και του HCV RNA χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά διαθέσιμα πακέτα δοκιμασιών bDNA V2.0 (Bayer, Siemens, PA, USA) και COBAS Amplicor (Roche Molecular Systems, NJ, USA), αντίστοιχα. Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β μετά από πέντε έτη περιελάμβανε τη βιοχημική ανταπόκριση με βάση τα φυσιολογικά επίπεδα της ALT και την πλήρη ιολογική ανταπόκριση που ορίζεται ως 169 αντίγραφα DNA του HBV/1 ml ορού (29 IU/ml), δηλαδή το κατώτερο όριο του ποσοτικού προσδιορισμού της δοκιμασίας COBAS Taqman (Roche Molecular Systems, NJ, USA)**,** η οποία χρησιμοποιήθηκε λόγω της εξαιρετικά μεγάλης ευαισθησίας της.

1.1.1 Βιοψίες

Οι βιοψίες μετά την λήψη χωρίστηκαν σε δύο μέρη. Το πρώτο χρησιμοποιήθηκε για την ιστοπαθολογική εξέταση, ενώ το δεύτερο αποθηκεύτηκε άμεσα σε βαθιά κατάψυξη (-80^{o}C) για να χρησιμοποιηθεί για μοριακή ανάλυση. Η ιστοπαθολογική εξέταση έγινε από δύο ανεξάρτητους έμπειρους παθολογανατόμους. Προσδιορίστηκαν ο βαθμός ενεργού δραστηριότητας της φλεγμονής και το στάδιο της ίνωσης. Στους ασθενείς με ιογενή ηπατίτιδα, ο βαθμός ενεργού δραστηριότητας της φλεγμονής (HAI) προσδιορίστηκε ημιποσοτικά σύμφωνα με το τροποποιημένο σύστημα HAI (**Πίνακας 3**)(125). Το σύστημα HAI συνδυάζει ιστοπαθολογικά δεδομένα από τέσσερεις ιστολογικές παραμέτρους ώστε να βγάλει ένα ενιαίο βαθμό φλεγμονής. Η σταδιοποίηση της ηπατικής ίνωσης έγινε βάση συγκεκριμένων ιστολογικών χαρακτηριστικών που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**. Συνολικά τα Κλινικά, Ιστοπαθολογικά, Ορολογικά και Δημογραφικά δεδομένα των ασθενών της μελέτης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2**.

Βάσει του βαθμού HAI οι ασθενείς κατατάχθηκαν στις ακόλουθες πέντε ομάδες:

I-0: απουσία φλεγμονής

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

I-1: ελάχιστη φλεγμονή (βαθμός HAI=1-4)

I-2: ήπια φλεγμονή (βαθμός HAI=5-8)

I-3: μέτρια φλεγμονή (βαθμός HAI=9-12)

I-4: σοβαρή φλεγμονή (βαθμός HAI=13-18)

Πίνακας 3. Βαθμός ενεργού δραστηριότητας της φλεγμονής (HAI) από 0 έως 18 βαθμοί

Ιστολογική Παράμετρος	Βαθμός
Πυλαία φλεγμονή	
απουσία	0
ήπια σε μερικά ή σε όλα τα πυλαία	1
μέτρια σε μερικά ή σε όλα τα πυλαία	2
μέτρια/πυκνή σε όλα τα πυλαία	3
πυκνή σε όλα τα πυλαία	4
Περιπυλαία Ηπατίτιδα	
Απουσία	0
Ήπια (εστιακή λίγα πυλαία)	1
Ήπια-μέτρια (εστιακή περισσότερα πυλαία)	2
Μέτρια (συνεχής <50% των πυλαίων)	3
Ικανή (συνεχής >50%)	4
Εστιακή νέκρωση (λυτική η αποπτωτική) / Εστιακή φλεγμονή *	
Μία εστία Χ10 αντικειμενικό	1
Δύο - τέσσερις εστίες Χ10 αντικειμενικό	2
Πέντε-δέκα εστίες Χ10 αντικειμενικό	3
Περισσότερες από δέκα Χ10 αντικειμενικό	4
Συρρέουσες νεκρώσεις	
Απουσία	0
Εστιακή συρρέουσα νέκρωση	1
Στη ζώνη 3 σε μερικές περιοχές	2
Στη ζώνη 3 στις περισσότερες περιοχές	3
Ζώνη 3 + λίγες πυλαιοκεντρικές γεφυρικές νεκρώσεις	4
Ζώνη 3 + πολυάριθμες πυλαιοκεντρικές γεφυρικές νεκρώσεις	5
Πανλοβιακές νεκρώσεις	6

*Δεν περιλαμβάνονται φλεγμονώδεις διηθήσεις στα ηπατικά κολποειδή.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Πίνακας 4. Σταδιοποίηση Ηπατικής Ίνωσης

	Στάδιο
Όχι ίνωση	***0***
Διεύρυνση μερικών πυλαίων από ινώδη ιστό Με ή χωρίς βραχέα ινώδη διαφραγμάτια	***1***
Διεύρυνση των περισσοτέρων πυλαιών από ινώδη ιστό Με ή χωρίς βραχέα διαφραγμάτια	***2***
Διεύρυνση των περισσοτέρων πυλαίων από ινώδη ιστό Με λίγες Πύλαιο \ Πυλαίες Γέφυρες	***3***
Διεύρυνση των περισσοτέρων πυλαίων από ινώδη ιστό Με έντονες Πύλαιο \ Πυλαίες η Πυλαιο \ Κεντρικές Γέφυρες	***4***
Ετονες Πύλαιο \ Πυλαίες η Πυλαιο \ Κεντρικές Γέφυρες Με όζο (ατελής η πιθανή κίρρωση)	***5***
Κίρρωση	***6***

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

1.2Μέθοδοι

Μελετήθηκε ο ρόλος του NLRP3 φλεγμονοσώματος στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες. Τα γονίδια που σχετίζονται με το NLRP3 φλεγμονόσωμα που μελετήθηκαν είναι *IL1B, CASP-1, NLRP3, ASC* και *IL1RA.* Αρχικά μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση των συστατικών του NLRP3 φλεγμονοσώματος στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες, συγκρίνοντας την έκφραση μεταξύ των διαφορετικών ομάδων. Στη συνέχεια αναλύθηκε η γονιδιακή έκφραση του NLRP3 φλεγμονοσώματος σε σχέση με τον βαθμό φλεγμονής και το στάδιο της ίνωσης. Τέλος αναλύθηκε η γονιδιακή έκφραση του NLRP3 φλεγμονοσώματος σε σχέση με τα ορολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

1.2.1 Έκφραση γονιδίων σε βιοψίες

1.2.1.1 Εκχύλιση RNA

Η απομόνωση ολικού RNA από τις ηπατικές βιοψίες με τη χρήση του μονοφασικού διαλύματος φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, TRIzol, έγινε ακολουθώντας τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας που συνοδεύουν το προϊόν. Η TRIzol διασπά τις μεμβράνες των κυττάρων και το εσωτερικό τους ενώ διατηρεί την ακεραιότητα του RNA κατά την ομογενοποίηση και λύση των ιστών και των κυττάρων. Η φυγοκέντρηση με χλωροφόρμιο διαχωρίζει τα ομογενοποιημένα δείγματα σε δύο φάσεις, μία ανόργανη και μία οργανική. Το RNA παραμένει στην ανόργανη φάση από όπου μπορεί να κατακρημνιστεί σε ίζημα με τη χρήση ισοπροπανόλης. Ακολούθησε πλύση του ιζήματος με διάλυμα 75% αιθανόλης. Η αναδιάλυση του ιζήματος έγινε σε νερό ελεύθερο RNAασών. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην εκχύλιση RNA παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Το μέρος της βιοψίας που δεν χρησιμοποιήθηκε για την ιστοπαθολογική εξέταση ήταν αποθηκευμένο στους -80^{o}C. Μόλις αποψύχθηκε η βιοψία τοποθετήθηκε απευθείας σε TRIzol. Η επεξεργασία έγινε με αποστειρωμένους πλαστικούς ομογενοποιητές. Μετά την ομογενοποίηση ακολούθησε ισχυρή ανακίνηση του σωληναρίου για 30 sec και πέρασμα του δείγματος 5 φορές μέσα από σύριγγα 21G. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature; RT) για 5 min και φυγοκέντρηση (12000 g; 10 min; 4^{o}C) (Microcentrifuge 5417R, Eppendorf, Cat 0023733). Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο φυγοκέντρησης 1,5 ml ελεύθερου ριβονουκλεασών (RNAασών), τύπου eppendorf. Προστέθηκαν 100 μL χλωροφορμίου στο φιαλίδιο. Έγινε ανακίνηση με αναστροφή του σωληνάριου και μετά από επώαση 8 min, σε RT, ακολούθησε φυγοκέντρηση σε συνθήκες όμοιες με τις προαναφερθείσες. Η υδάτινη φάση μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια και προστέθηκαν 500 μL ισοπροπανόλης. Τα σωληνάρια ανακινούνται για 10 sec. Έγινε επώαση σε RT για 5 min και φυγοκέντρηση (12000 g; 8 min; 20^{o}C). Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 mL 75%

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

αιθανόλης με αναστροφή των σωληναρίων. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (7600 g; 5 min; 4^{o}C), το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα σωληνάρια παρέμειναν ανοικτά σε RT για μικρό χρονικό διάστημα, ώστε να εξατμιστεί η εναπομείνασα αιθανόλη. Προστέθηκαν 50 μL νερό ελεύθερο RNAασών και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο.

Ακολούθησε ποσοτικοποίηση και έλεγχος της καθαρότητας του τελικού διαλύματος για όλα τα δείγματα με τη μέτρηση της απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) από τις βάσεις των ριβονουκλεοτιδίων του σε μήκη κύματος 260 nm (OD260) και 280nm (OD280) σε φασματοφωτόμετρο (Bio Photometer, Eppendorf). Για τον μηδενισμό της απορρόφησης του υποβάθρου χρησιμοποιήθηκε νερό ελεύθερο RNAασών (τυφλό ή blank). Στην ίδια κυβέτα UVette τοποθετήθηκε το άγνωστο δείγμα σε αραίωση 1/40 και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή του σε ng/μL. Σε μήκος κύματος 260 nm ελέγχεται η περιεκτικότητα σε DNA, ενώ σε μήκος κύματος 280 nm ελέγχεται η πρόσμιξη με πρωτεΐνες. Η εκτίμηση της καθαρότητας έγινε με τον προσδιορισμό του λόγου των μετρήσεων στα 260 nm και 280 nm (OD260/ OD280). Το καθαρό RNA δίνει λόγο A260/A280 ίσο με 2. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν υψηλής καθαρότητας RNA με ελάχιστες προσμίξεις και πηλίκο μεταξύ 1,6 με 2. Ακολούθησε επαλήθευση της συγκέντρωσης και έλεγχος της ποιότητας του δείγματος για την παρουσία γενομικού DNA με ηλεκτροφόρηση 2.5 μL RNA σε πηκτή αγαρόζης, πυκνότητας 1,5% με προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και τη χρήση μάρτυρα DNA, σε συσκευή Wide Mini Subcell GT system and PowerPac Basic power supply (BioRad, Cat 164-0301). Μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80^{o}C. Καθ’ όλη τη διάρκεια των παραπάνω διεργασιών, όλοι οι χώροι και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγούμενα καθαριστεί με το διάλυμα απολύμανσης επιφανειών RNAaseZap που καταστρέφει τις RNAάσες μετά από επαφή.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μοριακή ανάλυση των δειγμάτων

Αντιδραστήριο	**Όνομα προϊόντος**	**Αρ. Καταλόγου**	**Προέλευση**
Διάλυμα TRIzol	TRIzol Reagent	15596-026	Invitrogen, Life Technologies, UK
Χλωροφόρμιο	Acid phenol Chloroform	112250	Euroclone, Italy
Ισοπροπανόλη	Isopropanol	AL0323	Scharlau, Spain
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	E/0650DF/C17	Fischer Scientific, Eu
Νερό ελεύθερο Rνασών	Ultra Pure Water	10977-015	Gibco, USA
Αγαρόζη	Agarose	16500-500	Invitrogen, Life Technologies, UK
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10 mg/mL	161-0433	BioRad, USA
Μάρτυρας DNA	100bp DNA Ladder	15628-019	Invitrogen, Life Technologies, UK
Διάλυμα προστασίας από RNάσες	Rnase ZAP	AM9780	Ambion, Life Technologies, UK
Ανάστροφη μεταγραφάση MMLV	MMLV-RT	28025-021	Invitrogen, Life Technologies, UK
dATP	100 mM dATP solution	55082	Invitrogen, Life Technologies, UK
dCTP	100 mM dCTP solution	55083	Invitrogen, Life Technologies, UK
dGTP	100 mM dGTP solution	55084	Invitrogen, Life Technologies, UK
dTTP	100 mM dTTP solution	55085	Invitrogen, Life Technologies, UK
Αναστολέας των RNασών	RNAasin Rnase Inhibitor, 2,500 U/mL	N2111	Promega, USA
Τυχαία εξανουκλεοτίδια	Primer Random p(dN)	14292421	Roche, Eu
SYBR Green I	Platinum SYBR Green qPCR Supermix- UDG	11733-038	Invitrogen, Life Technologies, UK

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

1.2.1.2Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση συμπληρωματικών μορίων DNA (complementary DNA, cDNA) από το RNA, που απομονώθηκε από τις βιοψίες, πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της PCR ανάστροφης μεταγραφής (Reverse Transcriptase PCR; RT PCR). Χρησιμοποιήθηκε το κιτ της M-MLV ανάστροφης μεταγραφάσης (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; M-MLV RT) που περιελάμβανε τα αντιδραστήρια MMLV-RT, 5xFS buffer, και 0,1 DTT (**Πίνακας 5**). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, (Deoxynucleotide Triphosphates; dNTPs, dATP, dTTP, dCTP, και dGTP), τελικής συγκέντρωσης 10 mM κι ένας αναστολέας των RNAασών (RNAase Inhibitor; RNAasin), ενώ ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν τυχαία εξανουκλεοτίδια (random hexamers) (50pmol/μL) (**Πίνακας 5**).

Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε 1μg RNA από κάθε δείγμα. Η κατάλληλη ποσότητα RNA και 4 μL εκκινητών τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο σωληνάριο PCR 0,2 mL, ενώ προστέθηκε και τόση ποσότητα νερού, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 14 μL. Στη συνέχεια τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στους 72^{o}C για 2 min ώστε να επιτευχθεί η αποδιάταξη των μορίων. Έπειτα, έγινε παύση της αντίδρασης για να προστεθούν 11 μL μείγματος αντιδραστηρίων (master mix) και ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους 42^{o}C για 60 min και στους 65^{o}C για 10 min για να επέλθει αδρανοποίηση των ενζύμων. Το master mix περιέχει 5μL 5xFS buffer, 2 μL διάλυμα dNTPs, 2.25 μL 0,1 DTT, 0.6 μL RNasin και 1.25 μL MMLV-RT. Με το πέρας της αντίδρασης προστέθηκαν 25 μL νερού και τα δείγματα cDNA αποθηκεύτηκαν στους -80^{o}C, μέχρις ότου να χρησιμοποιηθούν.

1.2.1.3 Έκφραση γονιδίων

Μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το φλεγμονόσωμα. Τα γονίδια που σχετίζονται με το φλεγμονόσωμα και μελετήθηκαν είναι *IL1B, CASP1, NLRP3, ASC* και *IL1RA*. Για την μελέτη της έκφρασης επιλέχθηκε η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). Η Real-Time PCR είναι μια αντίδραση PCR με την διαφορά ότι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

παρακολουθείται η πρόοδος της αντίδρασης και η ποσότητα των μεταγράφων μέσω της μέτρησης του φθορισμού σε κάθε κύκλο. Επιλέχθηκε η ημι-ποσοτική Real-Time PCR με μέτρηση του φθορισμού του δίκλονου DNA στο τέλος κάθε κύκλου με το αντιδραστήριο SYBR Green, το οποίο φθορίζει μόνο όταν προσδένεται με δίκλονο DNA. Ως γονίδιο αναφοράς (housekeeping/reference gene) επιλέχθηκε το γονίδιο της β-2-μικροσφαιρίνης *B2M* που έχει αναφερθεί ως ένα από τα προτεινόμενα γονίδια, εξαιτίας της σταθερής του έκφρασης ανεξάρτητα των συνθηκών. Ο ημι-ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με την μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$ όπως αύτη περιγράφεται στην βιβλιογραφία(126). Οι εκκινητές για όλα τα γονίδια σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Oligo 7 (Molecular Biology Insights, US) και η προμήθεια έγινε από την Invitrogen (Life Technologies, UK). Όλοι οι εκκινητές κατά την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης τους είχαν απόδοση (efficiency) μεταξύ 0.95 και 1.05. Η Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα RotorGene 6000 (Corbett Life Science, Sydney, Australia). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν υπό τις ακόλουθες συνθήκες:

Βήμα 1: 5 min στους 52^{o}C,

Βήμα 2: 2min στους 95^{o}C,

Βήμα 3: 40 κύκλοι στους 95^{o}C για 15 sec και 40 sec στην Tm,

Βήμα 4: 5 min στους 52^{o}C και

Βήμα 5: ανάλυση καμπύλης τήξης 65^{o}C με 95^{o}C σε βήματα 0.5^{o}C.

