



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡ
ΟΓΡ
ΑΜΜ
Α
ΜΕΤ
ΑΠΤ

ΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της Ηπατικής φλεγμονής και ανοσορρύθμισης,
σε ασθενείς με HIV, HCV λοιμώξεις**

Ηλέκτρα Σοφού

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Αναστάσιος Ε. Γερμενής, Καθηγητής εργαστηριακής Ανοσολογίας (Επιβλέπων)
- Ματθαίος Σπελέτας, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας
- Ευθύμιος Δαρδιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»

Λάρισα, Οκτώβριος 2018



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



M
ASTE
R
PRO
GRA
M IN
“C

CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS
A Study of Liver inflammation and immune regulation in patients with
HIV, HCV infections

By
ILEKTRA SOFOU

Board of Examiners

- Anastasios E. Germenis, Professor of Laboratory Immunology (Supervisor)
- Matthaios Speletas, Professor of Medical Immunology
- Efthimios Dardiotis, Assistant Professor of Neurology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in “Clinical Applications of Molecular Medicine”

Larissa, October 2018

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ..... | 4 |
| ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ..... | 6 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 7 |
| ABSTRACT..... | 8 |
| ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | |
| 1. ΦΛΕΓΜΟΝΗ..... | 10 |
| 1.1 Φλεγμονή και ιστική βλάβη..... | 10 |
| 1.2 Το φλεγμονόσωμα..... | 12 |
| 1.2.1 Το NLRP3 φλεγμονόσωμα..... | 14 |
| 1.2.2. Το AIM2 φλεγμονόσωμα..... | 15 |
| 1.3 Ανοσορρυθμιστικοί μηχανισμοί στη χρόνια φλεγμονή..... | 17 |
| 2. ΗΠΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ..... | 19 |
| 2.1 Ηπατική ίνωση..... | 19 |
| 2.2 Χρόνια ηπατίτιδα C..... | 20 |
| 2.3 HIV λοίμωξη..... | 22 |
| 2.4 Συλλοίμωξη HIV/HCV..... | 24 |
| 3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ..... | 27 |
| ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | |
| 1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ | |
| 1.1 Ασθενείς με HIV, HCV λοιμώξεις..... | 30 |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ..... | 32 |
| 2.1 Απομόνωση ολικού RNA..... | 32 |
| 2.2 Ανάστροφη μεταγραφή- σύνθεση cDNA..... | 34 |
| 2.3 Μελέτη της σχετικής γονιδιακής έκφρασης με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR/qRT-PCR)..... | 36 |
| 2.3.1 qRT-PCR: Περιγραφή της μεθόδου..... | 37 |
| 2.3.2 Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της qRT-PCR..... | 40 |
| 2.3.3 Σχεδιασμός εκκινητών..... | 41 |
| 2.4 Πειραματική διαδικασία..... | 43 |
| 2.5 Στατιστική ανάλυση..... | 44 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 45 |
| 3.1 Γονιδιακή έκφραση στους ασθενείς με HIV, HCV λοιμώξεις..... | 45 |
| 3.2 Γονιδιακή έκφραση και συσχέτιση με στάδιο φλεγμονής..... | 49 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 50 |
| 4.1 Το φλεγμονόσωμα NLRP3 και η IL-1β στην HIV-σχετιζόμενη ηπατική φλεγμονή..... | 50 |
| 4.2 Η IL-18 στην HIV-σχετιζόμενη ηπατική φλεγμονή..... | 51 |
| 4.3 Ανοσορρυθμιστικοί μηχανισμοί στην HIV-σχετιζόμενη ηπατική φλεγμονή..... | 51 |
| 4.4 Συμπεράσματα..... | 53 |
| 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 54 |

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Π.Θ). Το βιοπτικό υλικό από ασθενείς με HIV και HCV λοίμωξη, προήλθε από ασθενείς της Α' Παθολογικής Κλινικής και της Μονάδας Ειδικών Λοιμώξεων, του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Α.Χ.Ε.Π.Α, του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής: Τον Δρ. Αναστάσιο Ε. Γερμενή, Καθηγητή εργαστηριακής Ανοσολογίας της ιατρικής σχολής του Π.Θ, τον Δρ. Ματθαίο Σπελέτα, Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας της ιατρικής σχολής του Π.Θ και τον Δρ. Ευθύμιο Δαρδιώτη, Επίκουρο καθηγητή Νευρολογίας της ιατρικής σχολής του Π.Θ.

Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη, χρωστάω στον διευθυντή του εργαστηρίου και επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, Καθηγητή Αναστάσιο Ε. Γερμενή για την μοναδική αυτή ευκαιρία να εργαστώ τη φετινή χρονιά στο εργαστήριο Ανοσολογίας, για το θέμα το οποίο μου εμπιστεύτηκε να εκπονήσω, καθώς και για τη συμβολή του στην περάτωση της παρούσας εργασίας.

Θέλω να ευχαριστήσω από καρδιάς και τον καθηγητή μου και συνεπιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, Ματθαίο Σπελέτα. Η καθοδήγηση και οι συμβουλές του σε όλα τα στάδια του ερευνητικού αυτού ταξιδιού, ήταν καθοριστικές και η παρούσα εργασία δεν θα ήταν δυνατό να ολοκληρωθεί χωρίς τη βοήθειά του.

Δεν θα μπορούσα να ξεχάσω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας. Ιδιαίτερα, θέλω να ευχαριστήσω τη Δρ. Ειρήνη Σεβδαλή για το χρόνο, την υπομονή και τις συμβουλές της, στα πρώτα μου βήματα στην Ανοσολογία. Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω τους Δρ. Αδάμ Μολυβδά, Γερασιμίνα Τσιντή, Νάνσυ Φουσίκα, Ολυμπία Μαργαριτοπούλου, Νάνσυ Περιστέρα. Όλοι τους, αποτελούν πρότυπα συναδελφικότητας και ο φετινός χρόνος δεν θα ήταν ίδιος χωρίς αυτούς.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα συνεργατών μας, της Α' Παθολογικής Κλινικής του νοσοκομείου Α.Χ.Ε.Π.Α. Πιο συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω, τον αναπληρωτή καθηγητή Παθολογίας, της Ιατρικής σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Γεώργιο Γερμανίδη, για τη συνεργασία και τις συμβουλές του καθ'ολη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω τον κο. Θεόφιλο Χρυσανθίδη, Ειδικό Παθολόγο- Λοιμωξιολόγο και κα. Γεωργία Λώλη, ειδικευόμενη Παθολογίας για την πολύτιμη βοήθειά τους όσον αφορά τη συλλογή των δειγμάτων.

Τελευταίους, αλλά ίσως πιο σημαντικούς, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Αντώνη και Γαλήνη και τον αδερφό μου, Κορνήλιο. Η άνευ όρων αγάπη και στήριξή τους σε κάθε βήμα της ακαδημαϊκής μου πορείας, αλλά και της ζωής μου γενικότερα, είναι δώρα για τα οποία ένα απλό ευχαριστώ, δεν είναι αρκετό. Τους οφείλω, απλά και απέρριπτα, τα πάντα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

| | |
|------------------------------------------------|------------------------------------------|
| PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) | Μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με παθογόνα |
| DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) | Μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με καταστροφή |
| PRRs (Pattern recognition receptors) | Υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων |
| TLRs (Toll-like receptors) | Υποδοχείς τύπου Toll |
| CASP-1 (Caspase-1) | Κασπάση-1 |
| IL(Interleukin) | Ιντερλευκίνη |
| NLRs (Nod-like receptors) | Υποδοχείς τύπου NOD |
| ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein) | Αποπτωτική πρωτεΐνη τύπου Speck |
| CAPS (Cryopyrin-associated periodic syndromes) | Κρυοπυρηνικά περιοδικά σύνδρομα |
| ALR (AIM2-like receptors) | Υποδοχείς τύπου AIM2 |
| dsDNA (double-stranded DNA) | Δίκλωνο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ |
| TGF-β (Tumour Growth Factor) | Κυτταροκίνη TGF-β |
| Tregs (Regulatory T cells) | Ρυθμιστικά T κύτταρα |
| ECM (Extracellular Matrix) | Εξωκυττάρια, θεμέλια ουσία |
| CTGF (Connective tissue Growth factor) | Αυξητικός παράγοντας συνδετικού ιστού |
| HCC (Hepatocellular Carcinoma) | Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα |
| XHC | Χρόνια Ηπατίτιδα C |
| IFN (Interferon) | Ιντερφερόνη |
| DAA (Direct activity, antiviral treatment) | Αντιική θεραπεία άμεσης δράσης |
| NK (Natural Killer cells) | Φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα |
| CD (Cluster of differentiation) | Δείκτης επιφανείας |
| HAART | Αντιρετροϊκή θεραπεία υψηλής |
| δραστικότητας | |
| NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) | Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος |
| KCs (Kupffer cells) | Κύτταρα Kupffer |
| HSCs (Hepatic Stellate cells) | Ηπατικά αστεροειδή κύτταρα |
| MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) | Χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων-1 |
| Th (Helper T cells) | Βοηθητικά T κύτταρα |
| CCR5 (C-C Chemokine receptor type 5) | C-C υποδοχέας χημειοκινών τύπου 5 |
| CXCR4 (C-X-C Chemokine receptor type 4) | C-X-C υποδοχέας χημειοκινών τύπου 4 |
| XHB | Χρόνια ηπατίτιδα B |
| B2M (B2-microglobulin) | B2-Μικροσφαιρίνη |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρόνια ηπατική φλεγμονή, ως αποτέλεσμα ιογενούς λοίμωξης, αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις της δημόσιας υγείας, σήμερα. Ο ρόλος της φυσικής ανοσίας στην παθογένεση της ηπατικής νόσου έχει μελετηθεί εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερα στην Χρόνια ηπατίτιδα Β και C, με *in vitro* και *in vivo* πειράματα να υποδεικνύουν το φλεγμονόσωμα NLRP3 και την IL-1β, ως σημαντικούς μεσολαβητές της φλεγμονής στον ηπατικό ιστό.

Στην περίπτωση της HIV-σχετιζόμενης ηπατικής νόσου, οι πληροφορίες που διαθέτουμε όσον αφορά τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένεση και χρονιότητα της φλεγμονής, είναι πολύ λιγότερες, ενώ όσες πληροφορίες διαθέτουμε αφορούν είτε *in vitro* πειράματα, είτε δεδομένα από τον ορό ασθενών. Η παρούσα εργασία, αποσκοπεί στην *ex vivo* διερεύνηση των μοριακών αυτών μηχανισμών, μελετώντας τον ρόλο του NLRP3 και των κυτταροκινών IL-1β, IL-18 καθώς και παραγόντων ανοσορρύθμισης σε ασθενείς με HIV, HIV/HCV λοιμώξεις.

Μελετήθηκαν βιοψίες ηπατικού ιστού, από ασθενείς με HIV, HIV/HCV και HCV λοιμώξεις. Κομμάτι των βιοψιών, εξετάστηκε προς προσδιορισμό του σταδίου φλεγμονής και ίνωσης, ενώ από το υπόλοιπο εκχυλίστηκε ολικό RNA, ακολούθησε ανάστροφη μεταγραφή προς σύνθεση cDNA. Το cDNA, χρησιμοποιήθηκε για προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης των γονιδίων, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR). Τα γονίδια που μελετήθηκαν ήταν τα *NLRP3*, *IL1B*, *IL18*, *AIM2*, τα οποία σχετίζονται με τη φλεγμονή και τα *FOXP3*, *PDI*, *PDL1*, *SMAD7*, τα οποία σχετίζονται με την ανοσορρύθμιση.

Τα αποτελέσματά μας, έδειξαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση *NLRP3*, *IL1B* μεταξύ των διαφορετικών ομάδων (P=0.0274, P=0.0039 αντίστοιχα) με σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA στην ομάδα των ασθενών με HIV, HIV/HCV, αλλά όχι στην ομάδα των ασθενών με HCV λοίμωξη. Για τα υπόλοιπα γονίδια που μελετήθηκαν δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, αλλά ούτε και με το στάδιο της φλεγμονής.

Συμπερασματικά, λοιπόν, τα ευρήματά μας υποδεικνύουν πως το μονοπάτι του φλεγμονοσώματος NLRP3 και η IL-1β, μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της HIV-σχετιζόμενης ηπατικής φλεγμονής, αλλά όχι στη χρόνια ηπατίτιδα C.

ABSTRACT

Chronic liver inflammation, as a result of viral infection, is, currently, one of the greatest challenges in public health. In the past years, The role of innate immunity in the pathogenesis of liver disease has been studied extensively, mainly focused on Chronic Hepatitis B, and C. *in vitro* and *in vivo* experiments, indicate that the NLRP3 inflammasome pathway and IL-1B, are important mediators of inflammation in chronic viral hepatitis.

In the case of HIV-associated liver disease, there are little data available, regarding the molecular mechanisms involved in the pathogenesis and chronicity of inflammation. Moreover, even the data that are available, concern mostly results from either *in vitro* experiments or serum analyses. The present study aims to investigate (*ex vivo*) the potential role of NLRP3, IL-1B, IL-18, alongside with molecules involved in immune regulation of the inflammatory process in the liver, in patients with HIV, HIV/HCV infections.

We studied liver biopsies from patients with HIV, HIV/HCV and HCV infections. Part of the biopsies was examined by two independent pathologists for the determination of inflammation and fibrosis staging. From the remaining rest of each biopsy, RNA was extracted and reverse transcribed to cDNA. cDNA was used in semi-quantitative qRT-PCR to measure levels of expression of proinflammatory genes *NLRP3*, *IL1B*, *IL18*, *AIM2*, as well as immunoregulatory genes *FOXP3*, *PDI*, *PDL1*, *SMAD7*.

Our results exhibit significant differences between expression of *NLRP3*, *IL1B* among different groups (P=0.0274, P=0.0039 respectively), with significantly elevated levels of mRNA in patients with HIV, HIV/HCV infections, but not in patients with HCV infection.

With regards to the rest of the examined genes, no significant differences were found among different groups. Moreover, no significant correlation was found between relative gene expression and degree of inflammation.

In conclusion, our findings suggest that the NLRP3 inflammasome pathway and IL-1B might play a significant role in the pathogenesis of HIV-associated liver inflammation, but not in Chronic Hepatitis C.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΦΛΕΓΜΟΝΗ

1.1 Φλεγμονή και ιστική βλάβη

Με τον όρο φλεγμονή, αναφερόμαστε στην τοπική ιστική αντίδραση του οργανισμού απέναντι σε κάποιον βλαπτικό παράγοντα (μικρόβια, μεταβολικές διαταραχές, εκφυλιστικοί παράγοντες κ.α). Παρόλο που οι κλινικές εκδηλώσεις της φλεγμονής (ερυθρότητα, εξοίδηση, πόνος θερμότητα) είναι γνωστές, ήδη από τον 1^ο αιώνα μ.Χ., όπως διατυπώθηκαν από τον Κέλσο (1), ακόμα υπάρχουν σημαντικά κενά στην κατανόηση των μηχανισμών που ενορχηστρώνουν την αντίδραση αυτή του οργανισμού (2). Για παράδειγμα, είναι ακόμα δύσκολο να προβλέψει κανείς αν ένας φλεγμένον ιστός θα ανακάμψει, αποκαθιστώντας την ομοιοστασία του, ή θα προχωρήσει σε κατάσταση ίνωσης. Επίσης, παρόλο που η ίνωση είναι αποτέλεσμα της φλεγμονής, είναι ακόμη άγνωστο το γιατί κάποιες ασθένειες προχωρούν σε αυτό το στάδιο χωρίς προηγουμένως να υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις φλεγμονώδους αντίδρασης (3).

Όσον αφορά τη φλεγμονή στην οξεία φάση της, έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην εξιχνίαση των αιτιών και των μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτή (4). Σκοπός της φλεγμονώδους αντίδρασης είναι η εξάλειψη του παθογόνου (συνήθως μικρόβια) και η επιδιόρθωση-επούλωση του ιστού. Ο μηχανισμός ο οποίος λαμβάνει χώρα προς την επίτευξη αυτού του σκοπού, προϋποθέτει, αρχικά, τη μεσολάβηση ιστικών μακροφάγων και σιτευτικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά, επάγουν την παραγωγή μορίων-μεσολαβητών της φλεγμονής όπως κυτταροκίνες, χημειοκίνες, αγγειοδραστικές αμίνες και προϊόντα πρωτεολυτικής διάσπασης. Ακολούθως, σε απάντηση του «μηνύματος κινδύνου» που φέρουν τα μόρια αυτά, πρωτεΐνες του πλάσματος και λευκοκύτταρα (κυρίως ουδετερόφιλα), εξαγγειώνονται στο σημείο της φλεγμονής. Ο ίδιος ο παθογόνος μικροοργανισμός ή οι κυτταροκίνες που παράχθηκαν, επάγουν την απελευθέρωση τοξικών συστατικών από τα ουδετερόφιλα όπως δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) ή δραστικές ρίζες αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), πρωτεΐνωση 3, καθεψίνη G, ελαστάση (5).