Η Tm για κάθε ζευγάρι εκκινητών καθώς και η αλληλουχία τους παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**. Για την προετοιμασία του μείγματος των αντιδραστηρίων της PCR για την ανάλυση κάθε γονιδίου χρησιμοποιήθηκε το Platinum SYBR Green qPCR Supermix- UDG, το αντίστοιχο ζεύγος των εκκινητών και H2O. Τα δείγματα cDNA και τα αντιδραστήρια αποψύχθηκαν και διατηρήθηκαν σε πάγο ώσπου να χρησιμοποιηθούν. Έπειτα, παρασκευάστηκε το μείγμα της αντίδρασης (master mix) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Το μείγμα για κάθε αντίδραση περιείχε 12.5 μL SYBR Green, 9.5 μL νερό και 0.5 μL από κάθε εκκινητή. Για να ελεγχθεί η καθαρότητα των αντιδραστηρίων και να

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

αποκλειστεί η ύπαρξη τυχών προσμίξεων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που αντί για cDNA στο μείγμα της αντίδρασης είχε προστεθεί νερό. Για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της αντίδρασης Real-Time PCR και να μειωθούν τα τυχόν σφάλματα στην πειραματική διαδικασία, κάθε δείγμα αναλύθηκε στην αντίδραση εις διπλούν (duplicates). Δεν έγιναν αποδεκτές διαφορές μεταξύ των δύο μεγαλύτερες του 0.5 Ct. Όταν υπήρξαν το δείγμα επαναλήφθηκε.

Πίνακας 6. Εκκινητές και Tm για τα γονίδια που αναλύθηκαν με Real Time PCR

Γονίδιο	**Εκκινητής**	**Αλληλουχία (5'-3')**	**Tm (°C)**
IL1B	Εμπρόσθιος	ATGGCTTATTACAGTGGCAATGAG	56
	Οπίσθιος	GTAGTGGTGGTCGGAGATTCG	
CASP1	Εμπρόσθιος	TGAGCAAGTCCCAGATATAC	56
	Οπίσθιος	TAGTTGGTAAAGATAGGTTTC	
NLRP3	Εμπρόσθιος	ACTCATCCGTGTGCCGTGTTC	56
	Οπίσθιος	GGTGCTTGCCATCTTCATCTGC	
ASC	Εμπρόσθιος	TTGAGTGGCTGCTGGATG	56
	Οπίσθιος	GCTGGTGTGAAACTGAAGAG	
IL1RA	Εμπρόσθιος	CAGGATCAAACCCCGACCAC	56
	Οπίσθιος	GCATGGGAAGGTGGAATGAGG	
B2M	Εμπρόσθιος	CTATCCAGCGTACTCCAAAG	60
	Οπίσθιος	GAAAGACCAGTCCTTGCTGA	

1.2.2 Έκφραση γονιδίων σε καλλιεργημένα κύτταρα

Οι κυτταρικές σειρές Huh7.5 (ανθρώπινα ηπατοκύτταρα από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ασθενούς) και LX-2 (αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά από πρωτεύοντα HSCs) διατηρήθηκαν σε DMEM με 10% και 2% (v/v) θερμικά αδρανοποιημένο FCS, αντίστοιχα. Η κυτταρική σειρά μονοκυττάρων THP-1 (προερχόμενη από ασθενή με οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία) καλλιεργήθηκε σε RPMI με 10% (v/v) FCS. Σε όλα τα θρεπτικά προστέθηκε 2 mM γλουταμίνη και 100 U/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Επιπλέον, στο θρεπτικό των Huh7.5 κυττάρων προστέθηκαν μη απαραίτητα αμινοξέα. Τα THP-1 κύτταρα διαφοροποιήθηκαν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

τερματικά σε μακροφάγα χρησιμοποιώντας 0.16μM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) για 24h. Για τα έμμεσα πειράματα συν-καλλιέργειας, τα Huh7.5 κύτταρα τοποθετήθηκαν στις κατάλληλες πλάκες πολλαπλών πηγαδιών και επικαλύφθηκαν με κρεμαστά ένθετα (Greiner) που δεν επιτρέπουν την κυτταρική επαφή. Τα LX-2 κύτταρα τοποθετήθηκαν στην άνω επιφάνεια της μεμβράνης ενθέματος σε αναλογία 5: 1 Huh7.5:LX-2. Για το μοντέλο τριπλής συν-καλλιέργειας, τα κύτταρα Huh7.5 τοποθετήθηκαν στον πυθμένα των πλακών πολλαπλών πηγαδιών, ενώ τα κύτταρα THP-1 και LX2 τοποθετήθηκαν στην άνω και κάτω πλευρά της μεμβράνης ενθέματος, αντίστοιχα, σε αναλογία Huh7.5:LX-2:THP-1 5:1:1. Οι παραπάνω αναλογίες κυττάρων επιλέχθηκαν έτσι ώστε οι συν-καλλιέργειες να προσομοιώνουν το μη ινωτικό, μη φλεγμονώδες ηπατικό περιβάλλον (127, 128).

Οι ιογενείς μολύνσεις των επιτρεπτών Huh7.5 κυττάρων με τον μολυσματικό κλώνο JFH-1 διεξήχθησαν σε πολλαπλότητα μόλυνσης =1, όπως έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία (129). Η αποτελεσματικότητα της μολύνσεως παρακολουθήθηκε με ανάλυση qRT-PCR της έκφρασης γονιδίου *NS3*, όπως έχει δειχθεί προηγουμένως (129). Τέσσερεις ώρες μετά τη μόλυνση με HCV σωματίδια, τα μολυσμένα κύτταρα Huh7.5 τοποθετήθηκαν μαζί με τους άλλους κυτταρικούς τύπους και προστέθηκε φρέσκο θρεπτικό. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι λοιμώξεις συμβαίνουν με κύτταρα Huh7.5 ξεχωριστά και 4 ώρες αργότερα εισάγονται με τους άλλους τύπους κυττάρων τοποθετούνται πάνω τους. Η ιδέα αυτού του τύπου in vitro συστήματος είναι να έχουν πάντα τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα και τα άλλα κύτταρα που υπάρχουν κανονικά στο ήπαρ, να συν-καλλιεργούνται.

1.2.3 Στατιστική ανάλυση

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το πρόγραμμα SPSS (version 23.0, Chicago, Il, USA). Η έκφραση των γονιδίων αντιμετωπίστηκε ως συνεχής μεταβλητή χωρίς κανονική (Γκαουσιανή) κατανομή. Ως στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε η δίπλευρη τιμή p (two-tailed p-value) μικρότερη του 0.05 ($p<0.05$).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελετήθηκε ο ρόλος του NLRP3 φλεγμονοσώματος στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες. Τα γονίδια που σχετίζονται με το NLRP3 φλεγμονόσωμα που μελετήθηκαν είναι *IL1B, CASP1, NLRP3, ASC* και *IL1RA*. Αρχικά μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση των συστατικών του NLRP3 φλεγμονοσώματος στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες, συγκρίνοντας την έκφραση μεταξύ των διαφορετικών ομάδων. Στη συνέχεια αναλύθηκε η γονιδιακή έκφραση των συστατικών του NLRP3 φλεγμονοσώματος σε σχέση με τον βαθμό φλεγμονής και το στάδιο της ίνωσης. Επιπρόσθετα, αναλύθηκε η γονιδιακή έκφραση των συστατικών του NLRP3 φλεγμονοσώματος σε σχέση με τα ορολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Τέλος, έγινε μελέτη των γονιδίων *IL1B* και *NLRP3* στο in vitro μοντέλο λοίμωξης με HCV.

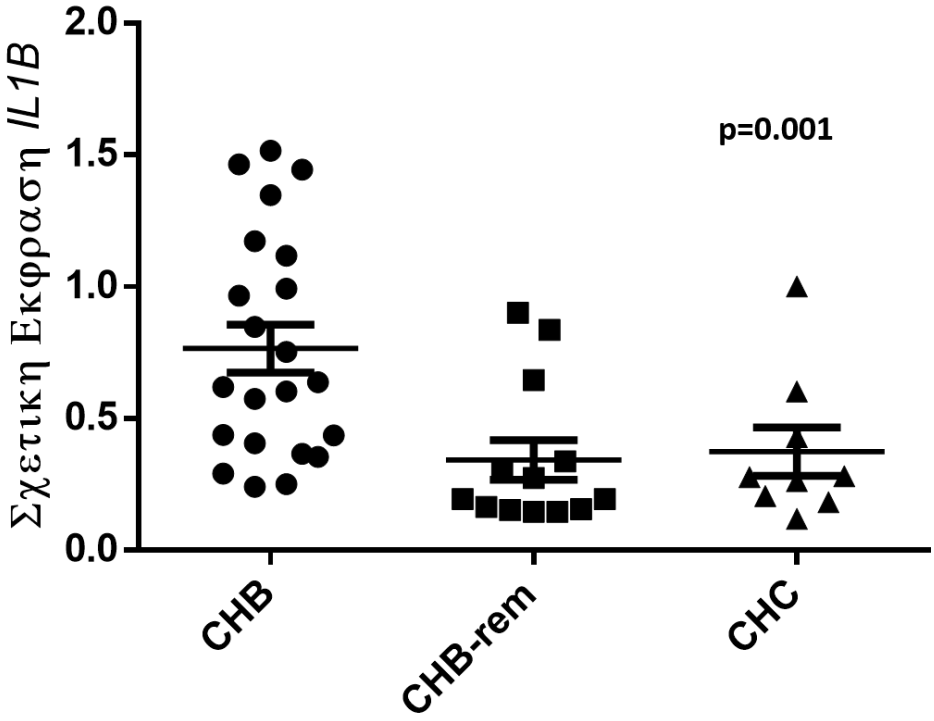
2.1Γονιδιακή έκφραση των συστατικών του NLRP3 φλεγμονοσώματος στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες

Η γονιδιακή έκφραση των συστατικών του NLRP3 φλεγμονοσώματος μελετήθηκε χρησιμοποιώντας ημιποσοτική Real-Time PCR όπως περιγράφεται στις μεθόδους. Τα αποτελέσματα αναλυθήκαν πρώτα χρησιμοποιώντας την στατιστική δοκιμασία Kruskal Wallis. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας post hoc στατιστική δοκιμασία Dunn’s. Όλες οι τιμές σε αυτή την ενότητα είναι μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

2.1.1 Έκφραση του γονιδίου *IL1B*

Η έκφραση του *IL1B* εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων με ισχυρή στατιστική σημαντικότητα (Kruskal Wallis, p=0.001). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 4**. Η ομάδα CHB εμφάνισε μεγαλύτερη έκφραση από τις άλλες δύο ομάδες. Χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Dunn's προσδιορίσθηκαν οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των μεμονωμένων ομάδων. Στατιστική σημαντικότητα εμφανίστηκε μεταξύ των ομάδων CHB και CHB-rem (CHB 0.765 ± 0.090 vs CHB-rem 0.342 ± 0.075, p=0.002) και μεταξύ των ομάδων CHB και CHC (CHB 0.765 ± 0.090 vs CHC 0.374 ± 0.092, p=0.033). Μεταξύ των ομάδων CHB-rem και CHC δεν εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (CHB-rem 0.342 ± 0.075 vs CHC 0.374 ± 0.092, p>0.999).

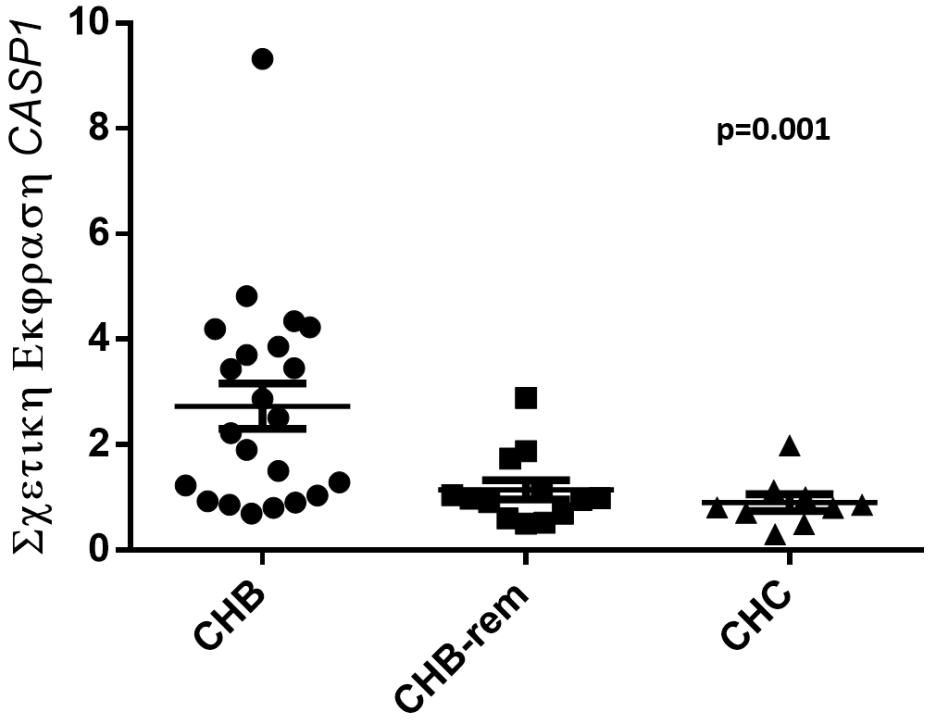


Εικόνα 4. Έκφραση του γονιδίου *IL1B* στις ιογενείς ηπατίτιδες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. CHB= ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (n=22), CHB-rem= ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β σε ύφεση για πάνω από 240 εβδομάδες (n=13), CHC= ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (n=9). (Kruskal Wallis, p=0.001).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

2.1.2 Έκφραση του γονιδίου *CASP1*

Η έκφραση του *CASP1* εμφάνισε διαφορετική έκφραση μεταξύ των ομάδων με ισχυρή στατιστική σημαντικότητα (Kruskal Wallis, p=0.001). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 5**. Η ομάδα CHB εμφάνισε μεγαλύτερη έκφραση από τις άλλες δύο ομάδες. Χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Dunn's προσδιορίσθηκαν οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των μεμονωμένων ομάδων. Στατιστική σημαντικότητα εμφανίστηκε μεταξύ των ομάδων CHB και CHB-rem (CHB 2.733 ± 0.431 vs CHB-rem 1.144 ± 0.186, p=0.023) και μεταξύ των ομάδων CHB και CHC (CHB 2.733 ± 0.431 vs CHC 0.901 ± 0.159, p=0.004). Μεταξύ των ομάδων CHB-rem και CHC δεν εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (CHB-rem 1.144 ± 0.186 vs CHC 0.901 ± 0.159, p>0.999).

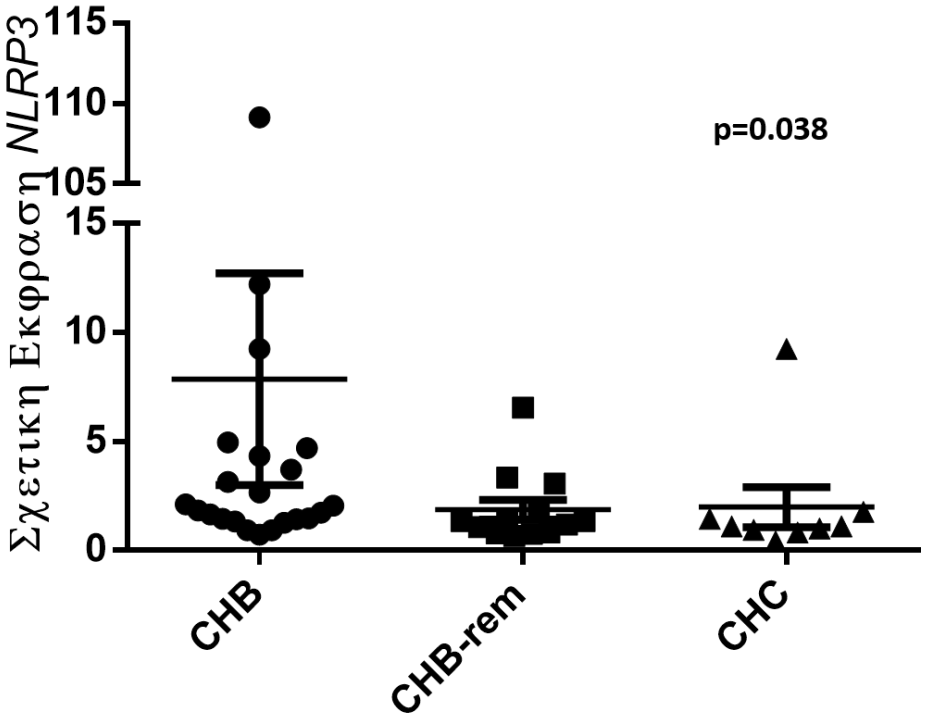


Εικόνα 5. Έκφραση του γονιδίου *CASP1* στις ιογενείς ηπατίτιδες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. CHB= ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (n=22), CHB-rem= ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β σε ύφεση για πάνω από 240 εβδομάδες (n=13), CHC= ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (n=9). (Kruskal Wallis, p=0.001).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

2.1.3 Έκφραση του γονιδίου *NLRP3*

Η έκφραση του *NLRP3* ήταν διαφορετική μεταξύ των ομάδων με στατιστική σημαντικότητα (Kruskal Wallis, p=0.038). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 6**. Η ομάδα CHB εμφάνισε μεγαλύτερη έκφραση και διασπορά από τις άλλες δύο ομάδες. Πράγμα που πιθανώς επηρέασε την post hoc ανάλυση. Χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Dunn's δεν παρουσιάσθηκαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων CHB και CHB-rem (CHB 7.857 ± 4.860 vs CHB-rem 1.857 ± 0.455, p=0.153), CHB και CHC (CHB 7.857 ± 4.860 vs CHC 1.980 ± 0.918, p=0.082) και CHB-rem και CHC (CHB-rem 1.857 ± 0.455 vs CHC 1.980 ± 0.918, p>0.999).

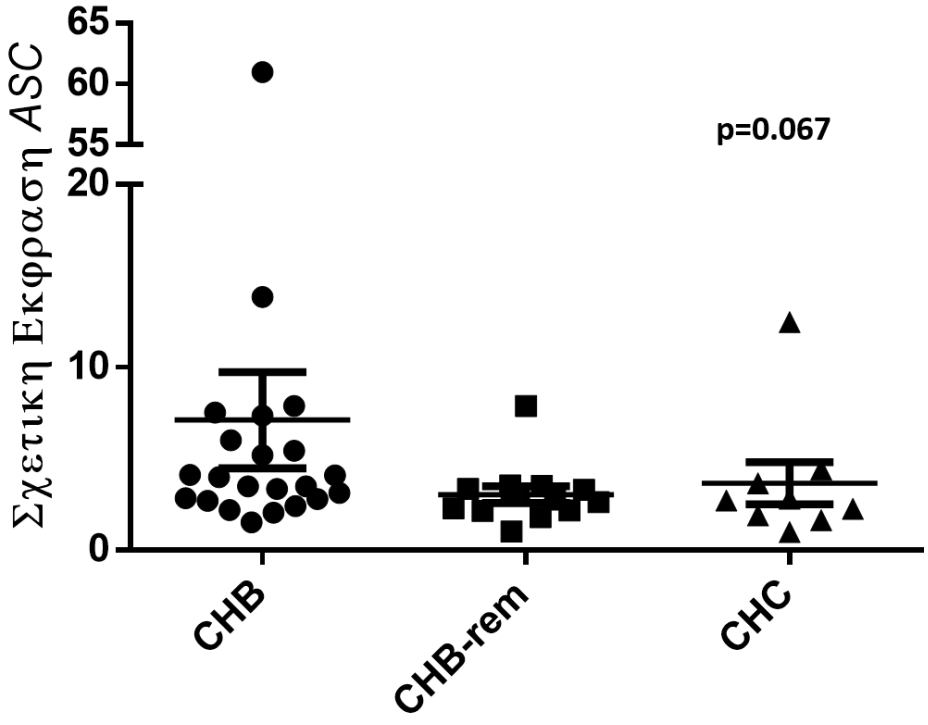


Εικόνα 6. Έκφραση του γονιδίου *NLRP3* στις ιογενείς ηπατίτιδες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. CHB= ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (n=22), CHB-rem= ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β σε ύφεση για πάνω από 240 εβδομάδες (n=13), CHC= ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (n=9). (Kruskal Wallis, p=0.038).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

2.1.4 Έκφραση του γονιδίου *ASC*

Η έκφραση του *ASC* εμφάνισε διαφορετική έκφραση μεταξύ των ομάδων χωρίς στατιστική σημαντικότητα (Kruskal Wallis, p=0.067). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 7**. Η ομάδα CHB εμφάνισε μεγαλύτερη έκφραση από τις άλλες δύο ομάδες. Χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Dunn's δεν παρουσιάσθηκαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων CHB και CHB-rem (CHB 7.109 ± 2.631 vs CHB-rem 3.035 ± 0.453, p=0.153), CHB και CHC (CHB 7.109 ± 2.631 vs CHC 3.656 ± 1.154, p=0.082) και CHB-rem και CHC (CHB-rem 3.035 ± 0.453 vs CHC 3.656 ± 1.154, p>0.999).

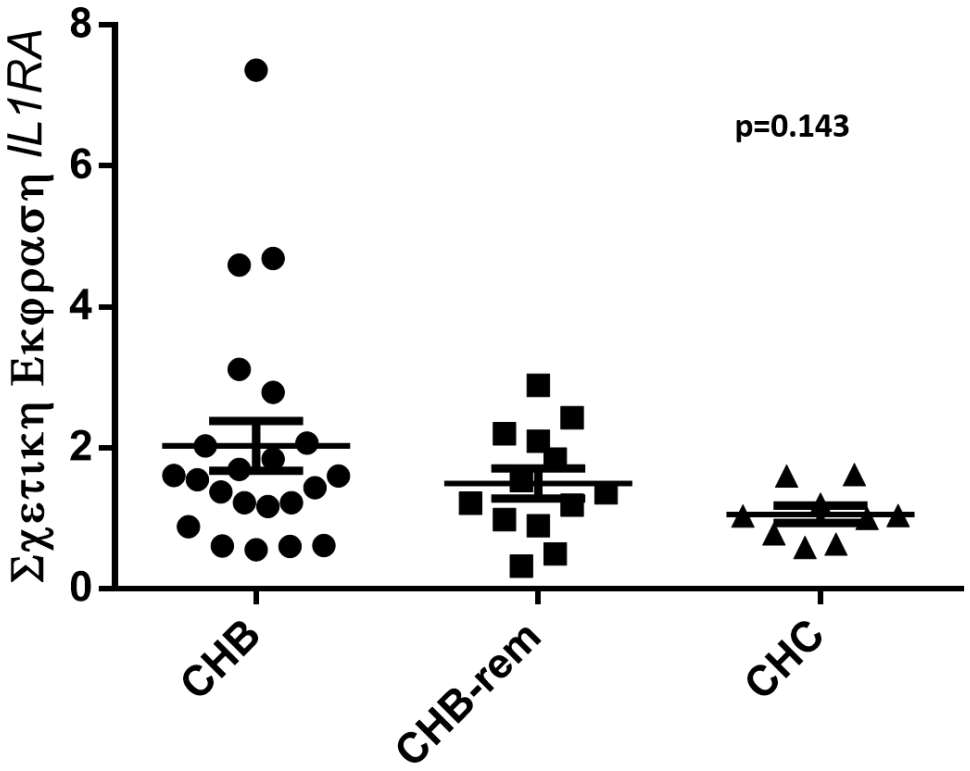


Εικόνα 7. Έκφραση του γονιδίου *ASC* στις ιογενείς ηπατίτιδες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. CHB= ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (n=22), CHB-rem= ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β σε ύφεση για πάνω από 240 εβδομάδες (n=13), CHC= ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (n=9). (Kruskal Wallis, p=0.067).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

2.1.5 Έκφραση του γονιδίου *IL1RA*

Η έκφραση του *IL1RA* δεν εμφάνισε διαφορετική έκφραση μεταξύ των ομάδων (Kruskal Wallis, p=0.143). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 8**. Χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Dunn's δεν παρουσιάσθηκαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων CHB και CHB-rem (CHB 2.030 ± 0.351 vs CHB-rem 1.498 ± 0.211, p=0.153), CHB και CHC (CHB 2.030 ± 0.351 vs CHC 1.058 ± 0.124, p=0.082) και CHB-rem και CHC (CHB-rem 1.498 ± 0.211 vs CHC 1.058 ± 0.124, p>0.999).



Εικόνα 8. Έκφραση του γονιδίου *IL1RA* στις ιογενείς ηπατίτιδες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. CHB= ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (n=22), CHB-rem= ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β σε ύφεση για πάνω από 240 εβδομάδες (n=13), CHC= ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (n=9). (Kruskal Wallis, p=0.143).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Η στατιστική σημαντικότητα στην έκφραση του *NLRP3* και η οριακή τιμή του *ASC* χάνονται με την αφαίρεση ενός δείγματος της ομάδας CHB με εξαιρετικά υψηλές τιμές (125 και 60 φορές πάνω από την τιμή αναφοράς αντίστοιχα). Οι τιμές χωρίς αυτό το δείγμα με τη στατιστική δοκιμασία Kruskal Wallis είναι p=0.058 για το *NLRP3* και p=0.102 για το *ASC*. Το αποτέλεσμα του δείγματος επιβεβαιώθηκε με πολλαπλές επαναλήψεις. Το ίδιο δείγμα στα άλλα γονίδια δεν έχει τιμές που διαφέρουν από την υπόλοιπη ομάδα γι' αυτό και το δείγμα συμπεριλαμβάνεται σε όλες τις αναλύσεις.

2.2Γονιδιακή έκφραση των συστατικών του NLRP3 φλεγμονοσώματος σε σχέση με την φλεγμονή και την ίνωση

Τα δεδομένα της έκφρασης των γονιδίων *IL1B, CASP1, NLRP3, ASC* και *IL1RA* αναλύθηκαν σε σχέση με το βαθμό της φλεγμονής και σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης. Ο βαθμός της φλεγμονής και το στάδιο της ίνωσης ορίστηκαν βάσει της κλίμακας βαρύτητας HAI μετά από παθολογανατομική εξέταση. Οι αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας την στατιστική δοκιμασία Kruskal Wallis. Αρχικά αναλύθηκαν όλα τα δείγματα ανεξάρτητα εάν είχαν χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή από HBV ή από HCV. Στην συνέχεια αναλύθηκαν μόνο τα δείγματα με χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή από HBV. Ο αριθμός των δειγμάτων με χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή από HCV ήταν πολύ μικρός για να αναλυθεί μεμονωμένα. Αυτό έγινε για να φανεί εάν βλέπουμε διαφορές που σχετίζονται γενικά με την χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή ανεξάρτητα από τον ιό που την προκαλεί ή οι διαφορές που βλέπουμε είναι ειδικές για τον ιό που προκαλεί την χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή.

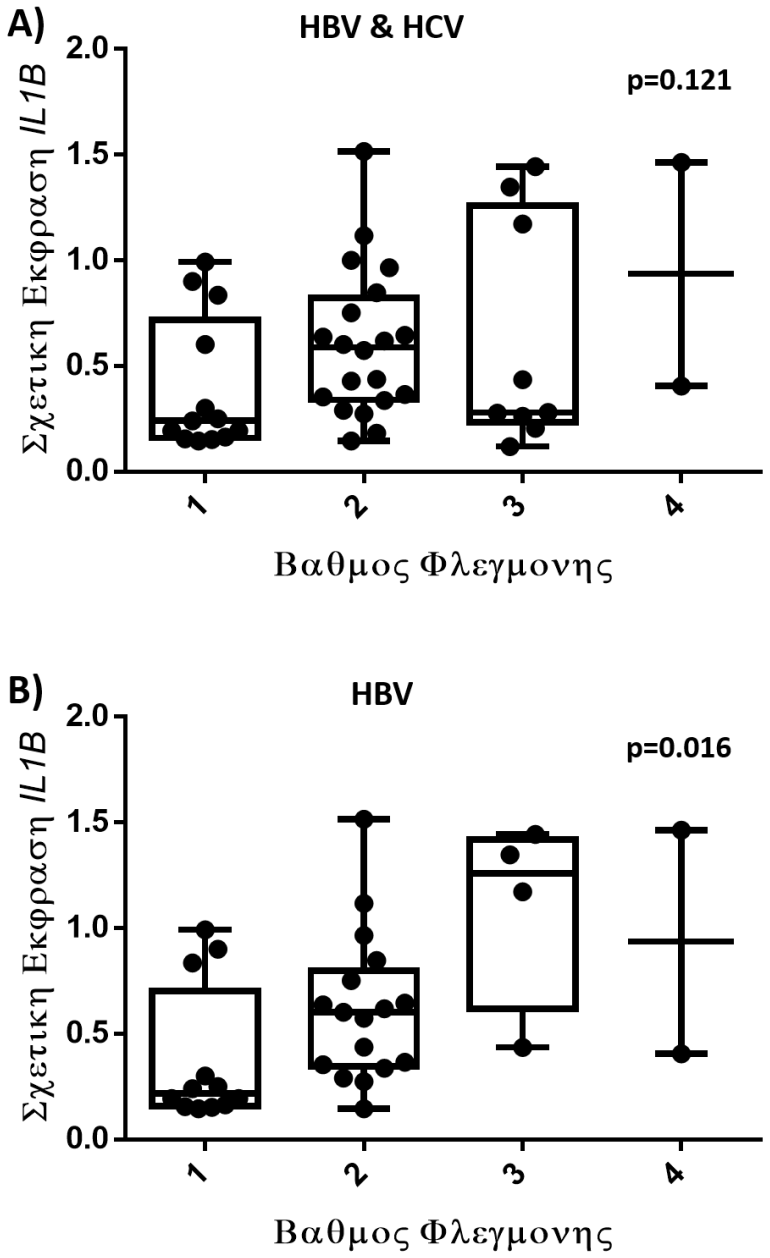
Αναλύοντας τα δείγματα ως μία ενιαία ομάδα τα αποτελέσματα των αναλύσεων της έκφρασης των γονιδίων σε σχέση με το βαθμό της φλεγμονής και το στάδιο της ίνωσης δεν έδωσαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Η έκφραση του *IL1B* σε σχέση με το βαθμό της φλεγμονής έδωσε p=0.121 (**Εικόνα 9A**) και σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης p=0.570 (**Εικόνα 10A**). Η έκφραση του *CASP1* σε σχέση με το βαθμό της φλεγμονής έδωσε p=0.427 (**Εικόνα 11A**) και σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης p=0.413 (**Εικόνα 12A**). Η έκφραση του *NLRP3* σε σχέση με το βαθμό

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

της φλεγμονής έδωσε p=0.266 (**Εικόνα 13A**) και σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης p=0.835 (**Εικόνα 14A**). Η έκφραση του *ASC* σε σχέση με το βαθμό της φλεγμονής έδωσε p=0.929 (**Εικόνα 15A**) και σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης p=0.504 (**Εικόνα 16A**). Η έκφραση του *IL1RA* σε σχέση με το βαθμό της φλεγμονής έδωσε p=0.092 (**Εικόνα 17A**) και σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης p=0.287 (**Εικόνα 18A**).

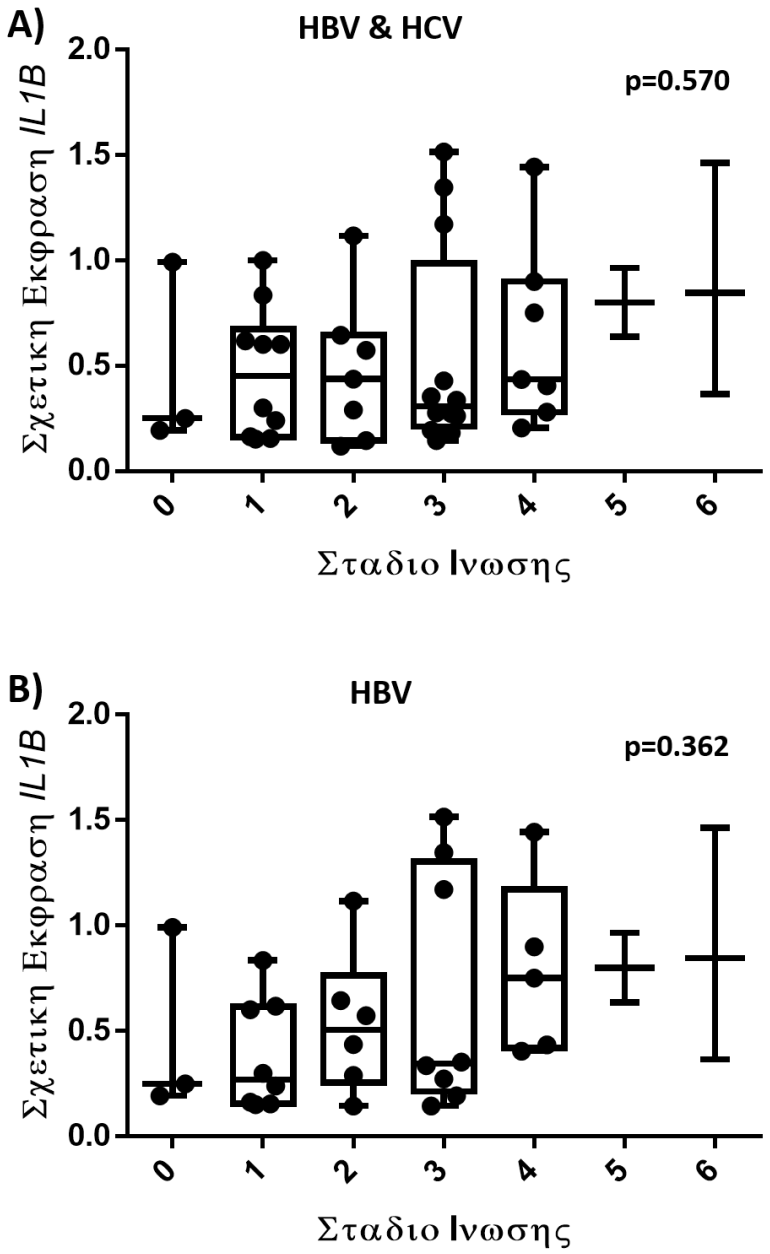
Αναλύοντας τα δείγματα που προέρχονταν μόνο από ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή από HBV παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της έκφρασης του *IL1B* και του βαθμού της φλεγμονής (p=0.016) (**Εικόνα 9B**). Όλες οι άλλες σχέσεις δεν εμφάνισαν στατιστική σημαντικότητα. Η έκφραση του *IL1B* σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης έδωσε p=0.362 (**Εικόνα 10B**). Η έκφραση του *CASP1* σε σχέση με το βαθμό της φλεγμονής έδωσε p=0.123 (**Εικόνα 11B**) και σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης p=0.133 (**Εικόνα 12B**). Η έκφραση του *NLRP3* σε σχέση με το βαθμό της φλεγμονής έδωσε p=0.844 (**Εικόνα 13B**) και σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης p=0.894 (**Εικόνα 14B**). Η έκφραση του *ASC* σε σχέση με το βαθμό της φλεγμονής έδωσε p=0.408 (**Εικόνα 15B**) και σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης p=0.686 (**Εικόνα 16B**). Η έκφραση του *IL1RA* σε σχέση με το βαθμό της φλεγμονής έδωσε p=0.466 (**Εικόνα 17B**) και σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης p=0.486 (**Εικόνα 18B**).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42