Σε περίπτωση που η οξεία φλεγμονώδης αντίδραση αποτύχει να εξοντώσει το παθογόνο και να επιδιορθώσει την ιστική βλάβη, η φλεγμονώδης αντίδραση αποκτά νέα χαρακτηριστικά. Αυτή τη φορά, κύριο ρόλο στην εξουδετέρωση του βλαπτικού παράγοντα παίζουν τα μακροφάγα και τα T λεμφοκύτταρα (στην περίπτωση λοίμωξης). Αν και αυτή η ανοσιακή απόκριση δεν έχει αποτέλεσμα, τότε η φλεγμονή περνά σε στάδιο χρονιότητας, συνοδευόμενη από τη δημιουργία κοκκιωμάτων ή τριτοταγών λεμφικών ιστών (6).

Η χρόνια φλεγμονή, σε αντίθεση με την οξεία, εγείρει περισσότερα ερωτήματα όσον αφορά τους μηχανισμούς που εμπλέκονται και τα μονοπάτια που ακολουθούνται για την εμφάνισή της. Πέρα από την εμφάνιση χρονιότητας στη φλεγμονή λόγω επίμονης λοίμωξης, φαίνεται να εμπλέκονται και άλλα αίτια στην εμφάνισή της, ιδιαίτερα σε νοσήματα αυτοάνοσης αιτιολογίας, καρδιαγγιακές παθήσεις και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (4). Στις περιπτώσεις αυτές, διαταραχές στην ομοιόσταση του ιστού έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση χρόνιας φλεγμονής (Εικ. 1.1)

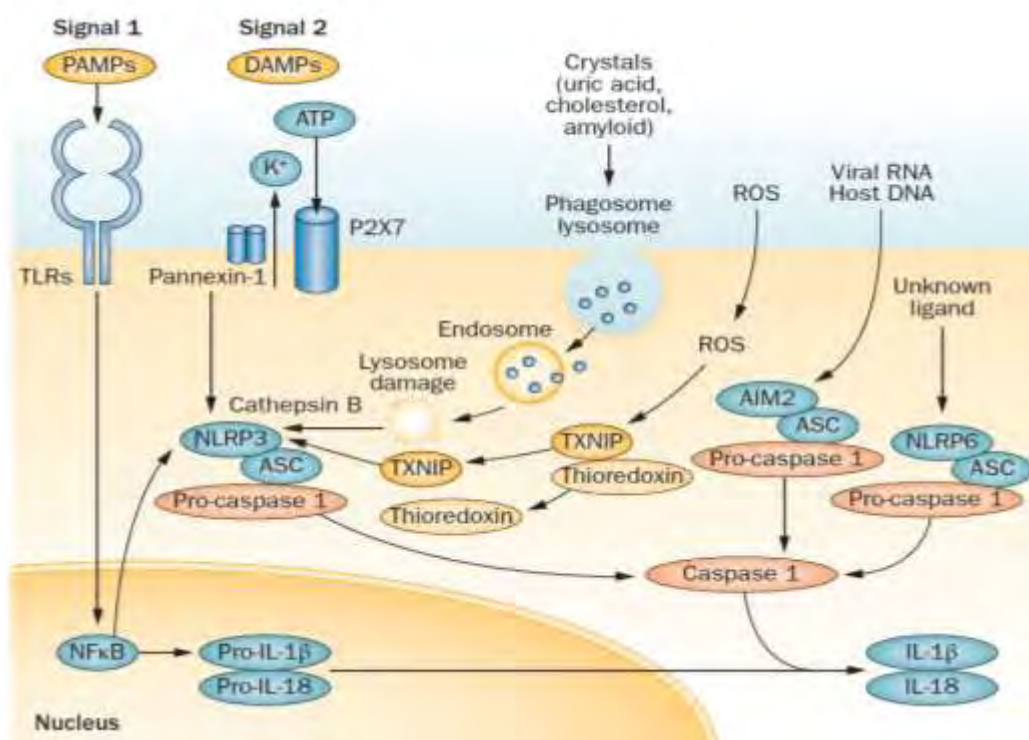
Επομένως, είναι φανερό πως περαιτέρω μελέτη της χρόνιας φλεγμονής και των μηχανισμών-ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων- είναι αναγκαία, για την κατανόηση της παθογένεσης πολλών ασθενειών αλλά και την εύρεση πιθανών μοριακών στόχων για θεραπευτική παρέμβαση.



Εικόνα 1.1 Αίτια και παθοφυσιολογία της φλεγμονής. Η φλεγμονώδης αντίδραση του οργανισμού εξαρτάται από το αρχικό ερέθισμα και ανάλογα με αυτό καθορίζεται και ο σκοπός εμφάνισής της (και ανάλογα και οι παθολογικές εκφάνσεις της). [Προσαρμογή από : Medzhitov, R. Nature (2008); 454: 429]

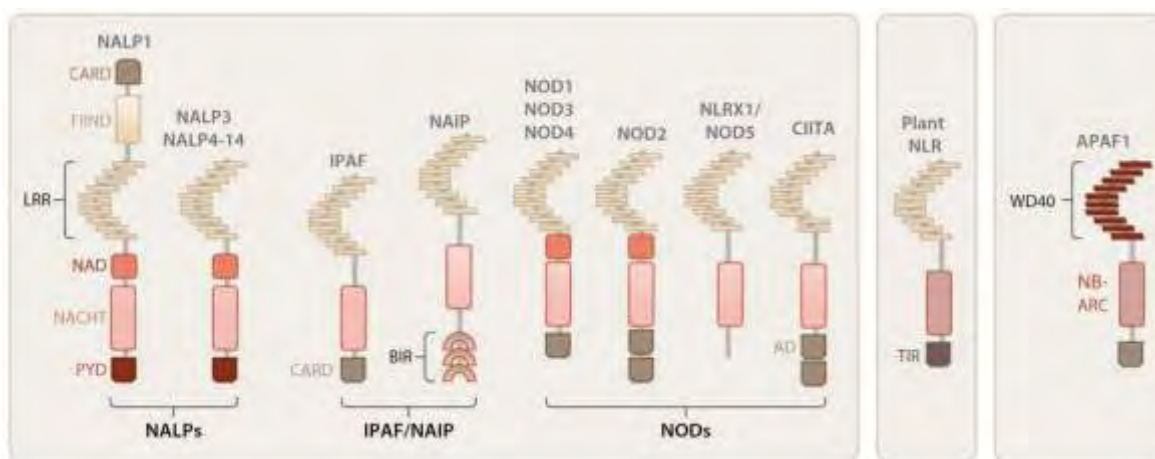
1.2 Το φλεγμονόσωμα

Τα τελευταία χρόνια έχει αναζωπυρωθεί το ενδιαφέρον των ερευνητών για τον ρόλο της φυσικής ανοσίας στην ανάπτυξη της χρόνιας φλεγμονής. Η ενεργοποίηση των μηχανισμών της φυσικής ανοσίας εξαρτάται από την αναγνώριση μοριακών μοτίβων, σχετιζόμενων με παθογόνα (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs), ή μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με βλάβη (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs), προερχόμενα από ενδογενείς παράγοντες κατόπιν καταστροφής κυττάρων και ιστών. Για την αναγνώριση των μοριακών αυτών μοτίβων, είναι απαραίτητη η συμβολή υποδοχέων αναγνώρισης μοτίβων (Pattern Recognition Receptors, PRRs), με πιο γνωστούς τους TLRs (Toll-like Receptors) (7). Τα συμβάντα αυτά, έρχεται να πλαισιώσει η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος.



Εικόνα 1.2 Τα φλεγμονοσώματα που εμπλέκονται στα ηπατικά νοσήματα. Τα NLRP3, AIM2 φλεγμονοσώματα εκφράζονται σε κύτταρα του ανοσιακού συστήματος στο ήπαρ, ενώ το NLRP6 εκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου αλλά όχι στο ήπαρ. Στην εικόνα φαίνονται αναλυτικά τα βήματα που ακολουθούνται για την ενεργοποίηση του NLRP3. Το πρώτο ερέθισμα προερχόμενο από κάποιο παθογόνο (PAMP) ενεργοποιεί τους TLR υποδοχείς και ξεκινά η έκφραση του γονιδίου του NLRP3. Για την ενεργοποίηση της κασπάσης-1 είναι απαραίτητη και η ύπαρξη δεύτερου σήματος (DAMP) προκειμένου να εκτελέσει η κασπάση-1 την πρωτεολυτική δράση της προς την ωρίμανση των κυτταροκινών IL-1 β , IL-18. [Προσαρμογή από Szabo G, Petrasek J., Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2015]

Το 2003, οι Martinon, Burns και Tschopp, περιέγραψαν τη δομή των φλεγμονοσωμάτων, δηλαδή πρωτεϊνικές δομές, οι οποίες συντονίζουν τη δράση του ενζύμου, Κασπάση-1 (Caspase-1, *CASP1*), η οποία με τη σειρά της δρα πρωτεολυτικά προς τη διάσπαση των ανενεργών μορφών των κυτταροκινών προ-IL-1β, προ-IL-18 στις ώριμες μορφές τους (IL-1β, IL-18) οι οποίες δρουν ως επαγωγείς της φλεγμονώδους αντίδρασης (8). Η ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων προϋποθέτει δύο σήματα για την πυροδότηση της φλεγμονώδους αντίδρασης του οργανισμού (**Εικ.1.2**). Η πρώτη, αφορά την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος με μεσολάβηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB, ύστερα από σήμα που προήλθε από κάποιο παθογόνο (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) και αναγνωρίστηκε από TLR μεμβρανικούς υποδοχείς (Toll-like receptors), ενώ το δεύτερο σήμα προέρχεται από ενδογενή μόρια που απελευθερώνονται έπειτα από τραυματισμό του ιστού και ενεργοποιούν υποδοχείς των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος. Οι υποδοχείς οι οποίοι εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων ανήκουν κυρίως στην οικογένεια των NLRs (Nod-Like Receptors) και, σε αντίθεση με τους TLRs, οι οποίοι είναι μεμβρανικοί υποδοχείς, δομούνται από διαλυτές πρωτεΐνες και περιφέρονται στο κυτταρόπλασμα περιμένοντας να λάβουν σήμα προερχόμενο από DAMPs (9). Οι NLRs διακρίνονται σε τρεις υποκατηγορίες (**Εικ. 1.3**): τους NOD, NLRP, IPAF, με το NLRP φλεγμονόσωμα να έχει παρατηρηθεί και μελετηθεί περισσότερο στην περίπτωση της ηπατικής φλεγμονής. Τα φλεγμονοσώματα στο ήπαρ εκφράζονται και είναι λειτουργικώς ενεργά στα ηπατοκύτταρα, στα ημιτονοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα του ιστού, στα μακροφάγα και στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα (10). Ενδιαφέρον παρουσιάζει, το γεγονός ότι στην ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων, εκτός από τα σήματα που προέρχονται από PAMPs και DAMPs, έχει βρεθεί πως συμβάλλουν, ή ακόμη μπορεί να λειτουργήσουν ως μοναδική πηγή διέγερσης, και παράγοντες που σχετίζονται με τη σωστή λειτουργία των ενεργειακών διεργασιών των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, βλάβες στους μηχανισμούς δράσης των μιτοχονδρίων- οι οποίες εκδηλώνονται με αύξηση των επιπέδων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα, ύπαρξη δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων και μιτοχονδριακού DNA- έχουν ως αποτέλεσμα την υπέρμετρη ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων και κατά συνέπεια την έκκριση κυτταροκινών που επάγουν τη φλεγμονή κατά τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω (11).

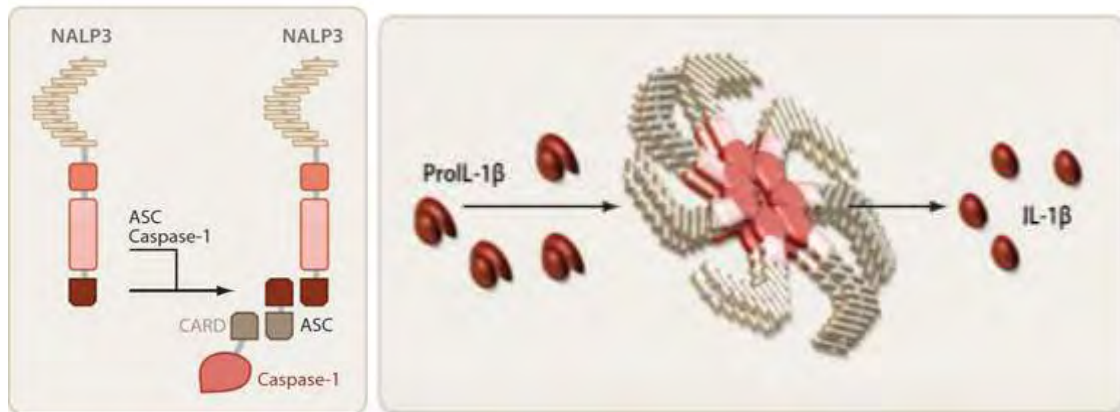


Εικόνα 1.3 Δομή και οργάνωση των NOD-like υποδοχέων(NLRs). Η NACHT υπομονάδα είναι κοινή σε όλα τα μέλη της οικογένειας των NLRs και είναι αυτή η οποία προσδίδει στον υποδοχέα την ιδιότητα να ολιγομερίζεται. Οι υποοικογένειες διακρίνονται βάσει της δραστικής υπομονάδας (PYD, CARD, BIR, AD) με μεγαλύτερη υποοικογένεια την NALP (ή NLRP) που περιέχει την PYD υπομονάδα.[Προσαρμογή από Martinon F, Mayor A, Tschopp J., *Annu Rev Immunol.* (2009);]

1.2.1 Το *NLRP3* φλεγμονόσωμα

Από την οικογένεια των NLRs (Nod-Like Receptors), το *NLRP3* φλεγμονόσωμα είναι αυτό το οποίο έχει μελετηθεί περισσότερο, λόγω του μεγάλου εύρους ερεθισμάτων στα οποία αποκρίνεται. Δομικά, οι υποδοχείς NLR αποτελούνται από τρεις υπομονάδες (NACHT, LRR κοινός σε όλους, δραστική υπομονάδα διαφέρει και καθορίζει το είδος του υποδοχέα). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι υποδοχείς βρίσκονται ελεύθεροι στο κυτταρόπλασμα, ενώ κατόπιν ερεθίσματος, ο υποδοχέας λειτουργεί ως αισθητήρας και μαζί με την πρωτεΐνη ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein), σχηματίζουν το ελικοειδούς μορφής φλεγμονόσωμα, *NLRP3* (**Εικ.1.4**). Όσον αφορά την ενεργοποίηση του *NLRP3*, αυτή συνίσταται από δύο βήματα. Το πρώτο σήμα, προερχόμενο από κάποιο παθογόνο (PAMP) επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου *NLRP3*, μέσω του μονοπατιού του NFκ-β. Ακολούθως, σήμα προερχόμενο από κατεστραμμένα γειτονικά κύτταρα (DAMP) οδηγεί στην ενεργοποίηση του *NLRP3*. Το κρίσιμο σημείο, στο στάδιο της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος είναι η συμπλοκοποίηση του NLR υποδοχέα με την πρωτεΐνη ASC με σκοπό την επιστράτευση της κασπάσης-1. Επομένως, είναι εύλογο να συμπεράνει κανείς πως το στάδιο αυτό αποτελεί ελκυστικό στόχο για την ανάπτυξη μορίων-αναστολέων, για την καταπολέμηση της υπέρμετρης ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος και κατά συνέπεια καταστολή της φλεγμονώδους αντίδρασης του οργανισμού. (12)

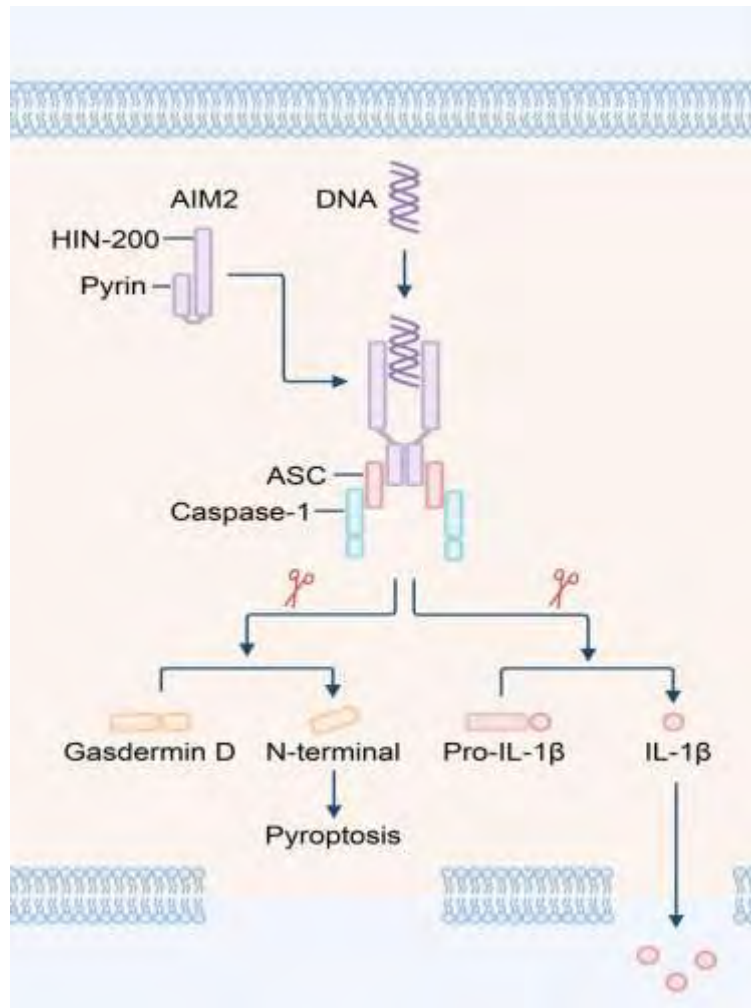
Στη βιβλιογραφία, αναφέρεται μία πληθώρα νοσημάτων που συνδέονται άμεσα με την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3. Πιο συγκεκριμένα, τα νοσήματα αυτά χωρίζονται σε τέσσερις ευρείες κατηγορίες: α) Αυτοφλεγμονώδη νοσήματα, οφειλόμενα σε γενετικές βλάβες του *NLRP3* (CAPS, Κρυοπυρηνικά περιοδικά σύνδρομα)(13) β) νοσήματα που οφείλονται σε διαταραχές του μεταβολισμού (14–16) γ) νοσήματα που οφείλονται στο σχηματισμό κρυστάλλων ή συσσωματωμάτων (17) γ) ίνωση ως αποτέλεσμα ιστικής βλάβης ή χρόνιας φλεγμονής.(18,19)



Εικόνα 1.4 Υποδοχέας NALP3 (ή NLRP3) και απεικόνιση της ελικοειδούς δομής του φλεγμονοσώματος NLRP3. Η PYD υπομονάδα του υποδοχέα, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ASC και επιστρατεύει την κασπάση-1 ενώ παράλληλα ολιγομερίζεται παίρνοντας την τελική ελικοειδή μορφή του. [Προσαρμογή από Martinon F, Mayor A, Tschopp J., *Annu Rev Immunol.* (2009);]

1.2.2 Το AIM2 φλεγμονόσωμα

Το AIM2 φλεγμονόσωμα (Absent in Melanoma 2), είναι μέλος της οικογένειας των ALR υποδοχέων, σε αντίθεση με το NLRP3. Οι ALR υποδοχείς έχουν χαρακτηριστική δομή και αυτή αποτελείται από δύο υπομονάδες, την PYD υπομονάδα και τη HIN200 (Hematopoietic interferon-inducible nuclear protein) υπομονάδα.(**Εικ. 1.5**) Συγκριτικά με τους υπόλοιπους υποδοχείς της οικογένειας ALR, το AIM2 διαφέρει ως προς τον εντοπισμό του στο κύτταρο- απαντάται στο κυτταρόπλασμα, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους που απαντώνται στον πυρήνα- αλλά και στο γεγονός πως η PYD υπομονάδα του AIM2 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ASC. Η τελευταία αυτή διαφορά συνιστά και το λόγο για τον οποίο ο υποδοχέας του AIM2 είναι και ο μόνος της οικογένειας με τη δυνατότητα σχηματισμού φλεγμονοσώματος. (20)



Εικόνα 1.5 Μοριακή βάση για την ενεργοποίηση του AIM2 φλεγμονοσώματος. Το ενδομοριακό σύμπλοκο της HIN200 και της PYD υπομονάδας βρίσκεται σε αδρανή κατάσταση, μέχρι να δεχτεί ερέθισμα από κυτταροπλασματικό dsDNA. Ακολουθεί ο ολιγομερισμός των υποδοχέων και η αποδέσμευση της PYD από το σύμπλοκο και αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη ASC προς ενεργοποίηση της κασπάσης-1. [Προσαρμογή από Si Ming Man et al., *Eur. J. Immunol.* (2016)]

Το φλεγμονόσωμα AIM2 θεωρείται ότι παίζει εξέχων ρόλο στην επαγωγή της φλεγμονώδους αντίδρασης του οργανισμού, ιδιαίτερα στις βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις. Κατά παρόμοιο τρόπο με το NLRP3 σε κατάσταση ομοιοστασίας, οι υποδοχείς βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, όπου οι υπομονάδες PYD και HIN200 σχηματίζουν ένα ενδομοριακό σύμπλοκο. Η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος, πραγματοποιείται ύστερα από ερέθισμα προερχόμενο από dsDNA. Το μόριο dsDNA προσδένεται στη HIN200 υπομονάδα και η PYD υπομονάδα αποδεσμεύεται από το σύμπλοκο, όντας πλέον ελεύθερη να αλληλεπιδράσει με την πρωτεΐνη ASC προς σχηματισμό του φλεγμονοσώματος. Παρόλο που οι υποδοχείς του AIM2 αναγνωρίζουν βακτηριακό και ιικό DNA υπάρχει διακριτή διαφορά στον μηχανισμό με τον οποίο ενεργοποιείται το φλεγμονόσωμα σε κάθε περίπτωση. Τα ερεθίσματα βακτηριακής προέλευσης αλλά όχι ιικής, ενεργοποιούν το μονοπάτι σηματοδότησης της ιντερφερόνης τύπου 1, με αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζουν την παραγωγή της ιντερφερόνης. Το μονοπάτι αυτό, μεσολαβεί στη βακτηριακή

λύση, επελευθερώνοντας τον συνδέτη για ενεργοποίηση του AIM2.(20)

Η ενεργοποίηση του AIM2 φλεγμονοσώματος συνδέεται και αυτή με την παθογένεση αυτοάνοσων νοσημάτων (21,22), ηπατικής φλεγμονής (23,24) ενώ σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει και στον καρκίνο (παχέος εντέρου, προστάτη)(25–27). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι για τον καρκίνο του παχέος εντέρου έχει βρεθεί πως ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης AIM2 έχουν δυσχερέστερη πρόγνωση σε σχέση με ασθενείς που παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης, υποδεικνύοντας έναν πιθανό προστατευτικό ρόλο του AIM2 στην φυσική εξέλιξη της νόσου(28).

1.3 Ανοσορρυθμιστικοί μηχανισμοί στη χρόνια φλεγμονή

Παρόλο που η φλεγμονή είναι η φυσιολογική αντίδραση του οργανισμού για την καταπολέμηση και εξάλειψη των παθογόνων, ανεξέλεγκτη φλεγμονώδης αντίδραση καθώς και χρόνια φλεγμονή μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες για τον ιστό. Μάλιστα, η χρόνια φλεγμονή θεωρείται ένας από τους βασικότερους παράγοντες για καρκινογένεση και μετάσταση (29). Λογικό επακόλουθο είναι τότε, το ανοσιακό σύστημα να διαθέτει μηχανισμούς που δεν θα επάγουν μόνο τη φλεγμονή, αλλά και θα την καταστέλλουν-ρυθμίζουν αποκαθιστώντας έτσι την ιστική ομοιοστασία. Στη διαδικασία αυτή εμπλέκονται κυτταροκίνες όπως η IL-10 και ο TGF- β , οι οποίες εκκρίνονται από κύτταρα του ίδιου του φλεγμένου ιστού αλλά και από λεμφοκύτταρα και δρουν κατασταλτικά, συνεισφέροντας στην αποκατάσταση της ομοιοστασίας του ιστού, στο συντονισμό της φυσικής και ειδικής ανοσιακής απάντησης έναντι παθογόνων και στην δημιουργία ανοσιακής μνήμης. (30)

Εκτός από κυτταροκίνες, εξέχων ρόλο στη διαδικασία της ανοσορρύθμισης, παίζει και μία κατηγορία T κυττάρων, τα επονομαζόμενα ‘Ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα’ (Regulatory T cells, **Tregs**)(31). Τα Tregs, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: Τα φυσικά Tregs, ή προερχόμενα από το θύμο (nTregs ή tTregs) και τα περιφερικώς επαγόμενα Tregs (peripherally-derived Tregs, pTregs), με κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 (Forkhead box P3). Οι δύο αυτοί πληθυσμοί είναι διαφορετικής προέλευσης (παραγωγή nTregs στο θύμο αδένα, pTregs προέρχονται από ώριμα T κύτταρα της περιφέρειας) και διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης αλλά καθώς φαίνεται, δρουν συνεργατικά ή και αλληλεπικαλυπτόμενα όσον αφορά τη ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης (32). Τα ρυθμιστικά T κύτταρα αποτελούν τμήμα της περιφερικής ανοχής του ανοσιακού συστήματος, καταστέλλοντας την παραγωγή δραστικών T κλώνων και άλλων καταστροφικών ανοσιακών απαντήσεων. Παρόλο που ο ρόλος των Tregs στη ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης και καταστολή της φλεγμονής είναι φανερός, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η παρουσία μεγάλου αριθμού Tregs δεν εγγυάται καταστολή της φλεγμονής αλλά αντίθετα, φαίνεται πως υποβοηθά τη χρονιότητα της λοίμωξης (33–35). Στον αντίποδα, μειωμένη παραγωγή ρυθμιστικών T κυττάρων έχει συνδεθεί με αυτοάνοσες εκδηλώσεις

(36,37), ενώ στην περίπτωση διαταραχών στην έκφραση ή μεταλλάξεων του γονιδίου του FoxP3 (*FOXP3 gene*), ελλοχεύει ο κίνδυνος τα Tregs να χάσουν τη ρυθμιστική τους ικανότητα και μάλιστα, να αρχίσουν να εκδηλώνουν συμπεριφορά δραστικών T κυττάρων, συμβάλλοντας έτσι στην ανεξέλεγκτη φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού και πιθανή καρκινογένεση (38).

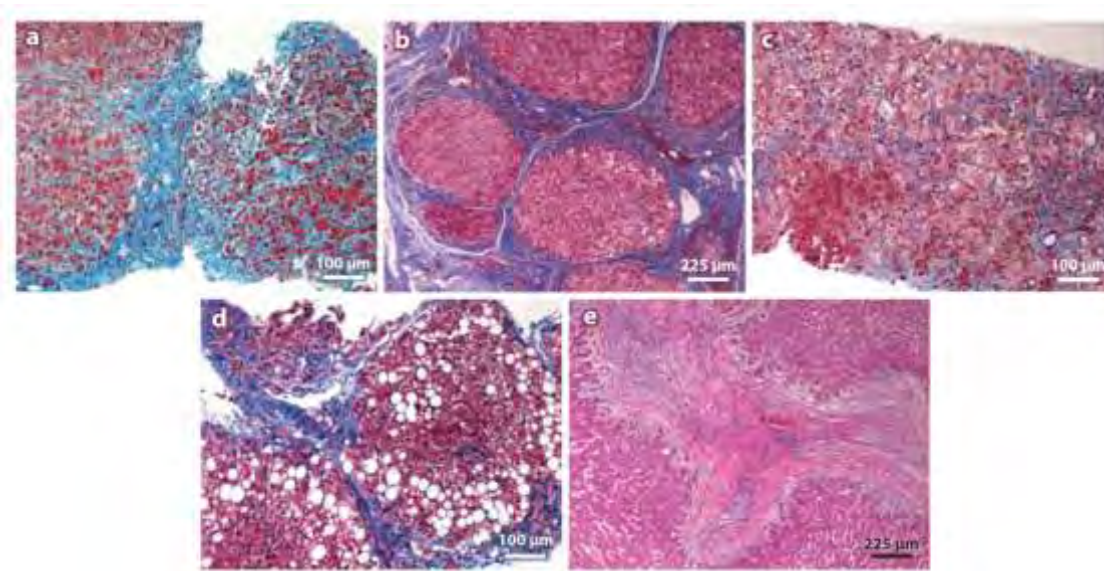
Συμπερασματικά λοιπόν, παρόλο που οι ανοσορρυθμιστικοί μηχανισμοί παίζουν καθοριστικό ρόλο στην υγιή αποκατάσταση της ιστικής βλάβης, μπορούν επίσης να συμβάλλουν εξίσου καθοριστικά και στην επιδείνωση αυτής. Επομένως, είναι επιτακτική η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα περί των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή.

2. ΗΠΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

2.1 Ηπατική ίνωση

Παρόλο που το ήπαρ δεν αποτελεί όργανο του ανοσιακού συστήματος, είναι γεγονός πως από ανοσολογικής άποψης παρουσιάζει μία ιδιαίτερη πολυπλοκότητα, αφού αποικίζεται από πληθυσμούς λεμφοκυττάρων, είναι υπεύθυνο για την παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών καθώς και πρωτεϊνών οξειάς φάσης. Μάλιστα, το ποικίλο αυτό «ανοσιακό ρεπερτόριο», μαζί με την ανατομία και τη διαρκή διέγερση του ιστού, συνιστούν ένα μικροπεριβάλλον, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ ανοχής και φλεγμονής (39).