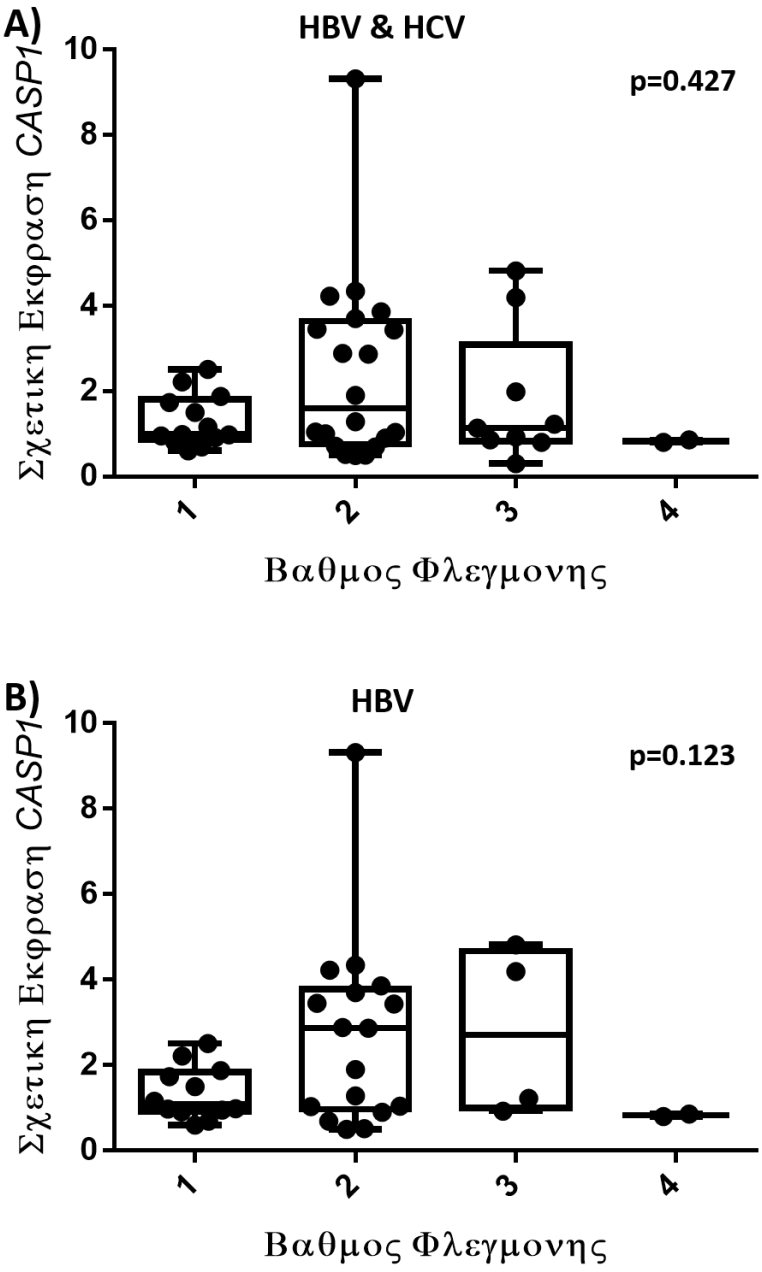
Εικόνα 9. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την έκφραση του γονιδίου *IL1B* στις ιογενείς ηπατίτιδες σε σύγκριση με τον βαθμό φλεγμονής. Ο βαθμός φλεγμονής χωρίζεται σε 1=ελάχιστη, 2=ήπια, 3=μέτρια και 4=σοβαρή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως θηκογράμματα με όλα τα σημεία να φαίνονται. Οι αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας την στατιστική δοκιμασία Kruskal Wallis. **A)** Όλα τα δείγματα (HBV και HCV) σε σχέση με το βαθμό φλεγμονής δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.121). **B)** Τα δείγματα με HBV σε σχέση με το βαθμό φλεγμονής εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.016). Όσο αυξάνει ο βαθμός φλεγμονής αυξάνει και σχετική έκφραση του γονιδίου της IL-1β.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42



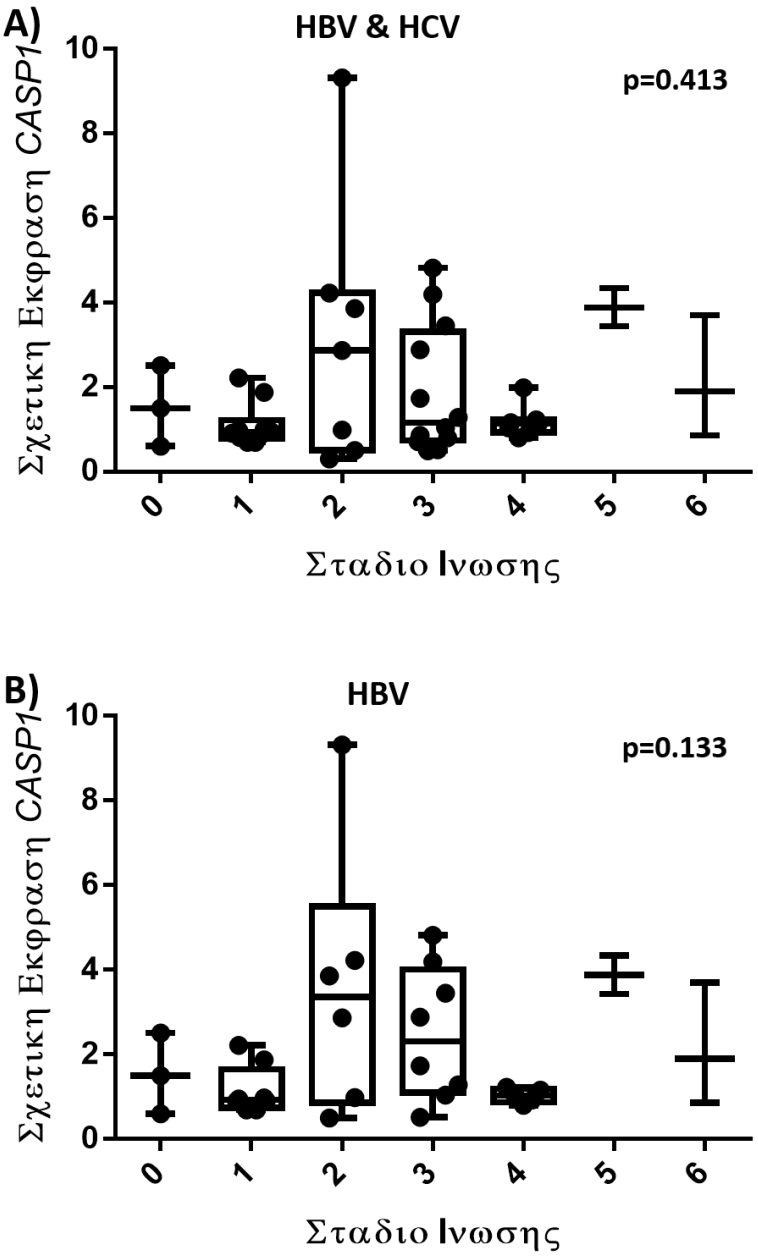
Εικόνα 10. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την έκφραση του γονιδίου *IL1B* στις ιογενείς ηπατίτιδες σε σύγκριση με το στάδιο της ίνωσης, όπως αυτό ορίστηκε από την παθολογανατομική εξέταση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως θηκογράμματα με όλα τα σημεία να φαίνονται. Οι αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας την στατιστική δοκιμασία Kruskal Wallis. **A)** Όλα τα δείγματα (HBV και HCV) σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.570). **B)** Τα δείγματα με HBV σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.362).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42



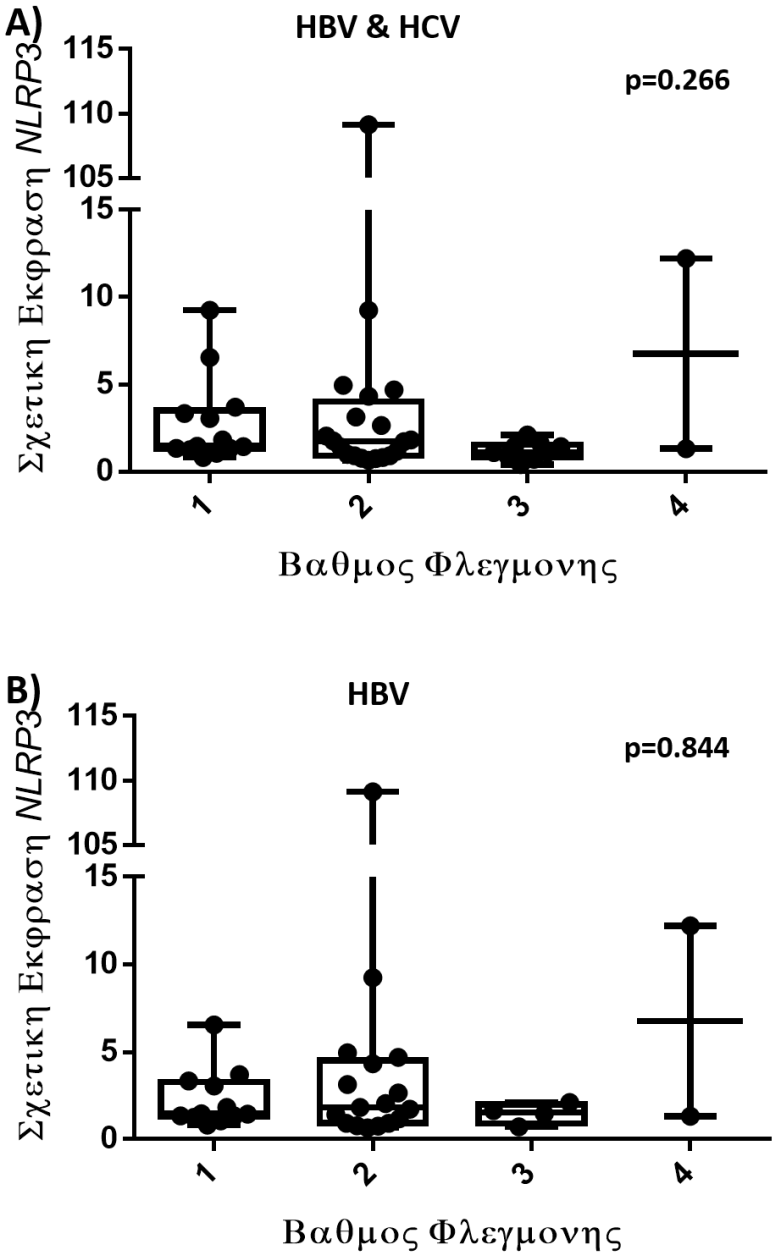
Εικόνα 11. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την έκφραση του γονιδίου *CASP1* στις ιογενείς ηπατίτιδες σε σύγκριση με τον βαθμό φλεγμονής. Ο βαθμός φλεγμονής χωρίζεται σε 1=ελάχιστη, 2=ήπια, 3=μέτρια και 4=σοβαρή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως θηκογράμματα με όλα τα σημεία να φαίνονται. Οι αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας την στατιστική δοκιμασία Kruskal Wallis. **A)** Όλα τα δείγματα (HBV και HCV) σε σχέση με το βαθμό φλεγμονής δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.427). **B)** Μόνο τα δείγματα με HBV σε σχέση με το βαθμό φλεγμονής δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.123).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42



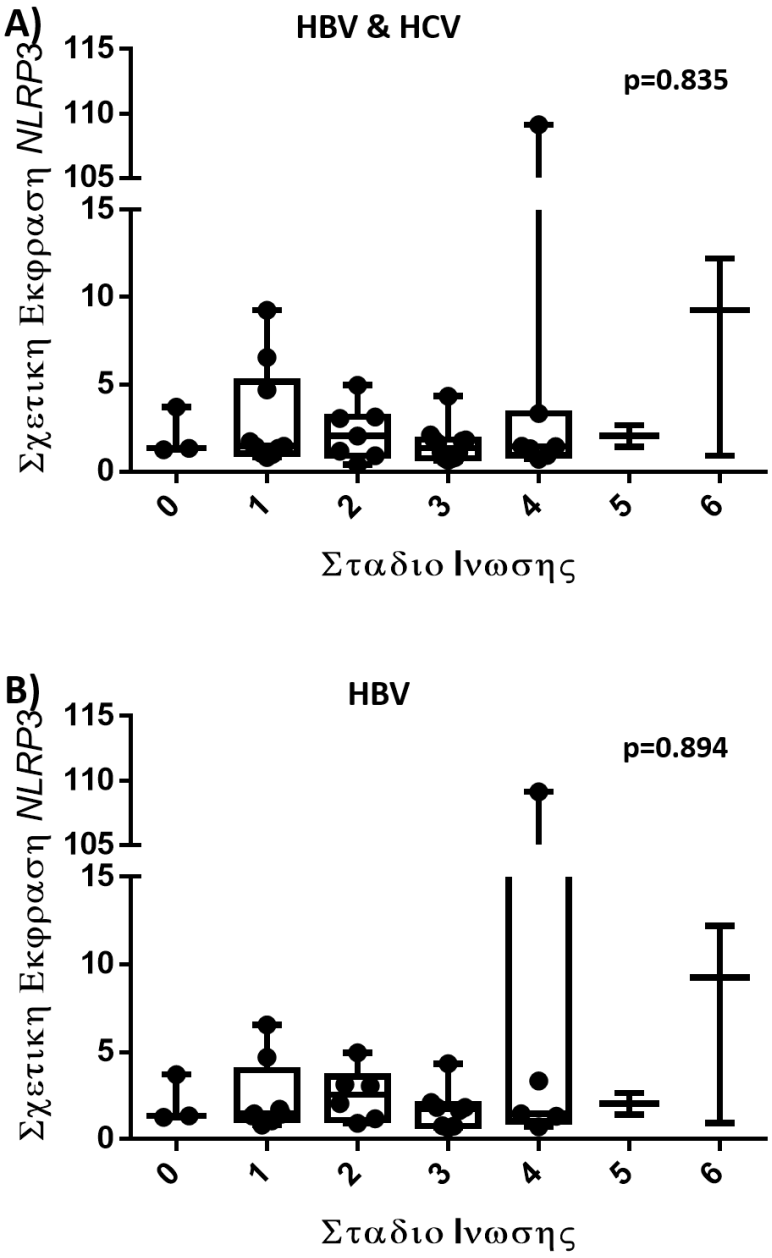
Εικόνα 12. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την έκφραση του γονιδίου *CASP1* στις ιογενείς ηπατίτιδες σε σύγκριση με το στάδιο της ίνωσης, όπως αυτό ορίστηκε από την παθολογανατομική εξέταση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως θηκογράμματα με όλα τα σημεία να φαίνονται. Οι αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας την στατιστική δοκιμασία Kruskal Wallis. **A)** Όλα τα δείγματα (HBV και HCV) σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.413). **B)** Μόνο τα δείγματα με HBV σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.133).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42



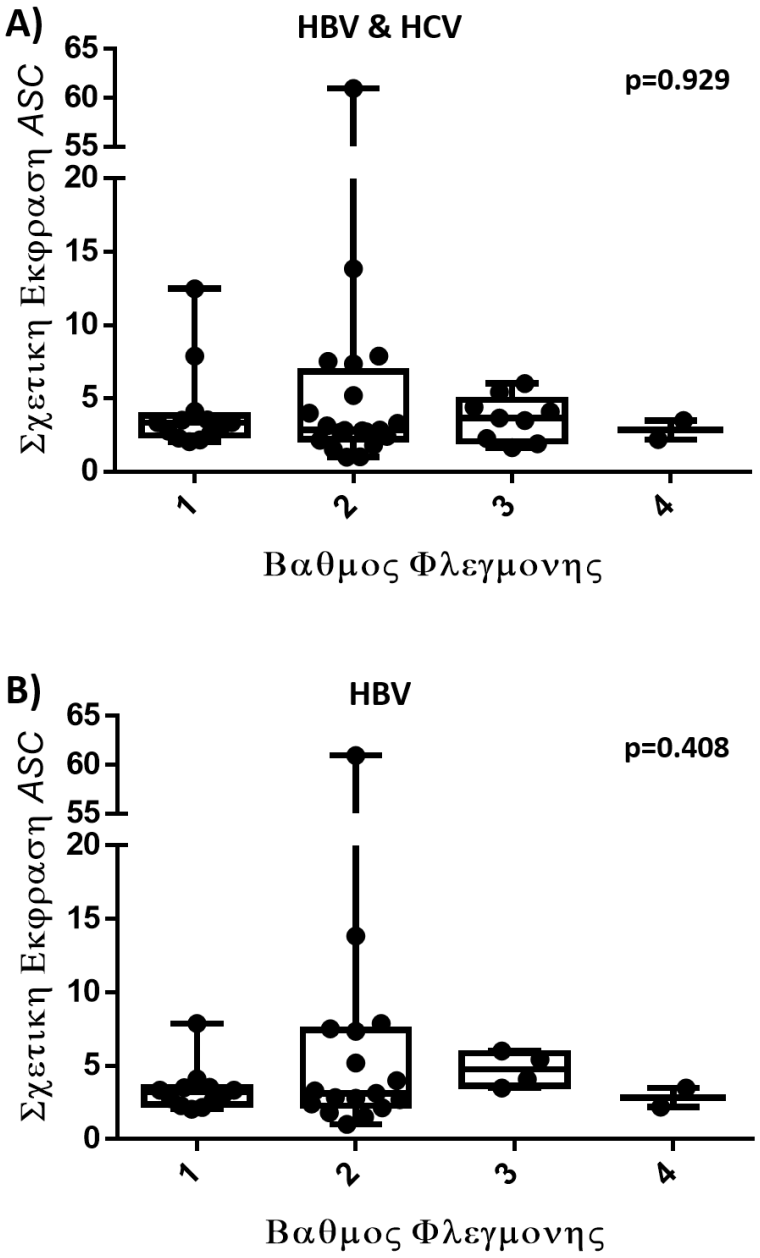
Εικόνα 13. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την έκφραση του γονιδίου *NLRP3* στις ιογενείς ηπατίτιδες σε σύγκριση με τον βαθμό φλεγμονής. Ο βαθμός φλεγμονής χωρίζεται σε 1=ελάχιστη, 2=ήπια, 3=μέτρια και 4=σοβαρή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως θηκογράμματα με όλα τα σημεία να φαίνονται. Οι αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας την στατιστική δοκιμασία Kruskal Wallis. **Α)** Όλα τα δείγματα (HBV και HCV) σε σχέση με το βαθμό φλεγμονής δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.266). **Β)** Μόνο τα δείγματα με HBV σε σχέση με το βαθμό φλεγμονής δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.844).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42



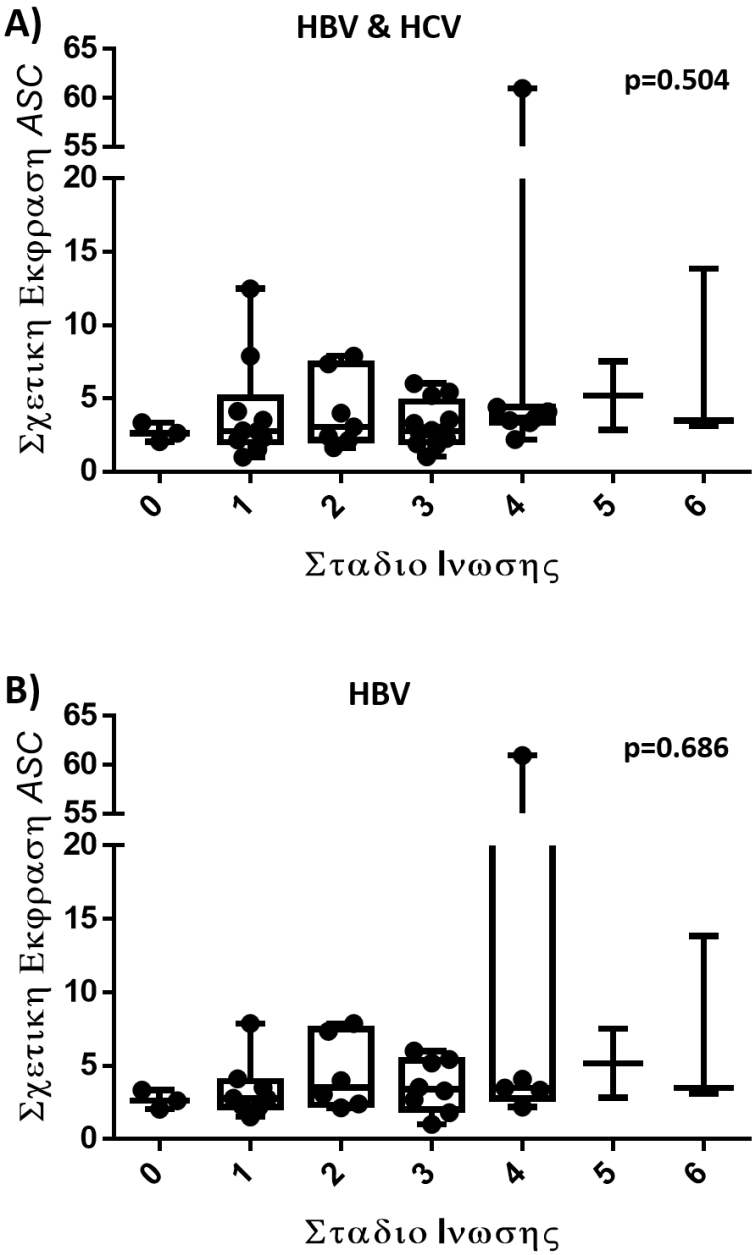
Εικόνα 14. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την έκφραση του γονιδίου *NLRP3* στις ιογενείς ηπατίτιδες σε σύγκριση με το στάδιο της ίνωσης, όπως αυτό ορίστηκε από την παθολογανατομική εξέταση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως θηκογράμματα με όλα τα σημεία να φαίνονται. Οι αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας την στατιστική δοκιμασία Kruskal Wallis. **A)** Όλα τα δείγματα (HBV και HCV) σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.835). **B)** Μόνο τα δείγματα με HBV σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.894).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42



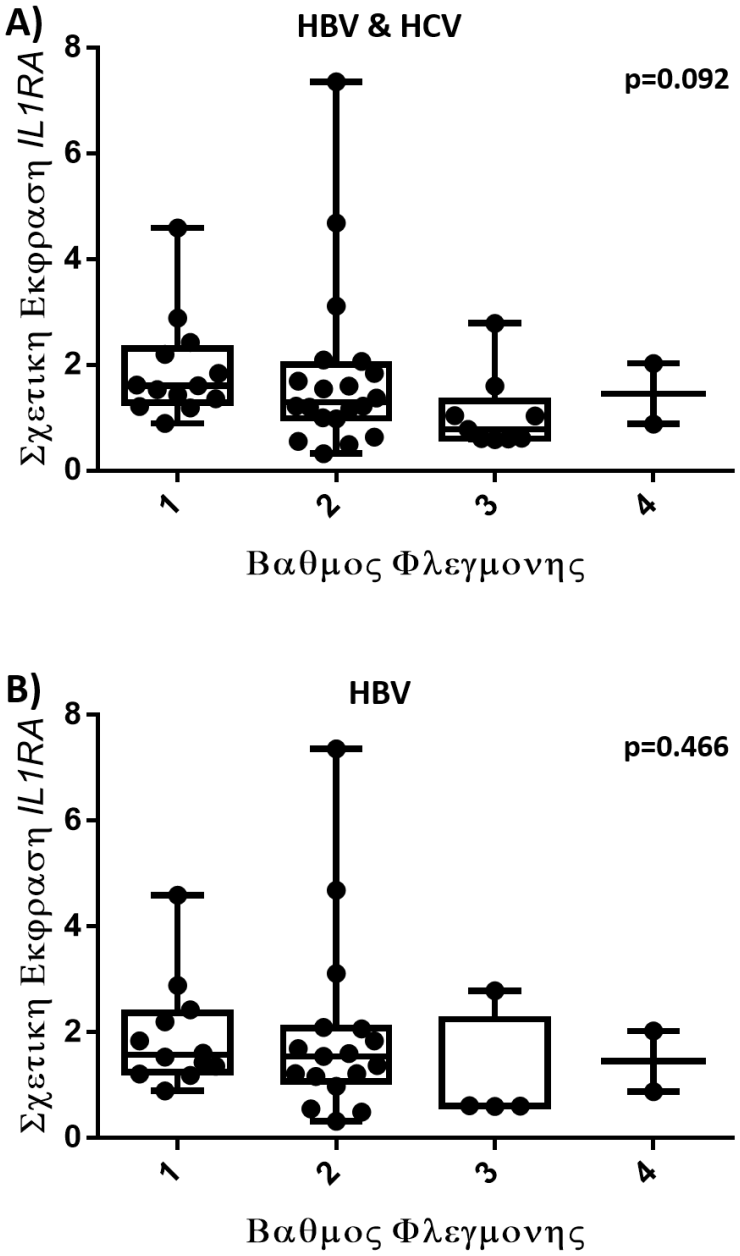
Εικόνα 15. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την έκφραση του γονιδίου *ASC* στις ιογενείς ηπατίτιδες σε σύγκριση με τον βαθμό φλεγμονής. Ο βαθμός φλεγμονής χωρίζεται σε 1=ελάχιστη, 2=ήπια, 3=μέτρια και 4=σοβαρή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως θηκογράμματα με όλα τα σημεία να φαίνονται. Οι αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας την στατιστική δοκιμασία Kruskal Wallis. **A)** Όλα τα δείγματα (HBV και HCV) σε σχέση με το βαθμό φλεγμονής δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.929). **B)** Μόνο τα δείγματα με HBV σε σχέση με το βαθμό φλεγμονής δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.408).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42



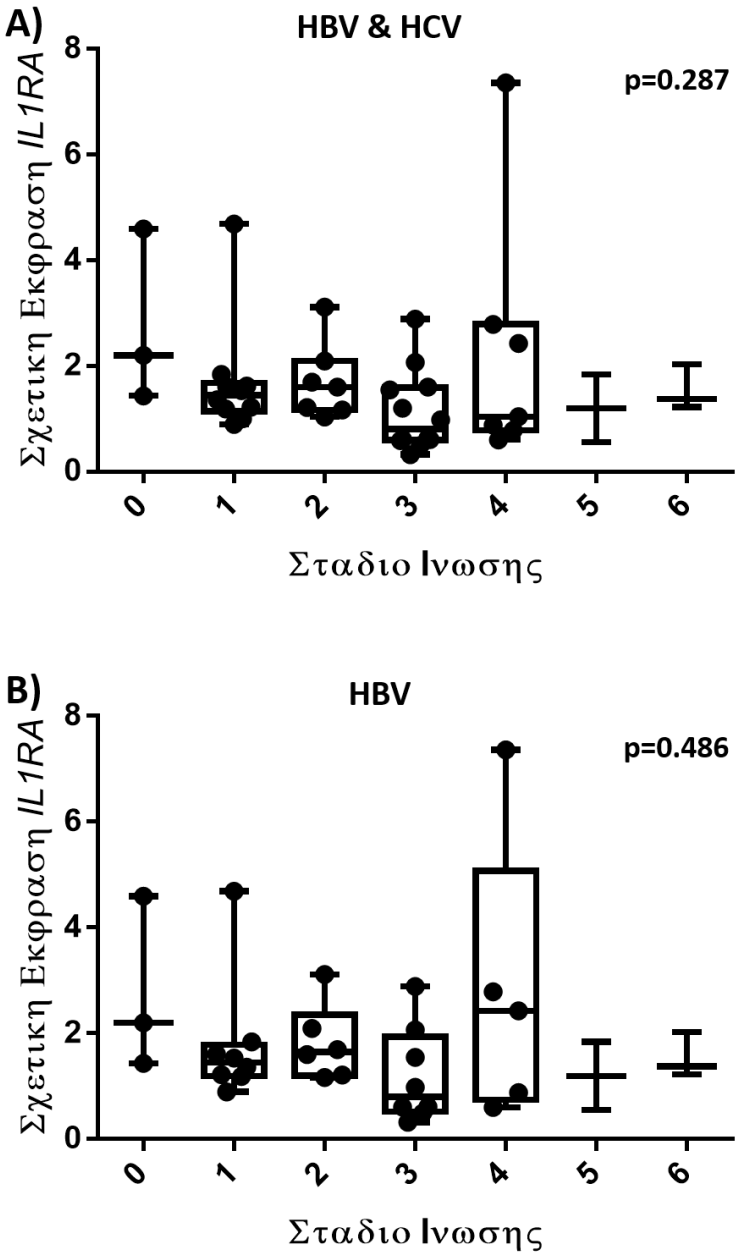
Εικόνα 16. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την έκφραση του γονιδίου *ASC* στις ιογενείς ηπατίτιδες σε σύγκριση με το στάδιο της ίνωσης, όπως αυτό ορίστηκε από την παθολογανατομική εξέταση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως θηκογράμματα με όλα τα σημεία να φαίνονται. Οι αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας την στατιστική δοκιμασία Kruskal Wallis. **A)** Όλα τα δείγματα (HBV και HCV) σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.504). **B)** Μόνο τα δείγματα με HBV σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.686).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42



Εικόνα 17. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την έκφραση του γονιδίου *IL1RA* στις ιογενείς ηπατίτιδες σε σύγκριση με τον βαθμό φλεγμονής. Ο βαθμός φλεγμονής χωρίζεται σε 1=ελάχιστη, 2=ήπια, 3=μέτρια και 4=σοβαρή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως θηκογράμματα με όλα τα σημεία να φαίνονται. Οι αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας την στατιστική δοκιμασία Kruskal Wallis. **A)** Όλα τα δείγματα (HBV και HCV) σε σχέση με το βαθμό φλεγμονής δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.092). **B)** Μόνο τα δείγματα με HBV σε σχέση με το βαθμό φλεγμονής δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.466).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42



Εικόνα 18. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την έκφραση του γονιδίου *IL1RA* στις ιογενείς ηπατίτιδες σε σύγκριση με το στάδιο της ίνωσης, όπως αυτό ορίστηκε από την παθολογανατομική εξέταση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως θηκογράμματα με όλα τα σημεία να φαίνονται. Οι αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας την στατιστική δοκιμασία Kruskal Wallis. **A)** Όλα τα δείγματα (HBV και HCV) σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.287). **B)** Μόνο τα δείγματα με HBV σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική σχέση (p=0.486).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

2.3Γονιδιακή έκφραση του NLRP3 φλεγμονοσώματος σε σχέση με τα ορολογικά χαρακτηριστικά

Τα δεδομένα της έκφρασης των γονιδίων *IL1B, CASP1, NLRP3, ASC* και *IL1RA* αναλύθηκαν σε σχέση με τα ορολογικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα χρησιμοποιώντας τη συσχέτιση κατά Spearman (Spearman's Rank Correlation) έγινε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων και των επιπέδων της ασπαραγινικής τρανσαμινάσης (aspartate transaminase, AST) και της τρανσαμινάσης αλανίνης (alanine transaminase, ALT). Αρχικά αναλύθηκαν όλα τα δείγματα ανεξάρτητα εάν είχαν χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή από HBV ή από HCV. Στην συνέχεια αναλύθηκαν μόνο τα δείγματα με χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή από HBV. Ο αριθμός των δειγμάτων με χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή από HCV ήταν πολύ μικρός για να αναλυθεί μεμονωμένα. Αυτό έγινε για να φανεί εάν βλέπουμε διαφορές που σχετίζονται γενικά με την χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή ανεξάρτητα από τον ιό που την προκαλεί ή οι διαφορές που βλέπουμε είναι ειδικές για τον ιό που προκαλεί την χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή.

Αναλύοντας τα δείγματα ως μία ενιαία ομάδα τα αποτελέσματα των συσχετίσεων της έκφρασης των γονιδίων με τα ορολογικά δεδομένα δεν έδωσαν στατιστικά σημαντικά συσχετίσεις κοινές και για την AST και την ALT, πράγμα μη αναμενόμενο (**Πίνακας 7**). Συγκεκριμένα η έκφραση του *IL1B* σε συσχέτιση με την AST έδωσε p=0.059 και σε συσχέτιση με την ALT έδωσε p=0.018. Πολύ ενδιαφέρον αποτέλεσμα αποτελεί το αποτέλεσμα της έκφρασης του *IL1RA* που συσχετίζεται αρνητικά με την AST (p=0.019) και την ALT (p=0.008). Αναλυτικά τα αποτελέσματα εμφανίζονται στον **Πίνακα 7**.