Ως ίνωση, ορίζεται η φυσιολογική διαδικασία επούλωσης τραύματος στον πληγέντα ιστό και χαρακτηρίζεται από συσσώρευση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Extracellular Matrix, ECM), ιδιαίτερα κολλαγόνο τύπου I και III, πρωτεογλυκάνες, φιβρονεκτίνη και λαμινίνη, ύστερα από τραύμα στον ιστό (40). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ιστική βλάβη αποκαθίσταται χωρίς σοβαρές επιπτώσεις στη δομή και λειτουργία του ιστού. Αν όμως, το ιστικό τραύμα είναι εκτεταμένο ή επαναλαμβανόμενο, τότε η φλεγμονώδης αντίδραση περνά σε στάδιο χρονιότητας, οδηγώντας τελικά σε σχεδόν πλήρη αντικατάσταση του παρεγχύματος του φυσιολογικού ιστού από τον ινώδη (41). Όσον αφορά το ηπατικό παρέγχυμα, αυτό αποτελείται από διαφόρων ειδών κύτταρα (Ηπατοκύτταρα, ενδοθηλιακά, ηπατικά αστεροειδή κύτταρα, κύτταρα Kupffer), τα οποία με την πάροδο του χρόνου και σε συνθήκες εμμένουσας φλεγμονής, σταδιακά αντικαθίστανται από μεσεγχυματικά κύτταρα και ινοβλάστες. Τα τελευταία, ύστερα από αλληλεπίδραση με τα ηπατοκύτταρα, διαφοροποιούνται σε μυοϊνοβλάστες, κύτταρα υπεύθυνα για την παραγωγή κολλαγόνου και την ανεξέλεγκτη εναπόθεση συστατικών εξωκυττάριας ουσίας στον ιστό. Σε αυτή τη διαδικασία της ίνωσης, φαίνεται πως κεντρικό ρόλο παίζουν ο TGF-β καθώς και ο αυξητικός παράγοντας του συνδετικού ιστού (Connective tissue Growth Factor, CTGF) (42,43), ενώ διαφορετικά μοτίβα ίνωσης έχουν παρατηρηθεί, βάσει της προέλευσης της φλεγμονής και της περιοχής της ιστικής βλάβης (κεντρικά ή πυλαία) (**Εικ. 2.1**). Τελικό στάδιο στη διαδικασία της ίνωσης, το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή θνησιμότητα, αποτελεί η κίρρωση του ήπατος, η οποία χαρακτηρίζεται από παραμόρφωση του ηπατικού παρεγχύματος και της αρχιτεκτονικής του ιστού. Η διαδικασία επιδείνωσης της ίνωσης μέχρι το στάδιο της κίρρωσης διαρκεί συνήθως από 20 έως 40 χρόνια, ενώ ο ρυθμός επιδείνωσης ποικίλει και εξαρτάται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. (41)



Εικόνα 2.1 Φωτομικρογραφήματα διαφόρων μοτίβων ίνωσης βάσει αιτιολογίας της ηπατικής νόσου. (a) Αυτοάνοση ηπατίτιδα. Νέκρωση στα όρια πυλαίας -κεντρικής φλέβας. (b) Χρόνια ιογενής ηπατίτιδα C. Τρίχρωμη χρώση, όπου παρατηρούνται ινώδη διαφραγμάτια μεταξύ πυλαίων-κεντρικών φλεβών και ο σχηματισμός όζων. (c) Οξεία αλκοολική ηπατίτιδα. Εναπόθεση ECM γύρω από τα ηπατοκύτταρα (περικυτταρική-περικολποειδική ίνωση) και αεροσφαιροειδής εκφυλισμός των ηπατοκυττάρων. (d) Μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Τρίχρωμη χρώση, όπου φαίνεται η ευμεγέθης κενοτοπιώδης στεάτωση και περικυττάρια ίνωση. (e) Χολική κίρρωση. Ινώδη διαφραγμάτια μεταξύ πυλαίων και πολλαπλασιασμός χοληφόρων αγωγών. [Προσαρμογή από Hernandez-gea V, Friedman SL. *Annu Rev. 2011*]

2.2 Χρόνια ιογενής ηπατίτιδα C

Ο ιός της ηπατίτιδας C είναι ένας RNA ιός της οικογένειας *Flaviviridae*. Σαν ιός παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια, καθώς παγκοσμίως έχουν καταγραφεί επτά γονότυποι του (επονομαζόμενοι, 1-7), ενώ κάθε γονότυπος περιλαμβάνει επιπλέον υποτύπους, οι οποίοι περιγράφονται με μικρά γράμματα (π.χ 1a, 1b, 1c κ.ο.κ). Η λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C μπορεί να οδηγήσει σε οξεία ηπατίτιδα C, ενώ σε ποσοστό 50-80% των ασθενών, η λοίμωξη περνά σε κατάσταση χρονιότητας (44). Όσον αφορά την επιδημιολογία της λοίμωξης και σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας, (45) υπολογίζεται ότι περίπου 71,000,000 άνθρωποι παγκοσμίως πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα C, ενώ 399,000 άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο από τη λοίμωξη. Η μετάδοση του ιού γίνεται συνήθως λόγω χρήσης μη-στείρας βελόνας κατά τη χορήγηση ενδοφλέβιων φαρμάκων/ναρκωτικών ουσιών, από μολυσμένη μητέρα στο έμβryo ή ,σπανιότερα, μεταδίδεται σεξουαλικά (με εξαίρεση τη μετάδοση σε οροθετικούς άνδρες, οι οποίοι έχουν σεξουαλικές σχέσεις με άνδρες, όπου η μετάδοση ευνοείται.)(45)

Η χρόνια ηπατίτιδα C συχνά οδηγεί σε ηπατική ίνωση, ενώ μπορεί να οδηγήσει και σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Hepatocellular Carcinoma, HCC). Ο βαθμός της επιδείνωσης εξαρτάται από τον χρόνο που έχει παρέλθει από την αρχική λοίμωξη και την ηλικία του ασθενή

κατά τη χρονική στιγμή της λοίμωξης (44). Εκτός από τις επιπτώσεις που έχει η λοίμωξη στον ηπατικό ιστό, ο ιός της ηπατίτιδας C, έχει συνδεθεί και με άλλες εκδηλώσεις. Για παράδειγμα, ασθενείς με ΧΗC, φαίνεται πως είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν κρυσφαιριναιμία και λέμφωμα Non-Hodgkin (46), ενώ παρουσιάζουν και αυξημένη πιθανότητα για ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη και εκδήλωση σακχαρώδους διαβήτη, αυξάνοντας έτσι τη θνησιμότητα λόγω καρδιαγγειακών νοσημάτων (47). Εμβόλιο για τον ιό HCV δεν υπάρχει, μέχρι σήμερα. Όσον αφορά τις θεραπευτικές προσεγγίσεις για την ΧΗC, αρχικά αυτές βασίζονταν κυρίως στη χορήγηση ιντερφερόνης (IFN-based therapies), ενώ τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται φαρμακευτικές αγωγές με άμεση αντιϊκή δράση (Direct-Activity Antiviral treatment, DAA) (44).

Αναφορικά με την ανοσιακή απάντηση του ξενιστή έναντι στη λοίμωξη από τον ιό HCV, ενεργοποιούνται μηχανισμοί τόσο φυσικής όσο και επίκτητης ανοσίας. Από την πλευρά της φυσικής ανοσίας, τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (Natural Killer cells, NK), φαίνεται πως διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ιϊκή κάθαρση, μέσω κάποιων γονιδίων που κωδικοποιούν τον υποδοχέα κυτταροτοξικών ψευδο-ανοσοσφαιρινών (Killer cell immunoglobulin-like receptor), 2DL3 (48). Χυμικές και Τ κυτταρικές απαντήσεις, παρατηρούνται από την σκοπιά της ειδικής ανοσίας γενικά σε όλες τις λοιμώξεις από ιούς, παρ' όλα αυτά στη λοίμωξη από HCV δε φαίνεται τα αντισώματα να παίζουν κάποιο καθοριστικό ρόλο στην ιϊκή κάθαρση, αν και μπορεί να παίζουν κάποιο προστατευτικό ρόλο στην ευρύτερη αλληλεπίδραση του οργανισμού του ξενιστή από τον ιό (49). Στον αντίποδα, οι Τ κυτταρικές απαντήσεις φαίνεται να έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην καταπολέμηση της λοίμωξης, με επιστράτευση δραστικών CD4+ και CD8+ κυττάρων κατά το στάδιο της οξείας φλεγμονής, ενώ σε συνθήκες χρόνιας φλεγμονής φαίνεται οι πληθυσμοί αυτοί να μειώνονται σε αριθμό και συχνότητα απάντησης (50).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως και ο ίδιος ο ιός έχει εξελιχθεί με τρόπο τέτοιο ώστε να διαφεύγει την ανοσιακή απάντηση. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η χρήση της πρωτεΐνης NS3/4A του ιού, η οποία απενεργοποιεί δύο μονοπάτια σηματοδότησης στον οργανισμό του ξενιστή, τα οποία ενεργοποιούνται από τα PAMPs του HCV και ενεργοποιούν το μονοπάτι της ιντερφερόνης. Παρόλο που τα γονίδια, η έκφραση των οποίων διεγείρεται από ιντερφερόνη στη λοίμωξη, συνεχίζουν να εκφράζονται, η αντίδραση αυτή δεν είναι αρκετή για την ιϊκή κάθαρση. (44)

Το μεγαλύτερο πρόβλημα που προκαλεί η λοίμωξη με HCV είναι η δημιουργία ινώδους ιστού, καθώς είναι το βασικό αίτιο για την επιδείνωση σε ηπατική ίνωση/κίρρωση και HCC. Στη διαδικασία της ίνωσης, η τοπική φλεγμονή παίζει καθοριστικό ρόλο, ενώ η χρόνια ηπατίτιδα C, χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή, ως αποτέλεσμα οξειδωτικού στρες και ανοσιακής απάντησης έναντι των μολυσμένων ηπατοκυττάρων που εκφράζουν ιϊκές επιτόπους (44). Στη

χρόνια ηπατική φλεγμονή, ο ίδιος ο ιός μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα και με αυτό τον τρόπο να επιταχύνει τη διαδικασία της ίνωσης. Επιπρόσθετα, ρόλο φαίνεται να παίζουν και τα βοηθητικά T2 κύτταρα (T_H2), τα οποία μαζί με αυξητικούς παράγοντες, χημειοκίνες και κυτταροκίνες που παράγονται στα μολυσμένα ηπατοκύτταρα, επιστρατεύουν κύτταρα του ανοσιακού συστήματος, υποβοηθούν την επιμονή της ανοσιακής απάντησης και την ενεργοποίηση των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων σε μυοϊνοβλάστες, τα κύτταρα που όπως αναφέρθηκε παραπάνω, (§2.1) είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία ινώδους ιστού (51).

2.3 HIV λοίμωξη

Ο ιός HIV και το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας που προκαλεί (AIDS), αποτελεί μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις για τη δημόσια υγεία, ιδιαίτερα σε χώρες με χαμηλή ποιότητα ζωής. Παρόλη την πρόοδο που έχει σημειωθεί στην αντιμετώπιση της λοίμωξης, χάρη στις υψηλής δράσης αντιρετροϊκές θεραπείες (Highly-Active Antiretroviral therapy, HAART) σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας, το 2017 καταγράφηκαν 36.9 εκατομμύρια πάσχοντες από λοίμωξη από HIV (52). Αν και η επιτυχία της HAART έχει ως αποτέλεσμα την παράταση ζωής των φορέων του ιού, η λοίμωξη καθιστά τους φορείς ευάλωτους σε μη σχετιζόμενα με τον HIV νοσήματα, τα οποία όμως ευθύνονται για μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ των ασθενών. Ανάμεσα στα νοσήματα αυτά, σημαντικό ποσοστό αφορά νοσήματα του ήπατος. Λεπτομερέστερα, συχνά παρατηρείται συλλοίμωξη του HIV με ιούς της ηπατίτιδας B (5%-25%) (53,54) και της ηπατίτιδας C (30%) (54,55). Επιπλέον, φαίνεται πως ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με HIV (30%-40%), αναπτύσσουν μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (NAFLD) (54,56). Συνολικά, η ηπατική νόσος φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τη θνησιμότητα 13%-18% των ασθενών με προϋπάρχουσα λοίμωξη από HIV (54).

Το βασικό πλήγμα που υποφέρει ο ξενιστής λόγω του ιού, είναι η σταδιακή απώλεια δραστικών $CD4+$ κυττάρων, με μειωμένη παραγωγή τους αλλά και αυξημένη καταστροφή τους. Ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό είναι αφ' ενός, με απευθείας είσοδο του ιού στο κύτταρο, ύστερα από αλληλεπίδραση με το $CD4$ και υποδοχείς χημειοκινών CCR5, CXCR4 και αφ' ετέρου με παράλληλα συμβάντα όπως υπέρμετρη ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος, πολλαπλασιασμός και γήρανση των κυττάρων (57). Εκτός από δραστικά $CD4+$ T κύτταρα, ο ιός μπορεί να προσβάλλει και ανενεργά $CD4+$ κύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα (57).

Κατά τα πρώιμα στάδια της λοίμωξης, παρατηρείται μείωση στα $CD4+$ T κύτταρα της περιφέρειας. Το συμβάν αυτό, ακολουθείται από μία ανάκαμψη των επιπέδων των T κυττάρων

σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, που όμως ύστερα συνεχίζουν να μειώνονται κατά περίπου 50-100 κύτταρα/μL. Ένα αρκετά κομβικό σημείο στην επίδραση που έχει ο ιός στην ομοιοστασία των T-κυττάρων, συμβαίνει επίσης στα πρώιμα στάδια της λοίμωξης στο γαστρεντερικό σύστημα, όπου παρατηρείται μαζική απώλεια ενεργοποιημένων CD4+ κυττάρων, με ελάχιστη αποκατάστασή τους ύστερα από ART (57,58), καθώς και απώλεια βοηθητικών T κυττάρων (T_h17) (59) και T κυττάρων των βλεννογόνων τα οποία είναι σημαντικά για την άμυνα του οργανισμού έναντι βακτηρίων (60). Επίσης, η καταστροφή του δικτύου ινοβλαστών, η εναπόθεση κολλαγόνου στους ιστούς και η περιορισμένη πρόσβαση των T κυττάρων στην ιντερλευκίνη 7 (IL-7) στους λεμφικούς ιστούς (παράγοντα που βοηθά στην επιβίωση τους), συμβάλλουν στην προοδευτική απώλεια ώριμων, τόσο CD4+, όσο και CD8+ κυττάρων (57,61).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα ηπατικά νοσήματα αποτελούν συχνή αιτία θνησιμότητας όταν προϋπάρχει HIV λοίμωξη. Στους ασθενείς αυτούς, η χρόνια ηπατική φλεγμονή μπορεί να οφείλεται σε ιογενείς παράγοντες (HBV, HCV), σε μη-αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος ή σε τοξικότητα λόγω χορήγησης HAART, ή ακόμα και λόγω απευθείας δράση του HIV στον ηπατικό ιστό (57). Οι μηχανισμοί ηπατικής ίνωσης που ενεργοποιούνται δεν ακολουθούν καποιο σταθερό μοτίβο, αλλά εξαρτώνται από το αίτιο που προκαλεί τη φλεγμονή και τη λειτουργία του ανοσιακού συστήματος του ασθενή. Παρόλ'αυτά, οι βασικοί μηχανισμοί ηπατικής ινογένεσης λόγω HIV περιλαμβάνουν το οξειδωτικό στρες, βλάβες στα μιτοχόνδρια, λιποτοξικότητα, κυτταροτοξικότητα, τραύματα μεσολαβούμενα από το ανοσιακό σύστημα (54).

Στην περίπτωση των ιογενών λοιμώξεων, κύριος μηχανισμός ηπατικού τραύματος και φλεγμονής, είναι αυτός που μεσολαβείται από το ανοσιακό σύστημα. Η πλειοψηφεία των κυττάρων στο ήπαρ αποτελείται από τα κύτταρα Kupffer (KCs) και τα ηπατικά αστεροειδή (HSCs). Ο ρόλος των KCs είναι η ενεργοποίηση των μηχανισμών για την επαγωγή τοπικής φλεγμονής και για επιδιόρθωση των ηπατοκυττάρων, ενώ τα HSCs αποτελούν κινητήριο μοχλό για τη διαδικασία της ινογένεσης και εναπόθεσης πρωτεϊνών ECM προς επιδιόρθωση του ιστού. Σε περίπτωση ανισόρροπης δράσης αυτών των μηχανισμών, το αποτέλεσμα είναι κυτταρικός θάνατος των κυττάρων του ιστού και ανεξέλεγκτη ινογένεση (54). Στην περίπτωση του HIV, ο ιός αντιδρά με τα HSCs, μέσω της πρωτεΐνης gp120 (62) προκαλώντας αυξημένη ενεργοποίηση των HSCs, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου και πρωτεΐνης MCP-1 (Monocyte-chemoattractant protein-1) (63). Ο ιός επίσης, προκαλεί μείωση του αριθμού των KCs στο ήπαρ και με τον τρόπο αυτό, αποδυναμώνει την ικανότητά του να αντιμετωπίζει μικρόβια που μεταφέρονται μέσω της πυλαίας φλέβας (63). Επίσης, ανισορροπία στη δράση των CD4+, CD8+ κυττάρων που προκαλούνται λόγω του ιού, μπορεί να οδηγήσει στην μεταβολή του προφίλ έκφρασης των κυτταροκινών του μικροπεριβάλλοντος του ιστού,

ιδιαίτερα στη μείωση κυτταροκινών που καταστέλλουν την ινογένεση(μεσολαβούμενη από μείωση έκφρασης IFN- γ από T_h1) και την αύξηση κυτταροκινών που την επάγουν (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13), λόγω μίας σχετικής αύξησης στη δράση των T_h2 (64).

2.4 Συλλοίμωξη HIV/HCV

Η συλλοίμωξη HIV/HCV αποτελεί συχνό φαινόμενο, κυρίως λόγω του ότι και οι δύο ιοί έχουν κοινούς τρόπους μετάδοσης (παρεντερικά, σεξουαλικά μεταδιδόμενα, από μητέρα σε έμβρυο). Σε μία πρόσφατη μετα-ανάλυση από τους Platt et al. (65), αναφέρονται 2,278,400 περιπτώσεις συλλοίμωξης παγκοσμίως. Παρόλο που οι μηχανισμοί που λαμβάνουν χώρα κατά τη συλλοίμωξη δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί, μεγάλος αριθμός μελετών υποδεικνύει πως λοίμωξη με HIV επιβαρύνει το βαθμό της χρόνιας ηπατικής φλεγμονής και ίνωσης σε ασθενείς με XHC (66), ακόμη και σε περιπτώσεις που ο πολλαπλασιασμός του HIV βρίσκεται υπό έλεγχο λόγω χορήγησης ART (67). Επίσης φαίνεται πως ο HIV επηρεάζει τη φυσική εξέλιξη της χρόνιας ηπατικής φλεγμονής από HCV, με μηχανισμούς ανεξάρτητους της επίδρασης που έχει στην T-μεσολαβούμενη κυτταρική απάντηση (68).