Αναλύοντας τα δείγματα που προέρχονταν μόνο από ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή από HBV παρατηρήθηκε μία σημαντικά διαφορετική εικόνα. Το μόνο γονίδιο που συσχετίζεται με την AST και την ALT είναι το *IL1B*. Συγκεκριμένα η έκφραση του *IL1B* σε συσχέτιση με την AST έδωσε p=0.006 και σε συσχέτιση με την ALT έδωσε p=0.002. Αναλυτικά τα αποτελέσματα εμφανίζονται στον **Πίνακα 8**.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Πίνακας 7. Συσχέτιση κατά Spearman's χρησιμοποιώντας όλους τους ασθενείς

		NLRP3	***IL1RA***	***CASP1***	***ASC***	**AST**	**ALT**
IL1B	Συντελεστής συσχέτισης	**0.540**	0.136	**0.346**	**0.473**	0.287	**0.355**
	Sig. (2-tailed)	**<0.001**	0.380	**0.021**	**0.001**	0.059	**0.018**
NLRP3	Συντελεστής συσχέτισης		**0.524**	0.207	**0.652**	-0.153	-0.57
	Sig. (2-tailed)		**<0.001**	0.178	**<0.001**	0.320	0.713
IL1RA	Συντελεστής συσχέτισης			-0.030	0.277	**-0.354**	**-0.393**
	Sig. (2-tailed)			0.846	0.069	**0.019**	**0.008**
CASP1	Συντελεστής συσχέτισης				**0.524**	0.077	0.126
	Sig. (2-tailed)				**<0.001**	0.619	0.416
ASC	Συντελεστής συσχέτισης					0.074	0.075
	Sig. (2-tailed)					0.633	0.628
AST	Συντελεστής συσχέτισης						**0.856**
	Sig. (2-tailed)						**<0.001**

Πίνακας 8. Συσχέτιση κατά Spearman's χρησιμοποιώντας μόνο ασθενείς με HBV

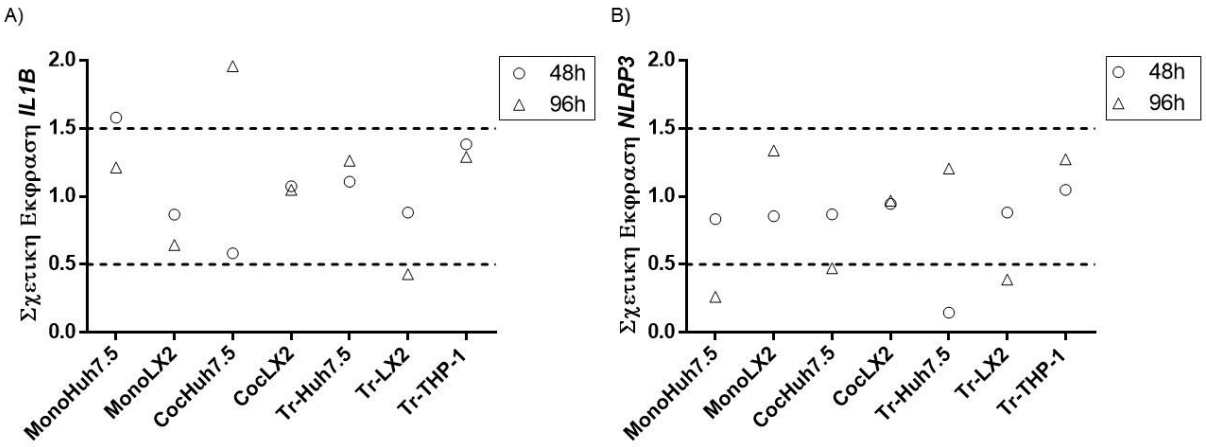
		NLRP3	***IL1RA***	***CASP1***	***ASC***	**AST**	**ALT**
IL1B	Συντελεστής συσχέτισης	**0.519**	0.091	0.287	**0.555**	**0.457**	**0.497**
	Sig. (2-tailed)	**0.001**	0.602	0.095	**0.001**	**0.006**	**0.002**
NLRP3	Συντελεστής συσχέτισης		**0.495**	0.137	**0.656**	0.009	0.066
	Sig. (2-tailed)		**0.002**	0.433	**<0.001**	0.959	0.705
IL1RA	Συντελεστής συσχέτισης			-0.180	0.235	-0.310	-0.275
	Sig. (2-tailed)			0.302	0.173	0.070	0.110
CASP1	Συντελεστής συσχέτισης				**0.491**	0.183	0.308
	Sig. (2-tailed)				**0.003**	0.294	0.072
ASC	Συντελεστής συσχέτισης					0.208	0.185
	Sig. (2-tailed)					0.229	0.287
AST	Συντελεστής συσχέτισης						**0.886**
	Sig. (2-tailed)						**<0.001**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

2.4Γονιδιακή έκφραση σε κυτταροκαλλιέργιες μετά από in vitro επιμόλυνση με HCV

Χρησιμοποιώντας RNA από Huh7.5, LX2 και THP-1 (τελικά διαφοροποιημένα σε μακροφάγα) κυτταρικές γραμμές μετρήθηκε η έκφραση των *IL1B* και *NLRP3*. Χρησιμοποιήθηκε υλικό από μονοκαλλιέργειες, διπλές συν-καλλιέργειες και τριπλές συν-καλλιέργειες σε διάφορα χρονικά σημεία και συγκρίθηκε με το δείγμα ελέγχου ψευδής μόλυνσης. Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 19**, παρατηρείται μια εμφανής αύξηση της έκφρασης του *IL1B* σε μονοκαλλιέργειες και διπλές συν-καλλιέργειες, σε αντίθεση με τις τριπλές συν-καλλιέργειες που δεν παρατηρείται αύξηση. Δεν παρουσιάστηκε αύξηση της έκφρασης του *NLRP3* σε καμία από τις συνθήκες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42



Εικόνα 19. Η έκφραση των γονιδίων *IL1B* και *NLRP3* σε κυτταροκαλλιέργιες μετά από *in vitro* επιμόλυνση με HCV. Τα διαγράμματα δείχνουν την μέση τιμή έκφρασης του *IL1B* **(A)** και του *NLRP3* **(B)** στις κυτταρικές γραμμές Huh7.5, LX2 και THP-1 σε μονοκαλλιέργειες, διπλές συν-καλλιέργειες και τριπλές συν-καλλιέργειες στις 48 και 96 ώρες μετά την μόλυνση με HCV. Παρατηρείται μια εμφανής αύξηση της έκφρασης του *IL1B* σε μονοκαλλιέργειες και διπλές συν-καλλιέργειες, σε αντίθεση με τις τριπλές συν-καλλιέργειες που δεν παρατηρείται αύξηση. Δεν παρουσιάστηκε αύξηση της έκφρασης του *NLRP3* σε καμία από τις συνθήκες. Συντομογραφίες του διαγράμματος: MonoHuh7.5, μονοκαλλιέργεια Huh7.5; MonoLX2, μονοκαλλιέργεια LX2; CocHuh7.5, διπλή συν-καλλιέργεια Huh7.5 και LX2 όπου τα Huh7.5 έχουν μολυνθεί με HCV; CocLX2, διπλή συν-καλλιέργεια Huh7.5 και LX2 όπου τα LX2 έχουν μολυνθεί με HCV; Tr-Huh7.5, τριπλή συν-καλλιέργεια Huh7.5, LX2 και THP-1 όπου τα Huh7.5 έχουν μολυνθεί με HCV; Tr-LX2, τριπλή συν-καλλιέργεια Huh7.5, LX2 και THP-1 όπου τα LX2 έχουν μολυνθεί με h HCV; Tr- THP-1, τριπλή συν-καλλιέργεια Huh7.5, LX2 και THP-1 όπου τα THP-1 έχουν μολυνθεί με HCV. Η αναμενόμενη φυσιολογική διακύμανση της σχετικής έκφρασης mRNA των υπό μελέτη γονιδίων σε *in vitro* πειράματα θεωρείται να είναι μεταξύ 0.5 και 1.5.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έδειξαν ότι υπάρχει ενιαία ρύθμιση της ηπατικής φλεγμονής ανεξάρτητα από την αιτία της φλεγμονής, αλλά εξαρτώμενη από την ένταση της φλεγμονής (119). Τα προηγουμένως δημοσιευθέντα δεδομένα του εργαστηρίου υποδεικνύουν ότι στο μοντέλο της χρόνιας λοίμωξης με HBV το ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον στο ήπαρ ρυθμίζεται προς τα κάτω στην διατηρούμενη κατάσταση μακροχρόνιας ύφεσης κατά τη θεραπεία και συσχετίζεται με την ένταση της φλεγμονής του ήπατος, αλλά όχι με την αποκατάσταση των Τ-κυττάρων του ήπατος (118). Η έκφραση των *FOXP3, IL10, TGFB1, PD1, PDL1, FASL* και *CD8* καταστάλθηκε κάτω από την κατάσταση της μακροχρόνιας ύφεσης και συσχετίστηκε θετικά με την ένταση της φλεγμονής του ήπατος (118).

Στο πλαίσιο αυτό αποφασίστηκε να μελετηθεί η φλεγμονώδης κυτταροκίνη IL-1β στην χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή. Επειδή η IL-1β παράγεται ως ανενεργό πρόδρομο μόριο, μελετήθηκε επίσης το καλύτερα μελετημένο σύστημα ενεργοποίησης της IL-1β, το NLRP3-φλεγμονόσωμα. Μελετήθηκαν ασθενείς σε τρεις ομάδες: ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β στη διάγνωση πριν λάβουν οποιαδήποτε θεραπεία (CHB), ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β σε παρατεταμένη (πάνω από 240 εβδομάδες) ύφεση μετά από θεραπεία με entecavir (CHB-rem), ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C στη διάγνωση πριν λάβουν οποιαδήποτε θεραπεία (CHC). Σκοπός ήταν να διερευνηθεί η υπόθεση της ενιαίας ρύθμισης της φλεγμονής ανεξάρτητα από τον αιτιολογικό παράγοντα, συγκρίνοντας τους ασθενείς με HBV και HCV λοίμωξη. Ταυτόχρονα διερευνάται και η επίδραση της θεραπείας και της παρατεταμένης ύφεσης στη συμπεριφορά της IL-1β και του NLRP3-φλεγμονοσώματος.

Συνοπτικά, σε αυτή διατριβή δείχτηκε πως οι ασθενείς με ενεργή χρόνια φλεγμονή από HBV (ομάδα CHB) έχουν στατιστικά σημαντικά αυξημένη έκφραση των γονιδίων *IL1B, CASP1* και *NLRP3* σε σχέση με τους ασθενείς σε ύφεση (CHB-rem) και τους ασθενείς με ενεργή χρόνια φλεγμονή από HCV (CHC). Επιπρόσθετα, δείχτηκε πως η έκφραση του γονιδίου *IL1B* στους ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη (ομάδες CHB και CHB-rem) σχετίζεται σημαντικά και θετικά με τον βαθμό της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

φλεγμονής αλλά όχι με τον στάδιο της ίνωσης. Επιπλέον, βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου *IL1B* στους ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη (ομάδες CHB και CHB-rem)με τα επίπεδα AST και ALT στον ορό των ασθενών. Τέλος, το *in vitro* μοντέλο οξείας φλεγμονής με HCV έδειξε μη ενεργοποίηση των γονιδίων *IL1B* και *NLRP3* σε συνθήκες τριπλής συν-καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα παρέχουν νέα ενδιαφέροντα δεδομένα και δείχνουν σαφώς τη σημασία της ενεργοποίησης της IL-1β και του φλεγμονοσώματος στον ηπατικό ιστό, σε κλινικά δείγματα ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα HBV, αλλά όχι σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα HCV.

Τα αποτελέσματα έκφρασης των γονιδίων δεν υποστηρίζουν την προηγούμενη γενική υπόθεση του εργαστηρίου πως υπάρχει ενιαία ρύθμιση της φλεγμονής ανεξάρτητα από την αιτία. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση των γονιδίων *IL1B, CASP1* και *NLRP3* ανάμεσα στις ομάδες CHB και CHC. Αυτή η διαφορά υποδηλώνει πως υπάρχει διαφοροποίηση της φλεγμονής ανάλογα με το αίτιό της. Επιπρόσθετα, αυτή η παρατήρηση ενισχύεται από την στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου *IL1B* με τα επίπεδα AST και ALT στον ορό μόνο στους ασθενείς με HBV, ανεξάρτητα από το αν είχαν ενεργή νόσο ή βρισκόντουσαν σε ύφεση. Η υπόθεση αυτή χρειάζεται επανεξέταση. Μια πιθανή αναδιατύπωση θα μπορούσε να είναι ότι οι αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές διεργασίες βρίσκονται υπό ενιαίο έλεγχο και είναι ανεξάρτητες του αιτίου, ενώ κάποιες φλεγμονώδεις διεργασίες παρουσιάζουν εξάρτηση από το αίτιο της φλεγμονής. Η έλλειψη παραγωγής IL-1β σε ασθενείς με HCV μπορεί να εξηγήσει έναν από τους μηχανισμούς που συμβάλλουν στη μετάβαση σε χρονιότητα. Το ποσοστό των ενήλικων ασθενών που έχουν μολυνθεί από HCV που αναπτύσσει χρόνια νόσο φτάνει το 50-80% σε σύγκριση με το 5-10% των ασθενών που έχουν μολυνθεί με HBV (130). Η ανικανότητα να διεγείρεται η IL-1β μέσω φλεγμονωδών ερεθισμάτων μπορεί να είναι αιτιολογικός παράγοντας για αυτή τη σημαντική διαφορά, αν και θα πρέπει να καθοριστεί εάν πρόκειται για ενεργή καταστολή της γονιδιακής έκφρασης ή αποτελεσματική κάλυψη της βιολογικής δράσης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Τα αποτελέσματα της έκφρασης του γονιδίου *IL1B* αυτής διατριβής έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενες μετρήσεις και συγκρίσεις αυτού του γονιδίου σε μελέτες του εργαστηρίου (118, 119). Η διαφορά αυτή όμως εξηγείται από διάφορους παράγοντες. Στις δύο προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές του εμπορίου που δεν γνωρίζουμε που προσδένονται αφού δεν γνωρίζουμε την ακριβή αλληλουχία τους και άρα δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για την ακρίβειά τους (118, 119). Στην πρώτη μελέτη συγκρίνονται οι ομάδες που χρησιμοποιούνται στην διατριβή αυτή με ασθενείς οι οποίοι έκαναν βιοψία ήπατος σε έδαφος τρανσαμινασαιμίας, στους οποίους δεν ταυτοποιήθηκε συγκεκριμένη νόσος, είχαν καθαρή βιοψία και θεωρήθηκαν φυσιολογικοί (119). Παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του γονιδίου *IL1B* σε ασθενείς με ιογενή ηπατίτιδα σε σχέση με τους ασθενείς με τρανσαμινασαιμία (119). Οι ασθενείς με τρανσαμινασαιμία δεν είναι κατ' ανάγκην φυσιολογικοί. Το γεγονός πως δεν ταυτοποιήθηκε νόσημα δεν σημαίνει πως δεν υπήρχαν διεργασίες στον ηπατικό ιστό που αύξησαν την έκφραση του γονιδίου *IL1B* και είχαν ως συνέπεια την παρατηρούμενη τρανσαμινασαιμία. Επιπρόσθετα, δεν έγινε στατιστική σύγκριση μεταξύ όλων των επιμέρους ομάδων, με Kruskal Wallis, αυξάνοντας την πιθανότητα συστηματικού στατιστικού σφάλματος (119).

Τα αποτελέσματα της διατριβής για τους ασθενείς με χρόνια φλεγμονή από τον HBV και για τους ασθενείς με χρόνια φλεγμονή από τον HCV είναι εξαιρετικά ενδιαφέροντα και σε σχέση με την διεθνή βιβλιογραφία. Η στατιστικά σημαντικά αυξημένη έκφραση των γονιδίων *IL1B, CASP1* και *NLRP3* σε ασθενείς με ενεργή χρόνια φλεγμονή από HBV (ομάδα CHB) υποδεικνύει, για πρώτη φορά, ότι ενεργοποιείται η σηματοδότηση οδού NLRP3 στο ήπαρ, σε ασθενείς με ενεργή χρόνια ηπατίτιδα HBV χωρίς καμία θεραπευτική παρέμβαση.

Είναι γνωστό ότι το κύριο αντιγόνο του HBV προκαλεί έκκριση IL-18, από ανθρώπινα PBMCs, εξαρτώμενη από την CASP-1 και ότι τα επίπεδα IL-18 είναι αυξημένα σε PBMCs από HBeAg αρνητικούς ασθενείς, γεγονός που, υποδηλώνει την πιθανότητα ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος σε χρόνια μόλυνση με HBV (35). Τα αποτελέσματα μας ενισχύουν αυτήν την υπόθεση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Τα αποτελέσματα μας στις βιοψίες έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα άλλων μελετών. Τα διαφορετικά αυτά ευρήματα από προηγούμενες μελέτες μπορεί να εξηγηθούν από τις κλινικές ομάδες που χρησιμοποιούνται για σύγκριση στα πειράματα μας. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι συμπεριελήφθησαν μόνο νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς που δεν είχαν σοβαρή ηπατική νόσο (κίρρωση).