Αν και, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι μηχανισμοί που λαμβάνουν χώρα κατά τη συλλοίμωξη δεν έχουν ακόμα διαλευκανθεί πλήρως, υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που έχει βρεθεί πως συμβάλλουν στην εξέλιξη της νόσου. Πέρα από την επίδραση του HIV στην πορεία της XHC, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου ηπατική βλάβη έχει παρατηρηθεί και σε συνθήκες λοίμωξης μόνο με HIV (69,70). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα ηπατοκύτταρα εκφράζουν υποδοχείς όπως οι CCR5, CXCR4, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με την gp120 πρωτεΐνη του ιού HIV, επάγοντας την ενεργοποίηση μονοπατιών σηματοδότησης στα κύτταρα του ιστού. Οι υποδοχείς αυτοί φαίνεται πως παίζουν εξέχων ρόλο και σε συνθήκες συλλοίμωξης με HCV. Σε *in vitro* μοντέλα, η gp120 αλλά και ανενεργή μορφή του ιού HIV, φαίνεται πως υποβοηθούν τον πολλαπλασιασμό του ιού HCV και την αύξηση της έκφρασης του TGF- β 1 (κυτταροκίνη που εμπλέκεται στην ινογένεση). Το φαινόμενο αυτό, παρεμποδίζεται από αντισώματα για τους CCR5, CXCR4, υποδεικνύοντας πως δέσμευση του HIV στους υποδοχείς αυτούς, είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του HCV (71).

Η γενικότερη απορρύθμιση που προκαλεί ο HIV στο ανοσιακό σύστημα και στο δίκτυο των κυτταροκινών είναι ένας ακόμη λόγος που μπορεί να συμβάλλει στη δυσμενή εξέλιξη της ηπατικής νόσου στη συλλοίμωξη HIV/HCV. Αυτό είναι λογικό, αφού η ειδική ανοσία παίζει θεμελιώδη ρόλο στην εξάλειψη του HCV και επομένως, συλλοίμωξη από έναν ιό που επηρεάζει πρωτίστως τα T κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα την επιμονή του HCV (72). Επίσης, η ανισορροπία που προκαλεί ο HIV στα T κύτταρα μπορεί να ευθύνεται για την απορρύθμιση του δικτύου κυτταροκινών στην περιφέρεια και στον ηπατικό ιστό. Αναφορικά

σε αυτό, οι Gressner et al., παρατήρησαν σημαντική αύξηση στην έκφραση του TGF-β στον ηπατικό ιστό και ορό ασθενών με συλλοίμωξη HIV/HCV, καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως ο HIV υποβοηθά την HCV-σχετιζόμενη έκφραση του TGF-β από ηπατοκύτταρα, επάγοντας έτσι την ινογένεση (73). Επιπλέον, απορρύθμιση του μονοπατιού της IL-1β, κυτταροκίνης που παίζει εξέχων ρόλο στη φλεγμονώδη αντίδραση μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στον επίμονο πολλαπλασιασμό HSCs, την παραγωγή μεσολαβητών της ίνωσης και στη γενικότερη παθολογία του ιστού (74, §1.2).

| ΔΕΙΚΤΕΣ | HIV | HCV | HIV/HCV |
|---------------------------------|------------|------------|----------------|
| <u>Κύτταρα ΑΣ</u> | | | |
| <i>NK</i> | ↓ | ↓ | ↓↓ |
| <i>DC</i> | ↓↓ | ↓ | ↓↓↓ |
| <i>CD4+ T κύτταρα</i> | ↓↓ | ↓ | ↓↓↓ |
| <i>KCs</i> | + | ++ | +++ |
| <u>Κυτταροκίνες-Χημειοκίνες</u> | | | |
| <i>IP-10</i> | ++ | ++ | ++++ |
| <i>IL-1β</i> | + | + | ++ |
| <i>IFN-γ</i> | ↓ | ↓ | ↓ |
| <i>TGF-β</i> | + | ++ | +++ |
| <i>TNF-α</i> | ++ | + | +++ |
| <i>MIP-1α</i> | ↓↓↓ | ↓↓ | ↓↓ |
| <i>MIP-1β</i> | ↓↓↓ | ↓ | ↓↓ |
| <i>RANTES</i> | +++ | + | ++ |
| <u>Μεσολαβητές ίνωσης</u> | | | |
| <i>MMPS</i> | ++ | ++ | +++ |
| <i>TIMPS</i> | ++ | ++ | +++ |
| <i>HA</i> | + | ++ | +++ |
| <u>Απόπτωση και ROS</u> | | | |
| <i>TRAIL/FAS</i> | ++ | ++ | ++++ |
| <i>ROS</i> | ++ | ++ | +++ |
| <u>Μεταβολικές παράμετροι</u> | | | |
| <i>Αντοχή στην ινσουλίνη</i> | ++ | + | +++ |
| <i>Αδιπονεκτίνη</i> | ↓ | ↓↓ | ↓↓↓ |
| <i>Ρεζιστίνη</i> | + | ++ | +++ |
| <i>Λεπτίνη</i> | + | ++ | +++ |

Πίνακας 2. Παράγοντες συσχέτισης του βαθμού της ίνωσης στην HIV, HCV, HIV/HCV λοιμώξεις. ↓;μείωση, ↓↓;μέτρια μείωση, ↓↓↓;σημαντική μείωση. +;αύξηση, ++;μέτρια αύξηση, +++;σημαντική αύξηση. *NK*;Φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα, *DCs*;Δενδριτικά κύτταρα, *KCs*;Κύτταρα Kupffer, *IP-10*;Πρωτεΐνη επαγόμενη από ιντερφερόνη-γ-10, *IL-1β*;Ιντερλευκίνη 1-β, *IFN-γ*;Ιντερφερόνη-γ, *MIP-1α, -1β*;φλεγμονώδης πρωτεΐνη επαγόμενη από μακροφάγα-1α -1β, *RANTES*;Ρυθμιζόμενο στην ενεργοποίηση φυσιολογικό T κύτταρο, εκφραζόμενο και εκκρινόμενο, *MMPS*;Μεταλλοπρωτεϊνάσες εξωκυττάριου χώρου, *TIMPS*;Ιιστικοί αναστολείς δράσης μεταλλοπρωτεϊνάσων, *HA*;Υαλουρονικό οξύ, *TRAIL/FAS*;Tumour Necrosis Factor-related

3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Οι χρόνιας ιογενείς ηπατίτιδες Β και C, είναι λοιμώδη νοσήματα τα οποία χαρακτηρίζονται από χρόνια φλεγμονή και βλάβη του ηπατικού ιστού. Σε πολλές περιπτώσεις η χρόνια φλεγμονή συνοδεύεται από προοδευτική ίνωση και σε αρκετές περιπτώσεις κίρρωση του ήπατος και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Ιδιαίτερα για την χρόνια ηπατίτιδα C, συχνή είναι η συλλοίμωξη με τον ιό HIV. Η συλλοίμωξη HIV-HCV αποτελεί σημαντική πρόκληση για τη δημόσια υγεία, κυρίως λόγω αλληλεπικάλυψης των τρόπων μετάδοσης και των πληθυσμών που πλήττονται. Αν και από κλινικά δεδομένα φαίνεται πως η συλλοίμωξη με HIV επιβαρύνει την εξέλιξη της CHC, οι μοριακοί μηχανισμοί που συνοδεύουν τη διαδικασία αυτή δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως.

Δεδομένα από μελέτη του Εργαστηρίου μας σε ασθενείς με CHB, CHC αλλά και άλλα μοντέλα χρόνιας ηπατικής φλεγμονής, έχουν δείξει πως ανεξάρτητα από το αίτιο, η χρόνια ηπατική φλεγμονή συνοδεύεται από ένα κοινό μοτίβο γονιδιακής έκφρασης το οποίο συσχετίζεται με το βαθμό της φλεγμονής. Το μοτίβο αυτό περιλαμβάνει την έκφραση των γονιδίων *FOXP3*, *FAS*, *FASL*, *TRAIL*, *PD1*, *PDL1* (33,75). Ιδιαίτερα για την περίπτωση των CHB, CHC, εκτός από τα παραπάνω, έχει παρατηρηθεί από πολλές ομάδες η αυξημένη έκφραση του *NLRP3* καθώς και της κυτταροκίνης *IL-1β* και *IL18* (76,77). Πρόσφατη μελέτη έδειξε, μάλιστα, πως τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *IL1B* παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση με το βαθμό της φλεγμονής ($p=0.016$) σε ασθενείς με CHB αλλά όχι σε ασθενείς με CHC. Έτσι, φαίνεται πως η *IL-1β* να παίζει καθοριστικό ρόλο στη φλεγμονώδη αντίδραση κατά την HBV λοίμωξη, αλλά όχι στην εξέλιξη της ίνωσης, υποδεικνύοντας πως το φαινόμενο της ίνωσης είναι πολυπαραγοντικό και υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί που χρειάζεται να διαλευκανθούν (19).

Το φλεγμονόσωμα *NLRP3* και η *IL1β*, αλλά και η *IL18* φαίνεται πως ίσως παίζουν κάποιο ρόλο και στην, σχετιζόμενη με HIV ηπατική φλεγμονή, καθώς *in vitro* μελέτες δείχνουν πως ο ιός προκαλεί ενεργοποίηση της *IL-1β* μέσω ενεργοποίησης του *NLRP3* (78) και μελέτες σε ορό δείχνουν συστηματική αύξηση των επιπέδων της *IL-18* (79). Επιπρόσθετα, μόρια σχετιζόμενα με την ανοσορρύθμιση, όπως τα *PD-1/PD-L1*, φαίνεται πως σχετίζονται με την επιμονή της HIV λοίμωξης και την εξάντληση των T κυττάρων (80).

Δεδομένων όλων των παραπάνω, η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε έχοντας σκοπό τη διερεύνηση των μηχανισμών φλεγμονής και ανοσορρύθμισης, αυτή τη φορά στο μοντέλο της συλλοίμωξης HIV-HCV, καθώς τα περισσότερα συμπεράσματα, μέχρι στιγμής αφορούν αφορούν *in vitro* μελέτες, ενώ δεδομένα από *ex vivo* μελέτες δεν υπάρχουν. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε

η ηπατική φλεγμονή που συνοδεύει ομάδες ασθενών με λοίμωξη HIV, HCV και συλλοίμωξη HIV-HCV, αναζητώντας μοτίβα γονιδιακής έκφρασης, ανάλογα (ή μη) με όσα περιγράφει η βιβλιογραφία για τις ιογενείς ηπατίτιδες. Κύριος στόχος ήταν η διερεύνηση του ρόλου του φλεγμονοσώματος NLRP3 και της IL-1β στην περίπτωση της συλλοίμωξης, αλλά και ο πιθανός ρόλος άλλων φλεγμονοσωμάτων (AIM2) και φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-18) που πιθανώς να σχετίζονται με την ταχύτερη εξέλιξη της ηπατικής ίνωσης που παρατηρείται στους ασθενείς με συλλοίμωξη HIV-HCV. Επίσης, μελετήθηκε η σχέση της γονιδιακής έκφρασης, με το αίτιο και τον βαθμό της φλεγμονής. Τέλος, μελετήθηκαν οι μοριακοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την σοβαρή φλεγμονή και ίνωση (*SMAD7*) και ανοσορρύθμιση (*FOXP3*, *PD1*, *PDL1*).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Το πρωτόκολλο της παρούσας μελέτης, σχεδιάστηκε, λαμβάνοντας υπόψιν τη διακήρυξη του Ελσίνκι. Επιπλέον, έλαβε των επιτροπών δεοντολογίας των πανεπιστημίων Θεσσαλίας και Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, ενώ όλοι οι συμμετέχοντες παρείχαν την ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους.

1.1 Ασθενείς με HIV, HCV λοιμώξεις

Για τις ανάγκες της έρευνας, μελετήθηκαν βιοψίες ήπατος από 22 ασθενείς με χρόνια ηπατικά νοσήματα σχετιζόμενα με ιογενείς λοιμώξεις. Πιο συγκεκριμένα, ελήφθησαν 5 βιοψίες από ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (ΧΗC), 4 βιοψίες από ασθενείς με HIV λοίμωξη και τρανσαμινασαιμία και 13 βιοψίες από ασθενείς με συλλοίμωξη HIV/HCV.

Για όλους τους ασθενείς, πραγματοποιήθηκε πλήρης κλινικο-εργαστηριακός έλεγχος. Τα δημογραφικά, ιστοπαθολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών αναγράφονται αναλυτικά στον **Πίνακα 1.1**. Για τον προσδιορισμό του ιϊκού φορτίου του HCV RNA, χρησιμοποιήθηκε το πακέτο δοκιμασιών COBAS Amplicor (Roche Molecular Systems, NJ, USA).

Κατά την ιστοπαθολογική εξέταση, προσδιορίστηκαν ο βαθμός της ενεργού δραστηριότητας της φλεγμονής, ο βαθμός της ίνωσης σύμφωνα με την τροποποιημένη κλίμακα HAI, ενώ σύμφωνα με το βαθμό HAI, οι ασθενείς κατανεμήθηκαν στις ακόλουθες κατηγορίες

I-0: Απουσία φλεγμονής

I-1: Μικρός βαθμός φλεγμονής (βαθμός HAI, 1-4)

I-2: Ήπιος βαθμός φλεγμονής (βαθμός HAI, 5-8)

I-3: Μέτριος βαθμός φλεγμονής (βαθμός HAI, 9-12)

I-4: Σοβαρός βαθμός φλεγμονής (βαθμός HAI, 13-18)

| | HIV | HIV/HCV | HCV |
|-----------------------------------------------------------|--------------|----------------|------------|
| <i>Αρ. δειγμάτων</i> | 4 | 13 | 5 |
| <i>Φύλο (Α/Θ)^α</i> | 4/0 | 11/2 | 3/2 |
| <i>Ηλικία (δτ^β, εύρος)</i> | 40, 29-60 | 40, 31-76 | 43, 40-54 |
| <i>AST^γ (U/μL) (δτ^β, εύρος)</i> | 49.5, 38-76 | 32, 16-108 | 53, 37-65 |
| <i>ALT^δ (U/μL) (δτ^β, εύρος)</i> | 78.5, 51-188 | 30, 9-178 | 72, 57-143 |
| <i>Βαθμός φλεγμονής</i> | | | |
| <i>I-0</i> | - | - | - |
| <i>I-1</i> | - | 3 | 1 |
| <i>I-2</i> | - | 7 | 1 |
| <i>I-3</i> | - | 3 | 3 |
| <i>I-4</i> | - | - | - |
| <i>Τνωση (δτ^β, εύρος)</i> | - | 2, 0-4 | 3, 1-4 |
| <i>Βαθμός HAI (δτ^β, εύρος)</i> | - | 5, 2-9 | 10, 2-12 |

Πίνακας 1. 1 Κλινικά, ιστοπαθολογικά, βιοχημικά δεδομένα ασθενών με χρόνια ηπατική φλεγμονή. ^α Α/Θ, Άρρενες και Θήλειες. ^β δτ, διάμεση τιμή. ^γAST, ασπαρτική Τρανσαμινάση. ^δALT, αλανινική τρανσαμινάση

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

2.1 Απομόνωση ολικού RNA

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τον ηπατικό ιστό, χρησιμοποιήθηκε μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, TRIzol, ακολουθώντας το πρωτόκολλο εργασίας που προτείνει η παρασκευάστρια εταιρία. Το διάλυμα, προσφέρει το πλεονέκτημα λύσης των κυτταρικών μεμβρανών και των οργανιδίων των κυττάρων, διατηρώντας όμως ακέραιο το RNA καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Η εκχύλιση του RNA πραγματοποιήθηκε ύστερα από την προσθήκη χλωροφορμίου στο διάλυμα φαινόλης και φυγοκέντρησης του μίγματος, με σκοπό τη δημιουργία διαλύματος δύο μη-αναμιγνυόμενων φάσεων (φαινόλη-υδατική φάση/χλωροφόρμιο-οργανική φάση). Το ολικό RNA βρισκόταν διαλυμένο στην υδατική φάση, απ' όπου και εκχυλίστηκε, με τη χρήση ισοπροπανόλης και αιθανόλης. Η αναλυτική πειραματική διαδικασία για την απομόνωση του ολικού RNA περιγράφεται παρακάτω.

Με το πέρας της λήψης ηπατικού ιστού με βιοψία δια βελόνης, τα δείγματα που συλλέχθηκαν αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι περαιτέρω κατεργασίας τους. Κατόπιν απόψυξής τους, τοποθετήθηκαν απευθείας στο διάλυμα TRIsure και από εκεί μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα τρεβλία, όπου και ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση, επίσης, αποστειρωμένων νηστερίων. Το ομογενοποίημα περάστηκε από σύριγγα 21G, 5 φορές, αφέθηκε προς επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature, RT) και έπειτα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στους 4°C (12000 rcf, microcentrifuge 5417R, Eppendorf, Cat. 0023733). Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο φυγοκέντρησης (1.5 mL, Eppendorf), ελεύθερο RNασών στο οποί προστέθηκαν 100 μL χλωροφορμίου. Έπειτα από ανακίνηση του φιαλιδίου και επώαση σε RT για 8 min, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε συνθήκες όμοιες με αυτές που αμαφέρθηκαν παραπάνω. Η φυγοκέντρηση αυτή είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός διαλύματος δύο μη-αναμιγνυόμενων φάσεων, μίας υδατικής (φαινόλη) και μίας οργανικής (χλωροφόρμιο). Η προς απομόνωση ποσότητα RNA βρισκόταν διαλυμένη στην υδατική φάση, επομένως η τελευταία μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο στο οποίο προστέθηκαν 500 μL ισοπροπανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (12000 rcf, 8 min, 20°C), αφού είχε προηγηθεί ανακίνηση των φιαλιδίων για 10 s και επώασή των, για 5 min σε RT. Ύστερα από απομάκρυνση του υπερκείμενου, το σχηματισθέν ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 μL αιθανόλης, 75%, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (7600 rcf, 8 min, 4°C) και έπειτα από απομάκρυνση του υπερκείμενου, αφέθηκαν ανοιχτά σε RT, προς εξάτμιση της εναπομείνουσας ποσότητας αιθανόλης. Τέλος, το ολικό RNA διαλύθηκε σε 40 μL νερού, ελεύθερο RNασών και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C .

Την απομόνωση ακολούθησε η φωτομέτρηση των δειγμάτων ολικού RNA με σκοπό τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και εκτίμηση της καθαρότητας των διαλυμάτων. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο NanoDropTM (Thermo ScientificTM) και η συγκέντρωση υπολογίστηκε αυτόματα από το όργανο βάσει του νόμου Beer-Lambert, όπως αυτός περιγράφεται από την εξίσωση:

$$A = \epsilon \times c \times l$$

Όπου A είναι η μετρηθήσα απορρόφηση της UV ακτινοβολίας από το διάλυμα, ϵ είναι ο συντελεστής απορρόφησης, μέγεθος χαρακτηριστικό για κάθε ουσία σε δεδομένο μήκος κύματος, c είναι η προς προσδιορισμό συγκέντρωση του διαλύματος και l η απόσταση που διανύει η ακτινοβολία από το σημείο εισόδου της μέχρι το σημείο εξόδου. Για την εκτίμηση της καθαρότητας, το όργανο μετράει την απορρόφηση του διαλύματος σε δύο μήκη κύματος. Στα 260 nm, μήκος κύματος χαρακτηριστικό για την απορρόφηση των νουκλεϊκών οξέων και στα 280 nm χαρακτηριστικό μήκος κύματος για τις πρωτεΐνες. Η καθαρότητα υπολογίζεται από τον λόγο A_{260}/A_{280} με το καθαρό RNA να έχει λόγο 2. Παρόλ' αυτά, λόγοι εύρους 1.6-2 θεωρείται πως χαρακτηρίζουν ένα αρκετά καθαρό διάλυμα RNA.

Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε νερό ελεύθερο RNAσών και ακολούθως, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των δειγμάτων RNA σε ng/ μ L. Προκειμένου να επαληθευτεί η ποιότητα και η ποσότητα των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση 2.5 μ L σε πηκτή αγαρόζης, περιεκτικότητας 1.5 % w/v, με προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, σε συσκευή ηλεκτροφόρησης Wide Mini Subcell GT System and PowerPac Basic power supply (BioRad, Cat 164-0301).

Καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, όλοι οι χώροι και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως καθαριστεί με διάλυμα καθαρισμού RNaseZap, ενώ με το τέλος της, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C .

2.2 Ανάστροφη μεταγραφή-Σύνθεση cDNA

Προκειμένου να συντεθεί DNA συμπληρωματικό με το RNA των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ανάστροφης μεταγραφής (RT-PCR). Ο σκοπός αυτός επιτεύχθηκε με τη χρήση του πακέτου ανάστροφης μεταγραφάσης M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) το οποίο περιλάμβανε τα αντιδραστήρια M-MLV RT, 5xFS Buffer και 0.1 DTT. Εκτός αυτών, χρησιμοποιήθηκαν: διάλυμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), συγκέντρωσης 10 mM (dGTP, dATP, dCTP, dTTP), αναστολέας RNασών (RNasin), ενώ ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν τυχαία εξαμερή (random hexamers), συγκέντρωσης 50 pmol/μL. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται αναλυτικά στον **Πίνακα 2.1**.

Το μίγμα της αντίδρασης παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρίας, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 2.2**.

Σε αποστειρωμένα φιαλίδια PCR των 0.2 mL, προστέθηκε, ανάλογα με την συγκέντρωση του κάθε δείγματος, ποσότητα τόσο, ώστε να περιέχεται σε αυτή 1 μg RNA. Σε αυτή προστέθηκαν 4 μL εκκινητών και το μίγμα συμπληρώθηκε με νερό, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 14 μL. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν στη συσκευή PCR στους 72⁰C για 2 λεπτά προς αποδιάταξη των μορίων. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε παύση της αντίδρασης, κατά τη διάρκεια της οποίας προστέθηκαν στα φιαλίδια 11 μL μίγματος αντιδραστηρίων. Εν συνεχεία, τα δείγματα επώαστηκαν για 60 min στους 42 °C και στους 65 °C για 10 min, με σκοπό την αδρανοποίηση των ενζύμων. Με το τέλος της αντίδρασης, το νεοσυντεθέν cDNA αραιώθηκε 1:1 με νερό ελεύθερο RNασών (τελικός όγκος, 50 μL) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι επόμενης χρήσης. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του cDNA ήταν ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας MJ Research Thermal Cycler PTC-200 (MA, USA)

| Αντιδραστήριο | Όνομα προϊόντος | Αρ.Καταλόγου | Εταιρία παρασκευής |
|-------------------------------|----------------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| Διάλυμα TRIsure | TRIsure Reagent | 38033 | Bioline |
| Χλωροφόρμιο | Chloroform | 112250 | Euroclone, Italy |
| Ισοπροπανόλη | 2-propanol | AL03232500 | Scharlau, Spain |
| Αιθανόλη 100% | Ethanol Absolute | ET00162500 | Scharlau, Spain |
| Νερό ελεύθερο RNασών | Ultra Pure Water | 10977-015 | Gibco, USA |
| Αγαρόζη | Agarose powder | 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 | RNaseZAP | AM9780 | Ambion,Life Technologies, UK |
| Αντίστροφη μεταγραφάση MMLV | MMLV-RT | 28025-021 | Invitrogen,Life Technologies, UK |
| Πακέτο dNTPs | 100 mM dNTP set | 10015 | Jena Bioscience |
| Αναστολέας RNασών | RNAaseOUT, 40 U/mL | 100000840 | Invitrogen,Life Technologies, UK |
| Τυχαία εξανουκλεοτίδια | Random Hexamers | 79236 | Qiagen, Germany |
| SYBR Green I | Platinum SYBR Green qPCR Supermix- UDG | 11733-046 | Invitrogen,Life Technologies, UK |

Πίνακας 2.1. Κατάλογος αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στη μοριακή ανάλυση των δειγμάτων ηπατικού ιστού

| Αντιδραστήριο | Όγκος/δείγμα(μL) |
|-----------------------|------------------|
| 5xFS buffer | 5.00 |
| Διάλυμα dNTPs (10 mM) | 2.00 |
| 0,1 DTT | 2.25 |
| RNAsin (2,500 U/mL) | 0.60 |
| MMLV RT | 1.25 |
| Τελικός όγκος | 11.0 |

Πίνακας 2. 2 . Όγκοι αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία μίγματος αντίδρασης PCR αντίστροφης μεταγραφής (cDNA mix), σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρίας (Invitrogen, Life Technologies, UK).

2.3 Μελέτη της έκφρασης των υπο διερεύνηση γονιδίων με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR/ qRT-PCR).

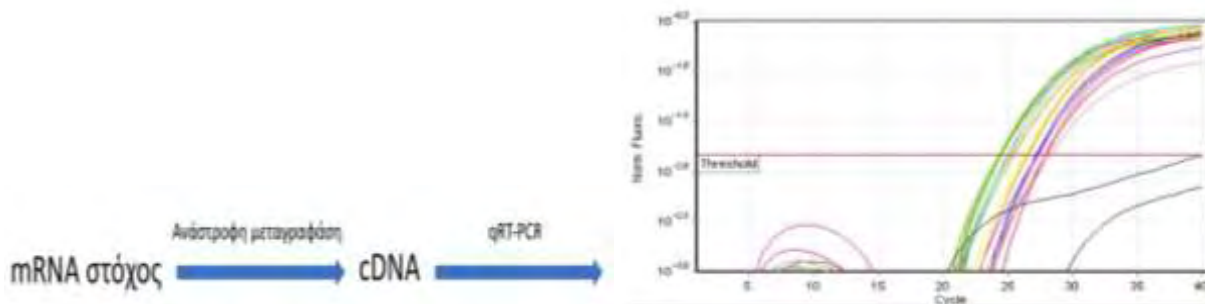
Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, η επιλογή των, προς μελέτη, γονιδίων έγινε βάσει του ρόλου αυτών στην ηπατική φλεγμονή και ανοσορρύθμιση. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων των φλεγμονοσωμάτων *NLRP3*, *AIM2* καθώς και των κυτταροκινών *IL18*, *IL1B*, οι οποίες παράγονται ύστερα από ενεργοποίηση των προαναφερθέντων φλεγμονοσωμάτων, επάγοντας τη φλεγμονώδη αντίδραση στον ιστό. Μελετήθηκε επίσης η έκφραση του *FOXP3* ως δείκτης των T-ρυθμιστικών κυττάρων (tTregs και $FOXP3^+$ pTregs) καθώς και τα *PDI*, *PDL1* ως δείκτες εξάντλησης των T κυττάρων. Τελευταίο, μελετήθηκε το *SMAD7*, η έκφραση του οποίου εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β (Tumour Growth Factor-beta). Συνοπτικά, τα γονίδια που μελετήθηκαν καθώς και ο ρόλος που επιτελούν στην ανοσιακή απάντηση και ρύθμιση, αναγράφονται στον **Πίνακα 2.3**

| Γονίδια | Ρόλος στην ανοσιακή απάντηση/ Ανοσιακή ρύθμιση |
|--------------------|---------------------------------------------------|
| <i>FOXP3</i> | Δείκτες ρυθμιστικών T-κυττάρων |
| <i>IL1B, IL18</i> | Φλεγμονή |
| <i>PDI, PDL1</i> | Εξάντληση T-κυττάρων |
| <i>SMAD7</i> | Ίνωση |
| <i>NLRP3, AIM2</i> | Φλεγμονοσώματα |

Πίνακας 2. 3 Κατάλογος γονιδίων που μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα καθώς και ο ρόλος που επιτελούν στην ανοσιακή απάντηση και ρύθμιση.

2.3.1 *Real-time PCR (qRT-PCR)-Περιγραφή της μεθόδου*

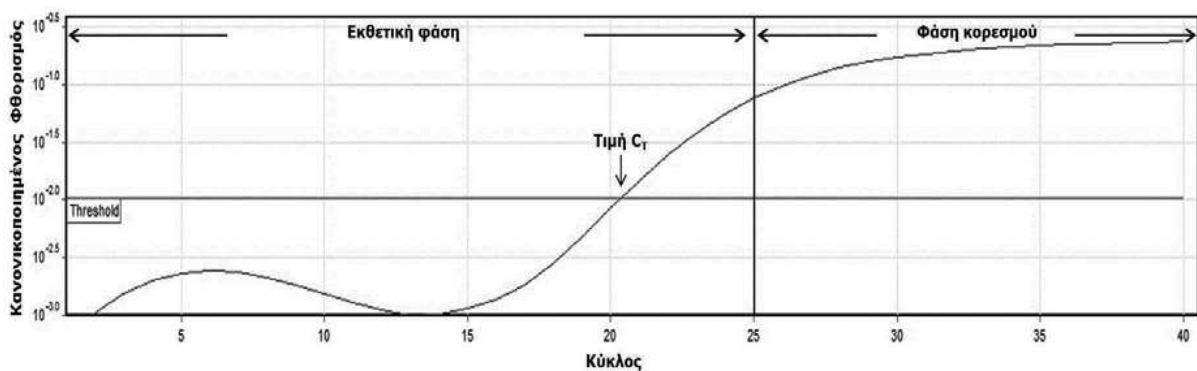
Η qRT-PCR απαρτίζεται από τρία βασικά βήματα: i) Την μετατροπή του RNA σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης ii) την ενίσχυση του cDNA σύμφωνα με τις αρχές της PCR iii) την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ενισχυμένων προϊόντων σε πραγματικό χρόνο. (Εικόνα 2.1)



Εικόνα 2.2 Απεικόνιση των σταδίων που συνιστούν μία αντίδραση qRT-PCR. Το στάδιο της ανάστροφης μεταγραφής μπορεί να αποτελεί είτε κομμάτι της συνολικής αντίδρασης με τη χρήση θερμοανθεκτικής πολυμεράσης, είτε να διεξαχθεί σαν μία ξεχωριστή αντίδραση, το προϊόν της οποίας θα χρησιμοποιηθεί μετέπειτα για την αντίδραση της Real-Time PCR. Η Εικόνα είναι προσαρμοσμένη από προσωπικό αρχείο πειραμάτων.

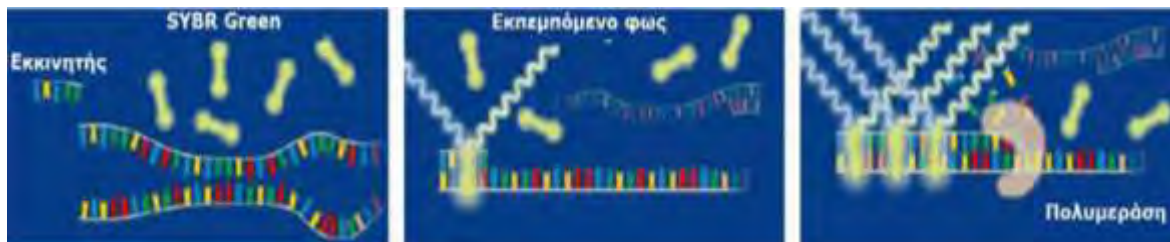
Η μέθοδος χρησιμοποιεί μόρια αναφοράς, επισημασμένα με φθοριόχρωμα, τα οποία συνδυάζοντας τα στάδια της ενίσχυσης και της ανίχνευσης, μετρούν την ένταση φθορισμού, ανάλογα με την ποσότητα cDNA που προκύπτει με το τέλος κάθε κύκλου αντίδρασης. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό κάθε αντίδρασης είναι ο κύκλος της PCR, κατά τον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά ένα προκαθορισμένο σημείο φθορισμού. Το σημείο αυτό χαρακτηρίζεται ως «κατώφλι» της αντίδρασης (threshold) και καθορίζεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης, για το προς μελέτη γονίδιο. Η παράμετρος αυτή που περιγράφηκε παραπάνω και αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της αντίδρασης συμβολίζεται ως Ct (threshold cycle). Το Ct είναι μέγεθος αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης του υποστρώματος της αντίδρασης (cDNA), δηλαδή όσο περισσότερο cDNA υπάρχει στην έναρξη της αντίδρασης, τόσο χαμηλότερο θα είναι το Ct. Η σχέση αυτή, μεταξύ φθορισμού και ενισχυμένου προϊόντος είναι και αυτή η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του κατά απόλυτες ή σχετικές τιμές (81).