Οι Bortolami et al (123) συνέκριναν τα επίπεδα της IL-1β σε ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (HBV και HCV) με φυσιολογικό περινεοπλασματικό (peri-tumoral) ιστό και βιοψία ήπατος από ασθενείς που έκαναν χολεκυστεκτομή (123). Η ενοποίηση των ασθενών με ιογενή ηπατίτιδα ανεξάρτητα από τον ιό που την προκαλεί όπως έδειξαν τα αποτελέσματα μας αλλά και όπως είναι λογικό είναι προβληματική. Επιπλέον, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα ότι ο περινεοπλασματικός ιστός και ο ηπατικός ιστός ασθενών που χρειάζονται χολεκυστεκτομή έχουν αυξημένη έκφραση *IL1B* σε σύγκριση με τον ηπατικό ιστό των ασθενών σε ύφεση μετά από μακροχρόνια αντιική θεραπεία. Ενώ και η τεχνική προσέγγιση ποσοτικοποίησης της έκφρασης που επέλεξαν έχει μεγάλα ποσοστά σφάλματος και δεν χρησιμοποιείται πλέον (123).

Οι Negash et al ανέλυσαν ασθενείς με HCV (53), όπου η έκφραση γονιδίων ομάδας 3, συμπεριλαμβανομένων κυρίως της IL-1β και της IL-6, αυξήθηκαν μόνο σε ασθενείς με σοβαρή ηπατική νόσο και κίρρωση (53). Είναι πιθανό ότι σε ένα τόσο σοβαρό και προχωρημένο στάδιο της ασθένειας, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στην ανύψωση των επιπέδων της IL-1β και του NLRP3-φλεγμονοσώματος σε ασθενείς με HCV και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να δοκιμαστεί αυτή η υπόθεση.

Η μελέτη της φλεγμονής στον ανθρώπινο ιστό έχει πολλά πλεονεκτήματα, αλλά έχει και μειονεκτήματα. Η αδυναμία χρησιμοποίησης πραγματικά υγιούς ιστού για ηθικούς λόγους δημιουργεί ενδιαφέροντα πειραματικά προβλήματα. Το κυρίαρχο είναι οι ομάδες που χρησιμοποιούνται και η επιλογή καλών ομάδων μαρτύρων. Βάση των αποτελεσμάτων μας και της διεθνούς βιβλιογραφίας, η ομάδα των ασθενών με HBV λοίμωξη σε μακροχρόνια ύφεση αποτελεί μια καλή ομάδα μαρτύρων. Η βιοψίες σε αυτούς τους ασθενείς είναι στα πλαίσια της παρακολούθησής τους.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Τα αποτελέσματα από τις βιοψίες ασθενών υποστηρίχθηκαν περαιτέρω με in vitro πειράματα. Συγκεκριμένα, στο *in vitro* μοντέλο με τους πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους στην καλλιέργεια, που μοιάζει περισσότερο με ένα φυσιολογικό ηπατικό περιβάλλον (127-129, 131), δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση των γονιδίων *IL1B* και *NLRP3* σε τριπλή καλλιέργεια (Huh7.5, LX2 και THP-1 κύτταρα). Να σημειωθεί πως δεν υπάρχουν επαναλήψεις στα πειράματά μας κάτι που θα πρέπει να γίνει, ώστε να είναι δυνατή η στατιστική σύγκριση.

Αντίθετα, στα αποτελέσματά των Burdette et al, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της *IL1B* σε μολυσμένα με HCV μονοκαλλιεργημένα Huh7.5 κύτταρα (52). Επιπρόσθετα, οι Negash et al ανέφεραν παρόμοια ευρήματα χρησιμοποιώντας το μοντέλο καλλιέργειας μακροφάγων THP-1, στο οποίο διαπίστωσαν ότι ο HCV οδηγεί σε ταχεία αλλά παροδική ενεργοποίηση CASP-1 για να διεγείρει την έκκριση της IL-1β.

Ο HCV μπορεί να εισέλθει σε μακροφάγα μέσω φαγοκυτταρικής πρόσληψης που δεν προκαλείται από CD81 και είναι ανεξάρτητη από παραγωγική μόλυνση και έκθεση σε HCV RNA που απελευθερώνεται σε εξωσώματα (53), ενώ η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος στα μονοκύτταρα γίνεται μέσω TLR7/8 διαμεσολαβούμενης ανίχνευσης RNA (132). Αν και δεν μετρήσαμε την έκφραση IL-18, τα διακριτά ευρήματα μας μπορούν να εξηγηθούν από τις διαφορικές λειτουργίες των μονοκυττάρων και των μακροφάγων, αντανακλώντας τους ξεχωριστούς ρόλους τους στη φλεγμονή και την υπεράσπιση του ξενιστή (133). Σε αμφότερους τους πληθυσμούς κυττάρων η σύνδεση TLR επάγει τις πρόδρομες μορφές της IL-1β και της IL-18, αλλά οι απαιτήσεις για μετα-μεταφραστική επεξεργασία και απελευθέρωση αυτών των κυτταροκίνων είναι διαφορετικές. Συγκεκριμένα, τα μονοκύτταρα αλλά όχι τα μακροφάγα έχουν αυξημένη ιδιοσυστατική παραγωγή CASP-1 και έτσι μπορούν να διασπάσουν τις κυτταροκίνες από την πρόδρομη μορφή τους. Τα μονοκύτταρα μπορούν να απελευθερώνουν ενεργή IL-1 β και IL-18 μετά από μία μοναδική διέγερση TLR ενώ τα μακροφάγα χρειάζονται επιπρόσθετα ερεθίσματα για να μετατρέψουν την αδρανή pro-CASP-1 σε ενεργή CASP-1 και να επεξεργαστούν και να εκκρίνουν τις κυτταροκίνες. Ωστόσο, αυτά τα ευρήματα δεν λαμβάνουν υπόψη το σύνθετο μικροπεριβάλλον του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

ήπατος, το οποίο έχει ισχυρή τάση για την προώθηση της ανοχής (134). Ίσως είναι αναγκαία η αξιοποίηση ενός πιο περίπλοκου μοντέλου που λαμβάνει υπόψη τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου μεταξύ των μεγάλων παικτών του μικροπεριβάλλοντος του ήπατος, όπως το μοντέλο τριπλής καλλιέργειας που χρησιμοποιήσαμε. Τα αποτελέσματα του οποίου μας οδηγούν να υποθέσουμε ότι η απουσία φλεγμονώδους ενεργοποίησης στην οξεία φάση της HCV μόλυνσης μπορεί να είναι ο λόγος που το 50-80% των ασθενών μεταβαίνει σε χρονιότητα. Προφανώς, είναι αναγκαίες περαιτέρω μελέτες για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση.

Ένα άλλο εξίσου σημαντικό αποτέλεσμα είναι ότι τα επίπεδα έκφρασης *IL1B* συσχετίζονται σημαντικά με τον βαθμό φλεγμονής και με βιοχημικούς δείκτες ηπατικής λειτουργίας σε ασθενείς με χρόνια μόλυνση από τον ιό HBV (ομάδες CHB και CHB-rem). Αυτή η ισχυρή συσχέτιση υποδηλώνει ότι η IL-1β είναι πιθανόν η κινητήρια δύναμη της φλεγμονής σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη με HBV. Αυτή η σύνδεση δεν παρατηρείται σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη με HCV. Είναι ενδιαφέρον ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης *IL1B* και του βαθμού ηπατικής ίνωσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες και οδοί που διέπουν αυτήν την πλευρά της νόσου, πιθανώς με τρόπο ανεξάρτητο των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *IL1B*.

Ο κύριος περιορισμός της μελέτης αυτής είναι η πειραματική αδυναμία να εξαχθεί η κυτταροειδική φλεγμονώδης έκφραση στις βιοψίες ήπατος των ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατική φλεγμονή. Η κατανόηση της κυτταροειδικής ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος έχει επιπτώσεις για μελλοντικές πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις (35). Από ζωικά μοντέλα υποστηρίζεται ένας σημαντικός ρόλος για τα κύτταρα Kupffer, από το γεγονός ότι αυτά τα κύτταρα παρουσίασαν τα υψηλότερα επίπεδα *IL1B* mRNA μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών τύπων του ήπατος και η μείωση των κυττάρων Kupffer προκάλεσε σημαντικά μειωμένα επίπεδα mRNA *IL1B* στον ηπατικό ιστό και στον ορό. Η επιλεκτική ανεπάρκεια της IL-1β ή της IL-1a στα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος, αλλά όχι στα κύτταρα που προέρχονται από μυελό των οστών, προστάτευσε διαγονιδιακά ζώα από την προκαλούμενη από τη διατροφή στεατοηπατίτιδα και την ίνωση (135, 136). Αυτές οι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η παραγωγή φλεγμονοσώματος και IL-1β από διαφορετικούς τύπους κυττάρων συμμετέχει σε διαφορετικά στάδια και διεργασίες των πειραματικών μοντέλων νόσου του ήπατος. Ωστόσο, η μετάφραση των ευρημάτων από ζωικά μοντέλα στην ανθρώπινη ηπατική νόσο, για παράδειγμα στην NASH, έχει σημαντικούς περιορισμούς (135, 136).

Τα αποτελέσματα έκφρασης του *NLRP3* και *ASC* είναι εξαιρετικά ενδιαφέροντα. Θέτουν το ερώτημα αν το NLRP3-φλεγμονόσωμα είναι το μόνο φλεγμονόσωμα που συμβάλλει στην παραγωγή της IL-1β στην χρόνια ιογενή ηπατίτιδα. Η πιθανότητα στον ανθρώπινο ιστό η φλεγμονή να επάγεται από συγχορδία σημάτων και κατ' επέκταση να υπάρχει συμμετοχή άλλων φλεγμονοσωμάτων είναι μεγάλη. Ήδη προς αυτήν την κατεύθυνση, υπάρχουν δημοσιευμένες αναφορές που υποδηλώνουν τη συμμετοχή άλλων φλεγμονοσωμάτων, όπως το AIM2-φλεγμονόσωμα (137). Λαμβάνοντας υπόψη τις οριακές τιμές p κατά τη σύγκριση των ασθενών με χρόνια φλεγμονή από HBV στη διάγνωση και την ύφεση και τις δημοσιευμένες αναφορές, υπάρχει πιθανότητα ότι υπάρχουν περισσότερα από ένα φλεγμονοσώματα που συμβάλλουν στην παραγωγή IL-1β και αυτό χρειάζεται περαιτέρω μελέτη. Έτσι, τα φλεγμονοσώματα AIM2, NLRP1, NLRC4 και NLRP6 είναι καλοί υποψήφιοι για περαιτέρω διερεύνηση.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αύξηση της έκφρασης των *IL1B, CASP1* και *NLRP3* στο ήπαρ σε ασθενείς με ενεργή χρόνια λοίμωξη με HBV σε σύγκριση με τους ασθενείς σε ύφεση υπό συνεχή αντι-ιική αγωγή και τους ασθενείς με ενεργή χρόνια HCV λοίμωξη. Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι η IL-1β είναι μία από τις κινητήριες δυνάμεις της φλεγμονής σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη από τον HBV, αλλά όχι σε ασθενείς με HCV λοίμωξη. Η καταστολή του με μόρια που λειτουργούν ως ισχυροί και ειδικοί αναστολείς του NLRP3 ή άλλων φλεγμονοσωμάτων, μπορεί να αποτελεί υποψήφιο στόχο για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις (138-141). Απαιτείται περισσότερη βασική έρευνα για τον προσδιορισμό των μηχανισμών και της αιτίας της φλεγμονής σε ασθενείς με χρόνια μόλυνση με HCV.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Τα αποτελέσματα είναι εξαιρετικά σημαντικά και δίνουν μια ενδιαφέρουσα μελλοντική προοπτική για την αντιμετώπιση της χρόνιας ηπατίτιδας από τον HBV. Δείχνουν πως στο στάδιο της χρόνιας φλεγμονής από HBV υπάρχει ένας διακριτός μηχανισμός που επάγει την φλεγμονή στον ιστό. Η IL-1β και το φλεγμονόσωμα ή τα φλεγμονοσώματα που επάγουν την φλεγμονή στη χρόνια HBV ηπατίτιδα αποτελούν ενδιαφέροντες θεραπευτικούς στόχους.

Στο έδαφος των νέων θεραπειών ενάντια στην IL-1β εγείρει το ερώτημα εάν η IL-1β μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση της χρόνιας HBV ηπατίτιδας. Η εύρεση της χρυσής τομής, στην οποία ο οργανισμός έχει αρκετή φλεγμονή για να απομακρύνει τον ιό, αλλά όχι τόσο μεγάλη φλεγμονή ώστε να καταστραφεί ο υγιής ιστός, είναι ο στόχος.

Ο συνδυασμός των νέων θεραπειών ενάντια στην IL-1β, με τους ειδικούς αναστολείς των υποδοχέων του φλεγμονοσώματος και τις ήδη υπάρχουσες αντι-ιικές θεραπείες φαίνεται να είναι η πιο λογική οδός. Η φλεγμονή θα αντιμετωπίζεται σφαιρικά. Επιπρόσθετα αυτό πιθανότατα θα επιτρέπει την χρήση μικρότερων θεραπευτικών δόσεων μειώνοντας τις ανεπιθύμητες παρενέργειες των φαρμάκων.

Είναι εμφανές πως με αυτά τα αποτελέσματα ανοίγει ένα μεγάλο πεδίο βασικής και κλινικής έρευνας. Η εύρεση νέων θεραπειών για μια τόσο μαζική ασθένεια όπως η χρόνια λοίμωξη με HBV μόνο θετικό γεγονός μπορεί να είναι για τους ασθενείς αρκεί οι ασθενείς να έχουν πρόσβαση σε αυτές τις θεραπείες. Η επίπτωση της χρόνιας λοίμωξης με HBV είναι περίπου 260 εκατομμύρια άνθρωποι στον κόσμο. Σε ετήσια βάση περίπου 800 χιλιάδες άνθρωποι πεθαίνουν από επιπλοκές από την λοίμωξη με HBV (142). Η πλειοψηφία όμως των ασθενών βρίσκονται σε αναπτυσσόμενες χώρες. Η εύρεση νέων προσιτών θεραπειών για όλους αποτελεί κοινωνική υποχρέωση των επιστημόνων, για να έχουν όλοι πρόσβαση στο θεμελιώδες ανθρώπινο δικαίωμα της υγείας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. Immunol Rev. 2000;174:21-34.
2. Knolle PA, Thimme R. Hepatic immune regulation and its involvement in viral hepatitis infection. Gastroenterology. 2014;146(5):1193-207.
3. Tsutsui H, Nishiguchi S. Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice. Int J Mol Sci. 2014;15(5):7711-30.
4. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins SL. Robbins basic pathology. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2013. xii, 910 p. p.
5. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2011;25(2):195-206.
6. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. Annual review of pathology. 2011;6:425-56.
7. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. Cell. 2010;140(6):821-32.
8. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. Int Rev Immunol. 2011;30(1):16-34.
9. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. Nature. 2006;440(7081):228-32.
10. Rock KL, Kataoka H, Lai JJ. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities. Nat Rev Rheumatol. 2013;9(1):13-23.
11. Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. Hepatology. 2011;54(1):133-44.
12. Matsuzaka T, Atsumi A, Matsumori R, Nie T, Shinozaki H, Suzuki-Kemuriyama N, et al. Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology. 2012;56(6):2199-208.
13. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. Nature immunology. 2011;12(5):408-15.
14. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. Nature medicine. 2011;17(2):179-88.
15. Mandrekar P, Ambade A, Lim A, Szabo G, Catalano D. An essential role for monocyte chemoattractant protein-1 in alcoholic liver injury: regulation of proinflammatory cytokines and hepatic steatosis in mice. Hepatology. 2011;54(6):2185-97.
16. Petrasek J, Bala S, Csak T, Lippai D, Kodys K, Menashy V, et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. The Journal of clinical investigation. 2012;122(10):3476-89.
17. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, et al. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. Gastroenterology. 2010;139(1):323-34 e7.
18. Eitel J, Suttorp N, Opitz B. Innate immune recognition and inflammasome activation in listeria monocytogenes infection. Front Microbiol. 2010;1:149.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

19. Anand PK, Malireddi RK, Kanneganti TD. Role of the nlrp3 inflammasome in microbial infection. Front Microbiol. 2011;2:12.
20. Grenier JM, Wang L, Manji GA, Huang WJ, Al-Garawi A, Kelly R, et al. Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1. FEBS Lett. 2002;530(1-3):73-8.
21. Anand PK, Malireddi RK, Lukens JR, Vogel P, Bertin J, Lamkanfi M, et al. NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens. Nature. 2012;488(7411):389-93.
22. Chen GY, Liu M, Wang F, Bertin J, Nunez G. A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. J Immunol. 2011;186(12):7187-94.
23. Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. Cell. 2011;145(5):745-57.
24. Normand S, Delanoye-Crespin A, Bressenot A, Huot L, Grandjean T, Peyrin-Biroulet L, et al. Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(23):9601-6.
25. Chen GY. Role of Nlrp6 and Nlrp12 in the maintenance of intestinal homeostasis. Eur J Immunol. 2014;44(2):321-7.
26. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. Nature. 2012;482(7384):179-85.
27. Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, et al. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. Nature. 2008;452(7183):103-7.
28. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. Nature. 2009;458(7237):514-8.
29. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. Nature immunology. 2011;12(3):222-30.
30. Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, et al. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. Nature immunology. 2010;11(5):395-402.
31. Poeck H, Bscheider M, Gross O, Finger K, Roth S, Rebsamen M, et al. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. Nature immunology. 2010;11(1):63-9.
32. Wu DL, Xu GH, Lu SM, Ma BL, Miao NZ, Liu XB, et al. Correlation of AIM2 expression in peripheral blood mononuclear cells from humans with acute and chronic hepatitis B. Hum Immunol. 2013;74(5):514-21.
33. Kubes P, Mehal WZ. Sterile inflammation in the liver. Gastroenterology. 2012;143(5):1158-72.
34. Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? Science. 2010;327(5963):296-300.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

35. Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases. Journal of hepatology. 2012;57(3):642-54.
36. Csak T, Pillai A, Ganz M, Lippai D, Petrasek J, Park JK, et al. Both bone marrow-derived and non-bone marrow-derived cells contribute to AIM2 and NLRP3 inflammasome activation in a MyD88-dependent manner in dietary steatohepatitis. Liver Int. 2014;34(9):1402-13.
37. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. Immunol Rev. 2011;243(1):136-51.
38. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. J Immunol. 2009;183(2):787-91.
39. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. Nature. 2006;440(7081):237-41.
40. Iyer SS, Pulskens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(48):20388-93.
41. Latz E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. Curr Opin Immunol. 2010;22(1):28-33.
42. Ioannou GN, Van Rooyen DM, Savard C, Haigh WG, Yeh MM, Teoh NC, et al. Cholesterol-lowering drugs cause dissolution of cholesterol crystals and disperse Kupffer cell crown-like structures during resolution of NASH. J Lipid Res. 2015;56(2):277-85.
43. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. Nature immunology. 2008;9(8):857-65.
44. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. Nature. 2011;469(7329):221-5.
45. Kim HY, Kim SJ, Lee SM. Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in Kupffer cells in hepatic ischemia/reperfusion. FEBS J. 2015;282(2):259-70.
46. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, et al. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. J Histochem Cytochem. 2007;55(5):443-52.
47. Yazdi AS, Drexler SK, Tschopp J. The role of the inflammasome in nonmyeloid cells. J Clin Immunol. 2010;30(5):623-7.
48. Paszkowski AS, Rau B, Mayer JM, Moller P, Beger HG. Therapeutic application of caspase 1/interleukin-1beta-converting enzyme inhibitor decreases the death rate in severe acute experimental pancreatitis. Ann Surg. 2002;235(1):68-76.
49. Anderson JP, Mueller JL, Rosengren S, Boyle DL, Schaner P, Cannon SB, et al. Structural, expression, and evolutionary analysis of mouse CIAS1. Gene. 2004;338(1):25-34.
50. Lech M, Avila-Ferrufino A, Skuginna V, Susanti HE, Anders HJ. Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD-like receptor and

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

inflammasome-related mRNAs in humans and mice. Int Immunol. 2010;22(9):717-28.
51. Masumoto J, Taniguchi S, Nakayama J, Shiohara M, Hidaka E, Katsuyama T, et al. Expression of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, a pyrin N-terminal homology domain-containing protein, in normal human tissues. J Histochem Cytochem. 2001;49(10):1269-75.
52. Burdette D, Haskett A, Presser L, McRae S, Iqbal J, Waris G. Hepatitis C virus activates interleukin-1beta via caspase-1-inflammasome complex. The Journal of general virology. 2012;93(Pt 2):235-46.
53. Negash AA, Ramos HJ, Crochet N, Lau DT, Doehle B, Papic N, et al. IL-1beta production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. PLoS pathogens. 2013;9(4):e1003330.
54. Watanabe A, Sohail MA, Gomes DA, Hashmi A, Nagata J, Sutterwala FS, et al. Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009;296(6):G1248-57.
55. Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohamadnejad M, Sutterwala FS, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. The Journal of clinical investigation. 2009;119(2):305-14.
56. Kolly L, Busso N, Palmer G, Talabot-Ayer D, Chobaz V, So A. Expression and function of the NALP3 inflammasome in rheumatoid synovium. Immunology. 2010;129(2):178-85.
57. Rawat R, Cohen TV, Ampong B, Francia D, Henriques-Pons A, Hoffman EP, et al. Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle. Am J Pathol. 2010;176(6):2891-900.
58. Dinarello CA, Rosenwasser LJ, Wolff SM. Demonstration of a circulating suppressor factor of thymocyte proliferation during endotoxin fever in humans. J Immunol. 1981;127(6):2517-9.
59. Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, et al. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81(24):7907-11.
60. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annual review of immunology. 2009;27:519-50.
61. Dinarello CA. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. Cell. 2010;140(6):935-50.
62. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. Nature reviews Immunology. 2010;10(2):89-102.
63. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. Immunity. 2013;39(6):1003-18.
64. Netea MG, van de Veerdonk FL, van der Meer JW, Dinarello CA, Joosten LA. Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. Annual review of immunology. 2015;33:49-77.
65. Shulga N, Pastorino JG. Hexokinase II binding to mitochondria is necessary for Kupffer cell activation and is potentiated by ethanol exposure. The Journal of biological chemistry. 2014;289(38):26213-25.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

66. Petrasek J, Dolganiuc A, Csak T, Kurt-Jones EA, Szabo G. Type I interferons protect from Toll-like receptor 9-associated liver injury and regulate IL-1 receptor antagonist in mice. Gastroenterology. 2011;140(2):697-708 e4.
67. Granowitz EV, Vannier E, Poutsiaka DD, Dinarello CA. Effect of interleukin-1 (IL-1) blockade on cytokine synthesis: II. IL-1 receptor antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine synthesis by human monocytes. Blood. 1992;79(9):2364-9.
68. Granowitz EV, Clark BD, Vannier E, Callahan MV, Dinarello CA. Effect of interleukin-1 (IL-1) blockade on cytokine synthesis: I. IL-1 receptor antagonist inhibits IL-1-induced cytokine synthesis and blocks the binding of IL-1 to its type II receptor on human monocytes. Blood. 1992;79(9):2356-63.
69. Mehal W, Imaeda A. Cell death and fibrogenesis. Semin Liver Dis. 2010;30(3):226-31.
70. Cosgrove BD, Cheng C, Pritchard JR, Stolz DB, Lauffenburger DA, Griffith LG. An inducible autocrine cascade regulates rat hepatocyte proliferation and apoptosis responses to tumor necrosis factor-alpha. Hepatology. 2008;48(1):276-88.
71. Dinarello CA. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. N Engl J Med. 2000;343(10):732-4.
72. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. Annual review of immunology. 2011;29:707-35.
73. Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, Hsu LC, Goode J, Miething C, et al. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. Cell. 2007;130(5):918-31.
74. Guma M, Ronacher L, Liu-Bryan R, Takai S, Karin M, Corr M. Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation. Arthritis Rheum. 2009;60(12):3642-50.
75. Joosten LA, Netea MG, Fantuzzi G, Koenders MI, Helsen MM, Sparrer H, et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta. Arthritis Rheum. 2009;60(12):3651-62.
76. Mayer-Barber KD, Barber DL, Shenderov K, White SD, Wilson MS, Cheever A, et al. Caspase-1 independent IL-1beta production is critical for host resistance to mycobacterium tuberculosis and does not require TLR signaling in vivo. J Immunol. 2010;184(7):3326-30.
77. Fantuzzi G, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Sipe JD, Kuida K, et al. Response to local inflammation of IL-1 beta-converting enzyme- deficient mice. J Immunol. 1997;158(4):1818-24.
78. Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, Ross S, Wieczorek M, Kroona H, et al. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(11):6261-6.
79. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. Science. 2013;341(6151):1246-9.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

80. Dinarello CA. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. Eur Cytokine Netw. 2000;11(3):483-6.
81. Serti E, Werner JM, Chattergoon M, Cox AL, Lohmann V, Rehermann B. Monocytes activate natural killer cells via inflammasome-induced interleukin 18 in response to hepatitis C virus replication. Gastroenterology. 2014;147(1):209-20 e3.
82. Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Samson M. IL-33 and HMGB1 alarmins: sensors of cellular death and their involvement in liver pathology. Liver Int. 2012;32(8):1200-10.
83. Villarreal DO, Weiner DB. Interleukin 33: a switch-hitting cytokine. Curr Opin Immunol. 2014;28:102-6.
84. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(1):282-7.
85. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. Immunity. 2005;23(5):479-90.
86. Cayrol C, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(22):9021-6.
87. Luzina IG, Pickering EM, Kopach P, Kang PH, Lockatell V, Todd NW, et al. Full-length IL-33 promotes inflammation but not Th2 response in vivo in an ST2-independent fashion. J Immunol. 2012;189(1):403-10.
88. Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, et al. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. Journal of hepatology. 2012;56(1):26-33.
89. Marvie P, Lisbonne M, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. J Cell Mol Med. 2010;14(6B):1726-39.
90. Yin H, Huang BJ, Yang H, Huang YF, Xiong P, Zheng F, et al. Pretreatment with soluble ST2 reduces warm hepatic ischemia/reperfusion injury. Biochem Biophys Res Commun. 2006;351(4):940-6.
91. Amatucci A, Novobrantseva T, Gilbride K, Brickelmaier M, Hochman P, Ibraghimov A. Recombinant ST2 boosts hepatic Th2 response in vivo. J Leukoc Biol. 2007;82(1):124-32.
92. Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, et al. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(43):18581-6.
93. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. Nature. 2012;481(7381):278-86.
94. Ouyang X, Ghani A, Mehal WZ. Inflammasome biology in fibrogenesis. Biochim Biophys Acta. 2013;1832(7):979-88.
95. O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ, Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver D, Practice Parameters Committee of the American College of G. Alcoholic liver disease. Hepatology. 2010;51(1):307-28.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

96. Mandrekar P, Szabo G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. Journal of hepatology. 2009;50(6):1258-66.
97. Peng H, Tian Z. Re-examining the origin and function of liver-resident NK cells. Trends Immunol. 2015;36(5):293-9.
98. McClain CJ, Cohen DA, Dinarello CA, Cannon JG, Shedlofsky SI, Kaplan AM. Serum interleukin-1 (IL-1) activity in alcoholic hepatitis. Life Sci. 1986;39(16):1479-85.
99. Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. Gastroenterology. 2011;141(5):1572-85.
100. Gao B, Seki E, Brenner DA, Friedman S, Cohen JI, Nagy L, et al. Innate immunity in alcoholic liver disease. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011;300(4):G516-25.
101. Szabo G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. Gastroenterology. 2015;148(1):30-6.
102. Inokuchi S, Tsukamoto H, Park E, Liu ZX, Brenner DA, Seki E. Toll-like receptor 4 mediates alcohol-induced steatohepatitis through bone marrow-derived and endogenous liver cells in mice. Alcohol Clin Exp Res. 2011;35(8):1509-18.
103. Ganz M, Szabo G. Immune and inflammatory pathways in NASH. Hepatol Int. 2013;7 Suppl 2:771-81.
104. Mehal WZ. The inflammasome in liver injury and non-alcoholic fatty liver disease. Dig Dis. 2014;32(5):507-15.
105. Lamkanfi M. Emerging inflammasome effector mechanisms. Nature reviews Immunology. 2011;11(3):213-20.
106. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2014;105(2):141-50.
107. Lee HM, Kim JJ, Kim HJ, Shong M, Ku BJ, Jo EK. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. Diabetes. 2013;62(1):194-204.
108. Ganz M, Csak T, Szabo G. High fat diet feeding results in gender specific steatohepatitis and inflammasome activation. World J Gastroenterol. 2014;20(26):8525-34.
109. Wree A, Eguchi A, McGeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. Hepatology. 2014;59(3):898-910.
110. Xiao J, Zhu Y, Liu Y, Tipoe GL, Xing F, So KF. Lycium barbarum polysaccharide attenuates alcoholic cellular injury through TXNIP-NLRP3 inflammasome pathway. Int J Biol Macromol. 2014;69:73-8.
111. Pan JJ, Fallon MB. Gender and racial differences in nonalcoholic fatty liver disease. World J Hepatol. 2014;6(5):274-83.
112. Csak T, Velayudham A, Hritz I, Petrasek J, Levin I, Lippai D, et al. Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and toll-like receptor 4 expression attenuates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011;300(3):G433-41.
113. Croagh CM, Lubel JS. Natural history of chronic hepatitis B: phases in a complex relationship. World J Gastroenterol. 2014;20(30):10395-404.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

114. Murray JM, Wieland SF, Purcell RH, Chisari FV. Dynamics of hepatitis B virus clearance in chimpanzees. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(49):17780-5.
115. Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. Gut. 2012;61(12):1754-64.
116. Han Q, Zhang C, Zhang J, Tian Z. The role of innate immunity in HBV infection. Semin Immunopathol. 2013;35(1):23-38.
117. Maini MK, Gehring AJ. The role of innate immunity in the immunopathology and treatment of HBV infection. Journal of hepatology. 2016;64(1 Suppl):S60-70.
118. Germanidis G, Argentou N, Hytiroglou P, Vassiliadis T, Patsiaoura K, Germenis AE, et al. Liver FOXP3 and PD1/PDL1 Expression is Down-Regulated in Chronic HBV Hepatitis on Maintained Remission Related to the Degree of Inflammation. Frontiers in immunology. 2013;4:207.
119. Speletas M, Argentou N, Germanidis G, Vasiliadis T, Mantzoukis K, Patsiaoura K, et al. Foxp3 expression in liver correlates with the degree but not the cause of inflammation. Mediators of inflammation. 2011;2011:827565.
120. Brunetto MR, Bonino F. Interferon therapy of chronic hepatitis B. Intervirology. 2014;57(3-4):163-70.
121. Daniels HM, Meager A, Eddleston AL, Alexander GJ, Williams R. Spontaneous production of tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 beta during interferon-alpha treatment of chronic HBV infection. Lancet. 1990;335(8694):875-7.
122. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. Hepatology. 2002;36(5 Suppl 1):S21-9.
123. Bortolami M, Kotsafti A, Cardin R, Farinati F. Fas / FasL system, IL-1beta expression and apoptosis in chronic HBV and HCV liver disease. Journal of viral hepatitis. 2008;15(7):515-22.
124. Chattergoon MA, Latanich R, Quinn J, Winter ME, Buckheit RW, 3rd, Blankson JN, et al. HIV and HCV activate the inflammasome in monocytes and macrophages via endosomal Toll-like receptors without induction of type 1 interferon. PLoS pathogens. 2014;10(5):e1004082.
125. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. Journal of hepatology. 1995;22(6):696-9.
126. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8.
127. Kuiper J, Brouwer, A., Knook, D. L. and Van Berkel, T. J. C. Kupffer and sinusoidal endothelial cells: In *The Liver: Biology and Pathobiology*. 1994;3rd edn, 791-818:Raven Press, New York.
128. Narmada BC, Chia SM, Tucker-Kellogg L, Yu H. HGF regulates the activation of TGF-beta1 in rat hepatocytes and hepatic stellate cells. J Cell Physiol. 2013;228(2):393-401.
129. Foka P, Karamichali E, Dalagiorgou G, Serti E, Doumba PP, Pissas G, et al. Hepatitis C virus modulates lipid regulatory factor Angiopoietin-like 3 gene

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

expression by repressing HNF-1alpha activity. J Hepatol. 2014;60(1):30-8. doi: 10.1016/j.jhep.2013.08.016. Epub Aug 23.
130. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. Annual review of pathology. 2006;1:23-61.
131. Foka P, Dimitriadis A, Kyratzopoulou E, Giannimaras DA, Sarno S, Simos G, et al. A complex signaling network involving protein kinase CK2 is required for hepatitis C virus core protein-mediated modulation of the iron-regulatory hepcidin gene expression. Cell Mol Life Sci. 2014;71(21):4243-58. doi: 10.1007/s00018-014-1621-4. Epub 2014 Apr 10.
132. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. Immunity. 2010;33(3):375-86.
133. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. Blood. 2009;113(10):2324-35.
134. Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. Annual review of immunology. 2009;27:147-63.
135. Henao-Mejia J, Elinav E, Thaiss CA, Flavell RA. Inflammasomes and metabolic disease. Annual review of physiology. 2014;76:57-78.
136. Tilg H, Moschen AR, Szabo G. Interleukin-1 and inflammasomes in ALD/AAH and NAFLD/NASH. Hepatology. 2016.
137. Han Y, Chen Z, Hou R, Yan D, Liu C, Chen S, et al. Expression of AIM2 is correlated with increased inflammation in chronic hepatitis B patients. Virol J. 2015;12:129.
138. Levy M, Thaiss CA, Elinav E. Taming the inflammasome. Nature medicine. 2015;21(3):213-5.
139. Bieghs V, Trautwein C. The innate immune response during liver inflammation and metabolic disease. Trends Immunol. 2013;34(9):446-52.
140. Hoque R, Vodovotz Y, Mehal W. Therapeutic strategies in inflammasome mediated diseases of the liver. Journal of hepatology. 2013;58(5):1047-52.
141. Possamai LA, Thursz MR, Wendon JA, Antoniades CG. Modulation of monocyte/macrophage function: a therapeutic strategy in the treatment of acute liver failure. Journal of hepatology. 2014;61(2):439-45.
142. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet. 2012;380(9859):2095-128.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 14:22:21 EEST - 3.18.109.42