Η καμπύλη ενίσχυσης που καταγράφεται από το λογισμικό, συνίσταται από τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού (plateau)(**Εικόνα 2.2**). Κατά την εκθετική φάση, λόγω του ότι όλα τα αντιδρώντα μόρια βρίσκονται σε περίσσεια, η απόδοση της αντίδρασης είναι μέγιστη ($\alpha=1$, 100% απόδοση), ενώ όσο προχωράει η αντίδραση και τα αντιδρώντα αρχίζουν να εξαντλούνται, η απόδοση της αντίδρασης μειώνεται, με αποτέλεσμα η καμπύλη να φτάσει στη γραμμική της φάση, μέχρι τα αντιδρώντα να κορεστούν πλήρως και η καμπύλη να φτάσει σε plateau. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός ενισχυμένου προϊόντος. Τα ενισχυμένα προϊόντα της PCR ανιχνεύονται με τη χρήση μορίων-ιχνηθέτησης φθορισμού, με δύο τρόπους. Είτε με τη χρήση ενός φθορίζοντος μορίου το οποίο προσδένεται στο ενισχυμένο προϊόν, είτε με τη χρήση ζεύγους ιχνηθετημένου μορίου-αποσβέστη (fluorescent probe-quencher). Σε αυτή την περίπτωση, η ένταση του φθορισμού που καταγράφεται, εξαρτάται από την απόσταση μεταξύ fluorescent probe-quencher, δηλαδή από το πόσο ενισχυμένο προϊόν παρεμβάλλεται μεταξύ των δύο.



Εικόνα 2.3 Οι φάσεις μίας αντίδρασης Real-time PCR, με τη μορφή καμπύλης, με τη χαρακτηριστική τιμή C_t η οποία εκφράζει τον αριθμό κύκλων αντίδρασης ο οποίος είναι απαραίτητος για να φτάσει η αντίδραση το προκαθορισμένο «κατώφλι». Όσο μικρότερη η τιμή C_t , τόσο μεγαλύτερη η έκφραση του ενισχυόμενου cDNA. Εικόνα προσαρμοσμένη από: Νικολέττα Αργέντου (2014), Ρυθμιστικά T κύτταρα και επαγόμενη από απόπτωση φλεγμονή.

Στην παρούσα μελέτη, ως μέσο φθορισμού χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I, η οποία προσδένεται μη ειδικά, σε δίκλιωνα μόρια DNA. Η SYBR φθορίζει στα 520 nm (διέγερση, 420 nm), όταν βρίσκεται προσδεμένη σε δίκλινο μόριο DNA ενώ όταν απαντάται ελεύθερη στο διάλυμα δεν φθορίζει. Επομένως, η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ενισχυμένου προϊόντος (Εικόνα 2.3)



Εικόνα 2.4 Αρχή λειτουργίας της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I, ως μέσο φθορισμού στην αντίδραση. Η μη ειδική σύνδεση της χρωστικής σε δίκλιωνα μόρια DNA, έχει ως αποτέλεσμα τον φθορισμό της, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Προσαρμογή από <http://gene-quantification.de/chemistry.html>

Η μη ειδική σύνδεση της SYBR σε δίκλιωνα μόρια DNA, καθιστά τη χρήση της, ως μία εύκολη, ευαίσθητη και οικονομική μέθοδο ιχνηθέτησης στην RT-qPCR, σε αντίθεση με τη χρήση ζεύγους εκκινητών probe-quencher, στην περίπτωση των οποίων απαιτείται ο εκ νέου σχεδιασμός των εκκινητών, ανάλογα με το γονίδιο που μελετάται κάθε φορά. Ωστόσο, το πλεονέκτημα αυτό αποτελεί, ανα περιπτώσεις, και το σημαντικότερο μειονέκτημα της μεθόδου. Η μη ειδική σύνδεση της SYBR έχει ως αποτέλεσμα την πιθανή πρόσδεση της χρωστικής σε πιθανά διμερή που σχηματίζουν οι εκκινητές ή σε άλλα μη ειδικά προϊόντα της αντίδρασης, οδηγώντας σε ψευδή αποτελέσματα, όσον αφορά τη συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχου. Το πρόβλημα αυτό μπορεί, παρ' όλα αυτά να αποφευχθεί, με το σωστό σχεδιασμό ειδικών εκκινητών, αλλά και με βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης. Ένας τρόπος με τον

οποίο μπορεί να ελεγχθεί η αλήθεια ή μη των αποτελεσμάτων είναι, η ανάλυση των καμπυλών τήξης. (melting curve analysis). Με το πέρας της αντίδρασης, η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά ώσπου ξεπερνάει το σημείο τήξης (melting point, T_m). Επειδή η θερμοκρασία τήξης εξαρτάται από τη δομή και το μέγεθος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, η ύπαρξη διμερών ή άλλων προϊόντων στα οποία έχει προσδεθεί μη ειδικά η SYBR, θα δώσει φθορισμό σε χαμηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με το ενισχυμένο προϊόν της PCR, με τη μορφή οξείας κορυφή στην καμπύλη τήξης.

2.3.2 Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της qRT-PCR

Για την ποσοτική αποτίμηση των αποτελεσμάτων της Real-time PCR, μπορούν να χρησιμοποιηθούν, είτε η μέθοδος απόλυτης ποσοτικοποίησης, κατά την οποία προσδιορίζεται ο ακριβής αριθμός των μορίων που έχουν αντιγραφεί κατά την αντίδραση ενίσχυσης, είτε η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης (relative quantification) η οποία χρησιμοποιήθηκε και στην περίπτωση της παρούσας μελέτης, όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA του γονιδίου-στόχου προσδιορίζονται, έχοντας ως σημείο αναφοράς τα επίπεδα έκφρασης ενός άλλου γονιδίου αναφοράς (reference gene). Για να κριθεί ένα γονίδιο, κατάλληλο για το ρόλο αυτό, θα πρέπει να εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα στους διάφορους ιστούς, να μην επηρεάζεται από την πειραματική διαδικασία και να εκφράζεται σε παρόμοια επίπεδα με το προς μελέτη γονίδιο. Τα πλέον συνήθη γονίδια που χρησιμοποιούνται ως γονίδια αναφοράς (housekeeping genes) στην Real-time PCR είναι τα *GAPDH*, *ACTB*, *B2M*. Για τις ανάγκες της παρούσας ερευνητικής, ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *B2M*, το γονίδιο που κωδικοποιεί τη $\beta 2$ -μικροσφαιρίνη, μία πρωτεΐνη του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC-Class I) η οποία εκφράζεται σχεδόν από όλους τους κυτταρικούς τύπους. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, για την ποσοτική αποτίμηση, το μέγεθος το οποίο αξιολογείται είναι το Ct. Η σύγκριση των τιμών Ct γίνεται βάσει ενός προεπιλεγμένου δείγματος αναφοράς. Ως τέτοιο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί RNA καλής ποιότητας, από δείγμα φυσιολογικού ιστού, σε περίπτωση εξέτασης παθολογικών δειγμάτων. Έπειτα, οι τιμές Ct των δειγμάτων κανονικοποιούνται ως προς το γονίδιο αναφοράς (*B2M*), έτσι ώστε να αποφευχθούν σφάλματα, τα οποία μπορεί να οφείλονται σε διαφορετική συγκέντρωση υποστρώματος ή σε διαφορές στην απόδοση της αντίδρασης. Η σχετική ποσοτικοποίηση περιγράφεται μαθηματικά, από τη σχέση:

Σχετική έκφραση mRNA γονιδίου = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Όπου $\Delta\Delta Ct$ χαρακτηρίζει τη διαφορά ΔCt δείγματος- ΔCt αναφοράς, ενώ ΔCt είναι η κανονικοποιημένη τιμή Ct κάθε δείγματος ως προς αυτή του γονιδίου αναφοράς (82). Επομένως, εύκολα μπορούμε να συμπεράνουμε πως για το δείγμα αναφοράς θα ισχύει: σχετική έκφραση mRNA = $2^0=1$ και η ίδια σχέση για τα υπόλοιπα δείγματα, δείχνει πόσο μεγαλύτερη ή μικρότερη είναι η έκφραση του γονιδίου-στόχου για το εκάστοτε δείγμα, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς.

2.3.3 Σχεδιασμός εκκινητών

Γενικά, στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, προτιμάται η σύνθεση προϊόντων μικρού μήκους (80-250 βάσεις), έτσι ώστε η ενίσχυση και η απόδοσή τους να είναι αποτελεσματικότερη. Για παράδειγμα, μικρότερου μήκους προϊόν αποδιατάσσεται ευκολότερα σε συνθήκες θερμοκρασίας 92-95⁰C σε σχέση με προϊόν μεγαλύτερου μήκους, διευκολύνοντας έτσι τους εκκινητές να προσδεθούν στον κλώνο που φέρει την συμπληρωματική αλληλουχία.

Το ιδανικό μήκος για τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι 18-24 βάσεις και πρέπει να συνδέονται πάντα σε διαφορετικά εξόνια, έτσι ώστε να αποφευχθεί η ύπαρξη τυχόν ψευδώς αληθών αποτελεσμάτων, ως αποτέλεσμα της σύνδεσής τους με γενωμικό DNA. Τα βασικά κριτήρια για την επιλογή εκκινητών είναι το σημείο τήξεώς τους (T_m) και η θέση των εκκινητών. Το σημείο τήξης πρέπει να κυμαίνεται κατά το εύρος 55-72⁰C, ενώ η διαφορά των σημείων τήξης των δύο εκκινητών δεν πρέπει να ξεπερνάει τους 2⁰C. Επιπλέον, το T_m του προϊόντος της PCR δεν θα πρέπει να είναι χαμηλότερο από αυτό των εκκινητών. Επιπλέον παράμετροι οι οποίοι πρέπει να ληφθούν υπόψιν κατά το σχεδιασμό των εκκινητών, είναι το ποσοστό GC%, καθώς αυτό δεν πρέπει να ξεπερνεί το 50%, αφού σε αυτή την περίπτωση, η διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων των δύο κλώνων θα είναι πολύ δυσκολότερη. Παρόλ'αυτά, η ύπαρξη βάσεων G, C στο 3' άκρο των εκκινητών είναι ωφέλιμη, καθώς εξασφαλίζει την ισχυρότερη σύνδεση αυτών στους συμπληρωματικούς κλώνους. Επίσης, πρέπει να προσεχθεί οι δύο εκκινητές να μην είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους, προς αποφυγή δημιουργίας διμερών.

Βάσει όλων των παραπάνω και με τη βοήθεια του εργαλείου βιοπληροφορικής Oligo 6, σχεδιάστηκαν εκκινητές για τα εξής γονίδια: *IL18*, *IL1B*, *NLRP3*, *AIM2*, *FOXP3*, *PD1*, *PDL1*, *SMAD7*. Η περιγραφή της αλληλουχίας όλων των εκκινητών, καθώς και η παρασκευάστρια εταιρία, αναγράφονται στον **Πίνακα 2.4**.

| Γονίδιο | Αλληλουχία | Αρ.Καταλόγου | Προέλευση |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------------------------|
| <i>FOXP3</i> | Εμπορικά διαθέσιμοι | PPH00029B | SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA |
| <i>PDI</i> | Εμπορικά διαθέσιμοι | PPH13086E | SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA |
| <i>PDL1</i> | Εμπρόσθιος:5'GGTGGTGCC GACTACAA- 3' Ανάστροφος:5'- TAGCCCTCAGCCTGACA-3' | | Invitrogen,Life Technologies, UK |
| <i>IL1β</i> | Εμπρόσθιος:5'- ATGGCTTATTACAGTGGC AATGAG-3' Ανάστροφος: 5'-GTAGTG GTGGTCGGAGATTCG-3' | | Invitrogen,Life Technologies, UK |
| <i>IL18</i> | Εμπρόσθιος:5'- CAACAAACTATTTGTCGC AGGA-3' Ανάστροφος: 5'- CATCTTCAGCTATAAAGT AAAGCGT-3' | | Invitrogen,Life Technologies, UK |

| | | | |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------------------------------------|
| <i>NLRP3</i> | Εμπρόσθιος: 5'-ACTCAT CCGTGTGCCGTGTTC-3' Ανάστροφος: 5'-GGTGCT TGCCATCTTCATCTGC-3' | | Invitrogen,Life Technologies, UK |
| <i>SMAD7</i> | Εμπορικά διαθέσιμοι | PPH01905B | SA Bioscience, Qiagen, Valencia, USA |
| <i>AIM2</i> | Εμπρόσθιος: 5'- AGCCGTCCAGAAGTGTC AGA-3' Ανάστροφος: 5'- ACAACCTTTGGGATCAGC CTCCT-3' | | Invitrogen,Life Technologies, UK |
| <i>B2M</i> | Εμπρόσθιος: 5'- STATCCAGCGTACTCCAA AG-3' Ανάστροφος: 5'- GAAAGACCAGTCCTTGC TGA-3' | | Invitrogen,Life Technologies, UK |

Πίνακας 2. 4 Αλληλουχίες και προέλευση εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων στην Real-time PCR.

2.4 Πειραματική διαδικασία

Στην παρούσα έρευνα, η αντίδραση της RT-PCR πραγματοποιήθηκε σε δύο βήματα. Δηλαδή, πρώτα πραγματοποιήθηκε σύνθεση του cDNA, όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω και έπειτα, αυτό χρησιμοποιήθηκε ως «καλούπι» για την αντίδραση της qPCR.

Η μικρή συγκέντρωση των μορίων-στόχων στο συνολικό μίγμα, καθιστά την αντίδραση ευάλωτη σε πειραματικά σφάλματα, λόγω μικρών διακυμάνσεων στις συνθήκες της αντίδρασης ή λανθασμένης πρόσδεσης των εκκινητών κατά τα αρχικά στάδια της αντίδρασης. Οι παράμετροι αυτές, αν και ασήμαντες στο μέγεθος τους, μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την απόδοση της αντίδρασης και το ενισχυόμενο προϊόν. Προκειμένου, λοιπόν, να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες πειραματικών σφαλμάτων και να εξασφαλιστεί η καλή επαναληψιμότητα της αντίδρασης, κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν για το εκάστοτε γονίδιο (αποδεκτές τιμές ΔC_t μεταξύ duplicates ≤ 1.00), ενώ τα δείγματα ελέγχονταν πάντα και για την έκφραση του γονιδίου αναφοράς, *B2M*. Επιπλέον, για να ελεγχθεί η ύπαρξη τυχόν επιμολύνσεων, χρησιμοποιήθηκαν τυφλά δείγματα (No Template Control, NTCs), τα οποία περιείχαν όλα τα αντιδρώντα συστατικά παρεκτός του γενετικού υλικού, cDNA

Για την παρασκευή του μίγματος της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν το Platinum SYBR Green qPCR supermix-UDG, τα ζεύγη εκκινητών των προς μελέτη γονιδίων και νερό. Το μίγμα της αντίδρασης παρασκευάστηκε όπως αναγράφεται στον **Πίνακα 2.5**, ενώ όλα τα αντιδραστήρια, όπως και τα δείγματα cDNA φυλάσσονταν στον πάγο μέχρι περαιτέρω χρήσης τους.

Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε αποστειρωμένα φιαλίδια χωρητικότητας 0.1 mL, τοποθετημένα σε κρυοπλάκα των 72 θέσεων. Σε κάθε φιαλίδιο προστέθηκαν 23 μ L από το MasterMix μαζί με 2 μ L cDNA. Στην περίπτωση των τυφλών δειγμάτων, αντί για cDNA προστέθηκαν 2 μ L νερό. Οι συνθήκες της αντίδρασης για το κάθε γονίδιο ξεχωριστά φαίνονται στον **Πίνακα**. Τέλος, το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των αντιδράσεων qRT-PCR ήταν ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας RotorGene 6000, Corbett Life science (Qiagen; Valencia, CA, USA).

| Αντιδραστήριο | Όγκος ανά δείγμα (μL) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG | 12.5 |
| H ₂ O | 9.5 |
| Εμπρόσθιος εκκινητής* | 0.5 |
| Ανάστροφος εκκινητής* | 0.5 |
| Τελικός όγκος | 23 |
| *Στην περίπτωση της χρήσης εμπορικά διαθέσιμων εκκινητών (μίγμα εμπρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή), χρησιμοποιήθηκε 1 μ L μίγματος/ δείγμα | |

Πίνακας 2.5 Όγκοι αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την Παρασκευή του reaction mix της Real-time PCR.

2.5 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα SPSS και GraphPad7. Για τη σύγκριση της σχετικής γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών

ομάδων, καθώς και για τη συσχέτιση αυτής με το στάδιο της φλεγμονής, τα πειραματικά δεδομένα, υποβλήθηκαν σε δοκιμασία Kruskal-Wallis, H και δοκιμασία Dunn's post-hoc. Για να θεωρηθούν τα αποτελέσματα των στατιστικών δοκιμασιών σημαντικά, έπρεπε η τιμή $P < 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Γονιδιακή έκφραση στους ασθενείς με HIV, HCV λοιμώξεις

Στην προσπάθεια να προσδιοριστούν οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην πορεία της ηπατικής φλεγμονής, στην HIV-σχετιζόμενη ηπατική νόσο, μελετήθηκε, με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) η έκφραση γονιδίων τα οποία σχετίζονται με τη φλεγμονή και την ανοσορρύθμιση. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων των φλεγμονοσωμάτων *NLRP3*, *AIM2* και των κυτταροκινών *IL1B*, *IL18* οι οποίες λειτουργούν ως επαγωγείς της φλεγμονής. Όσον αφορά την ανοσορρύθμιση, μελετήθηκαν το *FOXP3*, ως δείκτης παρουσίας ρυθμιστικών T κυττάρων στον ηπατικό ιστό, τα *PDI*, *PDL1*, γονίδια που κωδικοποιούν τον ανασταλτικό υποδοχέα των T κυττάρων (PD-1) και τον συνδέτη του (PDL-1), καθώς και το *SMAD7*, το οποίο εμπλέκεται στο μονοπάτι του TGF-B και συμμετέχει στη διαδικασία της ίνωσης.

Οι ασθενείς οι οποίοι μελετήθηκαν, κατατάχθηκαν σε τρεις ομάδες (HIV, HIV/HCV, HCV) (Πίνακας 3.1). Προκειμένου να διαπιστωθούν πιθανές διαφορές στη σχετική έκφραση των γονιδίων (Πίνακας 3.2) που μελετήθηκαν, ανάμεσα στις ομάδες ασθενών, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία Kruskal-Wallis H. Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης για το *NLRP3* στους ασθενείς με HIV λοίμωξη, με σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του φλεγμονοσώματος, μεταξύ των ομάδων HIV και HCV. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα mRNA για το *IL1B* για τις ομάδες HIV, HIV/HCV, όχι όμως για την ομάδα HCV. Για το φλεγμονόσωμα AIM2 και την IL-18 δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη μεταγραφική έκφραση των γονιδίων τους, μεταξύ των ομάδων. Το ίδιο ισχύει και για τα γονίδια που σχετίζονται με την ανοσορρύθμιση στον ηπατικό ιστό, για την μεταγραφική δραστηριότητά των οποίων, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων. (Εικόνα 3.1)

| | HIV | HIV/HCV | HCV |
|-----------------------------------------------------------------|--------------|----------------|------------|
| <i>Αρ. δειγμάτων</i> | 4 | 13 | 5 |
| <i>Φύλο (Α/Θ)^α</i> | 4/0 | 11/2 | 3/2 |
| <i>Ηλικία</i> <i>(δτ^β, εύρος)</i> | 40, 29-60 | 40, 31-76 | 43, 40-54 |
| <i>AST^γ (U/μL)</i> <i>(δτ^β, εύρος)</i> | 49.5, 38-76 | 32, 16-108 | 53, 37-65 |
| <i>ALT^δ (U/μL)</i> <i>(δτ^β, εύρος)</i> | 78.5, 51-188 | 30, 9-178 | 72, 57-143 |
| <i>Βαθμός φλεγμονής</i> | | | |
| <i>I-0</i> | - | - | - |
| <i>I-1</i> | - | 3 | 1 |
| <i>I-2</i> | - | 7 | 1 |

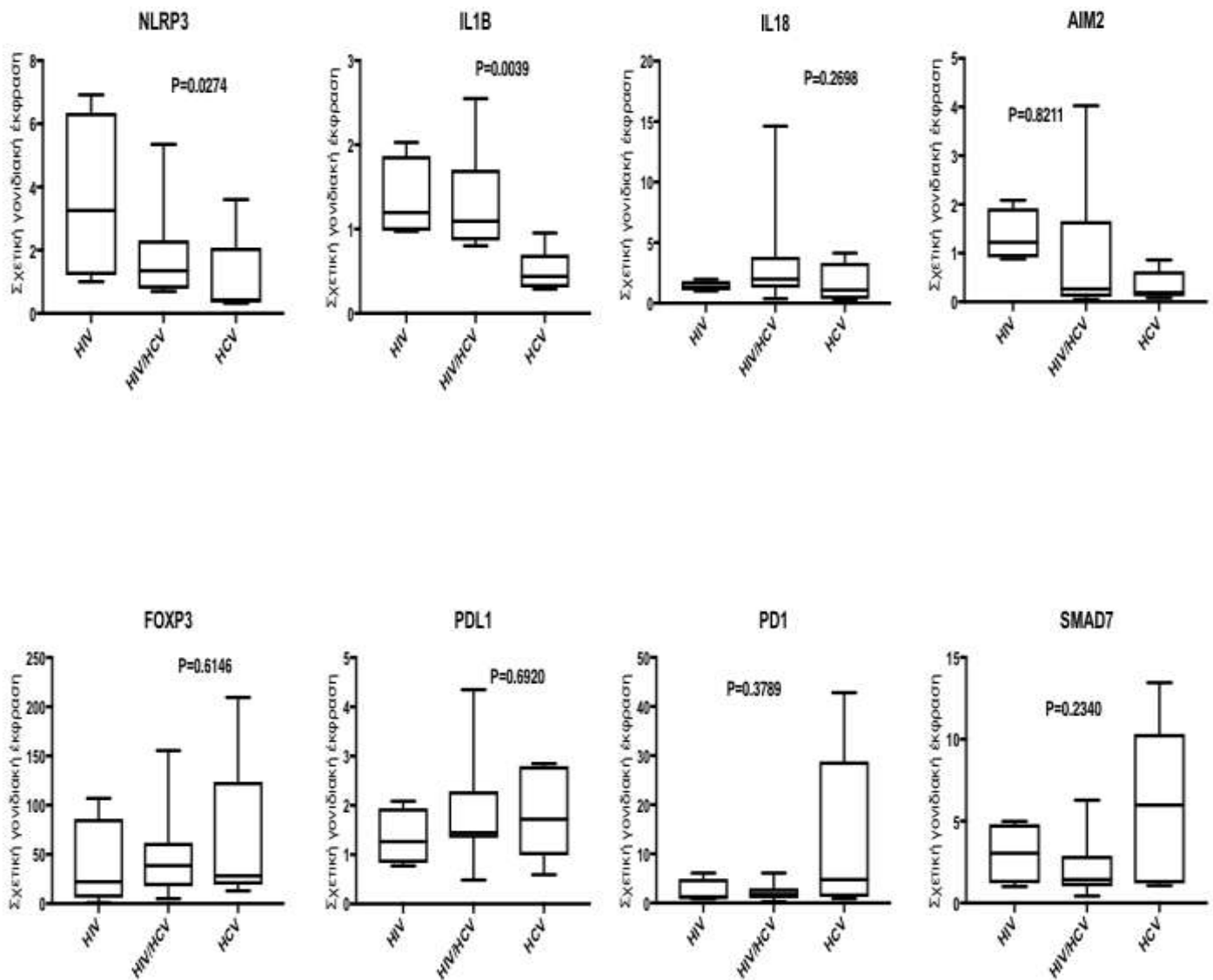
| | | | |
|--------------------------------|---|--------|----------|
| <i>I-3</i> | - | 3 | 3 |
| <i>I-4</i> | - | - | - |
| <i>Τνωση</i> | - | 2, 0-4 | 3, 1-4 |
| <i>(δτ^β, εύρος)</i> | - | 5, 2-9 | 10, 2-12 |
| <i>Βαθμός HAI</i> | | | |
| <i>(δτ^β, εύρος)</i> | | | |

Πίνακας 3.1 Κλινικά, ιστοπαθολογικά, βιοχημικά δεδομένα ασθενών με χρόνια ηπατική φλεγμονή. ^α A/Θ, Άρρενες και Θήλεις. ^β δτ, διάμεση τιμή. ^γAST, ασπαρτική Τρανσαμινάση. ^δALT, αλανινική τρανσαμινάση

| ΓΟΝΙΔΙΑ | HIV | HIV/HCV | HCV |
|-------------------------------------------------------|---------------|----------------|---------------|
| <i>NLRP3</i> (μ.τ ^α , ±σ ^β) | 3.61 ± 2.70 | 1.81 ± 1.39 | 1.06 ± 1.43 |
| <i>IL1B</i> (μ.τ ^α , ±σ ^β) | 1.35 ± 0.49 | 1.30 ± 0.55 | 0.49 ± 0.27 |
| <i>IL18</i> (μ.τ ^α , ±σ ^β) | 1.42 ± 0.42 | 3.40 ± 3.90 | 1.69 ± 1.64 |
| <i>FOXP3</i> (μ.τ ^α , ±σ ^β) | 38.04 ± 46.98 | 47.66 ± 41.71 | 62.86 ± 82.4 |
| <i>PDI</i> (μ.τ ^α , ±σ ^β) | 2.33 ± 2.53 | 2.19 ± 1.63 | 12.99 ± 17.59 |
| <i>PDL1</i> | | | |

| | | | |
|----------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| $(\mu.\tau^{\alpha}, \pm\sigma^{\beta})$ | 1.35 ± 0.59 | 1.85 ± 0.94 | 1.86 ± 0.95 |
| <i>SMAD7</i> $(\mu.\tau^{\alpha}, \pm\sigma^{\beta})$ | 3.02 ± 1.92 | 2.07 ± 1.58 | 5.81 ± 5.08 |
| <i>AIM2</i> $(\mu.\tau^{\alpha}, \pm\sigma^{\beta})$ | 1.35 ± 0.55 | 0.94 ± 1.19 | 0.34 ± 0.32 |

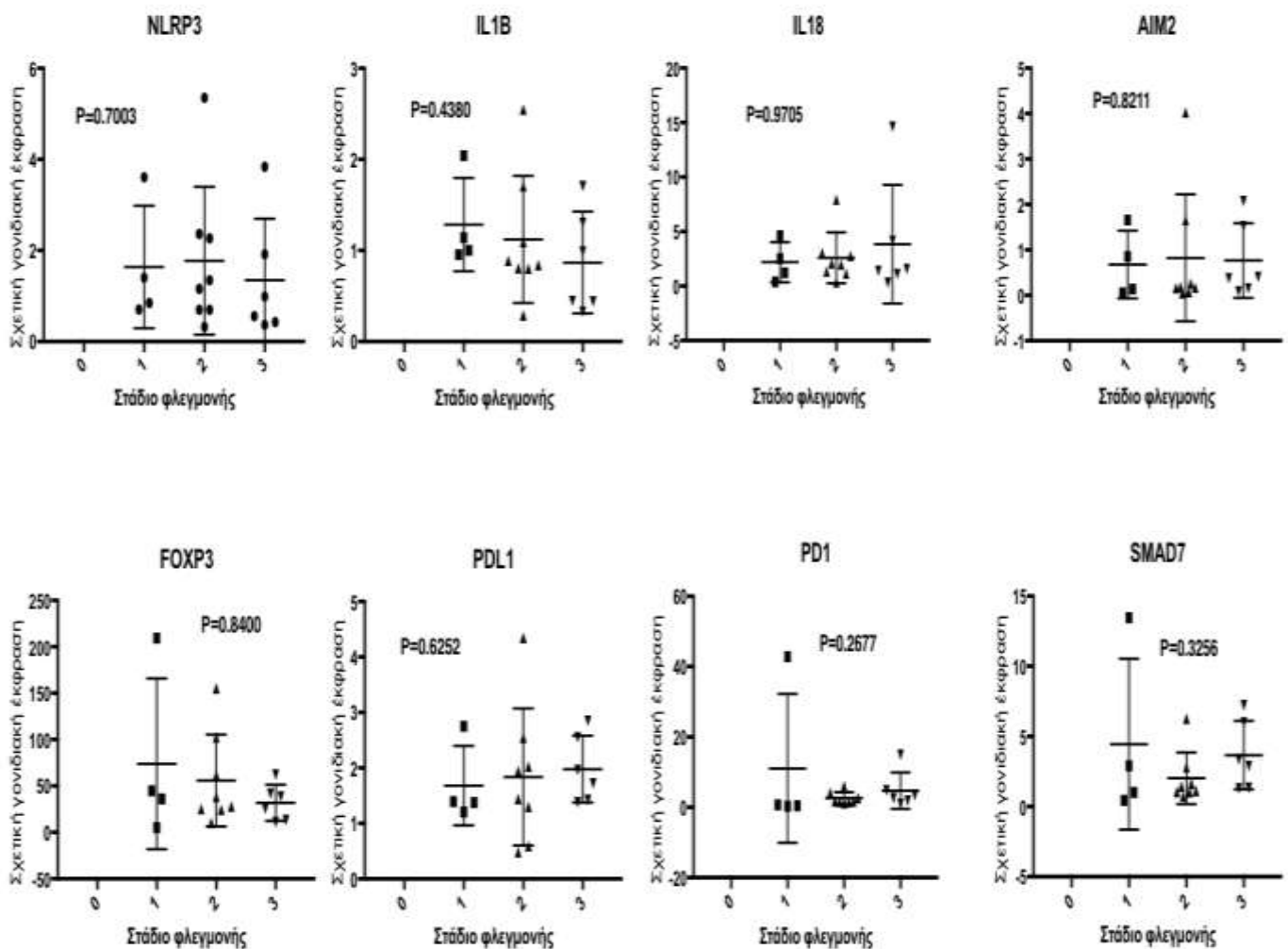
Πίνακας 3.2 Σχετική ποσοτικοποίηση των υπό εξέταση γονιδίων. ^αμ.τ= μέση τιμή, ^βσ= τυπική απόκλιση



Εικόνα 3.1 Θηκογράμματα της σχετικής έκφρασης των προς μελέτη γονιδίων για τις διαφορετικές ομάδες ασθενών. Στατιστικά σημαντικές θεωρούνται οι διαφορές για τις οποίες η δοκιμασία δίνει τιμή $P < 0.05$.

3.2 Γονιδιακή έκφραση και συσχέτιση με στάδιο φλεγμονής

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε το αν η σχετική έκφραση των γονιδίων που μελετήθηκαν, συσχετίζεται με το στάδιο της φλεγμονής, ανεξάρτητα από το αίτιο αυτής. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από τις ομάδες HIV/HCV και HCV και όλα τα υποκείμενα της μελέτης θεωρήθηκαν μία ομάδα. Τα πειραματικά δεδομένα, υποβλήθηκαν και πάλι σε δοκιμασία Kruskal-Wallis H, παρ' όλα αυτά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση κανενός από τα γονίδια που μελετήθηκαν. (Εικόνα 3.2)



Εικόνα 3 .2 Διάγραμμα διασποράς για την απεικόνιση της συσχέτισης σχετικής γονιδιακής έκφρασης με το στάδιο της φλεγμονής. Στατιστικά σημαντικά, θεωρούνται τα αποτελέσματα για τα οποία η δοκιμασία δίνει τιμή $P < 0.05$.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Το φλεγμονόσωμα *NLRP3* και ενεργοποίηση της *IL-1B* στην HIV-σχετιζόμενη ηπατική φλεγμονή.

Το φλεγμονόσωμα *NLRP3* έχει μελετηθεί εκτεταμένα στην ηπατική φλεγμονή, σε συνθήκες ιογενών λοιμώξεων. Ο Gale και συν., παρατήρησαν πως σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C και ηπατική κίρρωση, τα επίπεδα *NLRP3* και *IL-1B* παρουσίασαν αύξηση, στον ορό, σε σχέση με υγιή άτομα. Παράλληλα, έδειξαν πως ο HCV επιφέρει παραγωγή της *IL-1B*, μέσω του μονοπατιού TLR7-*NLRP3* σε ηπατικά μακροφάγα (83). Πρόσφατη μελέτη, έδειξε επίσης, πως σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B (XHB), παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα mRNA για τα *NLRP3* και *IL1B*, υποδεικνύοντας πως η παραγωγή *IL-1B* με μεσολάβηση του φλεγμονοσώματος *NLRP3* αποτελεί σημαντικό παράγοντα φλεγμονής στην χρόνια ηπατίτιδα B. Στην ίδια μελέτη, τα αποτελέσματα αυτά, δεν παρατηρήθηκαν στην περίπτωση ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C (19).

Μελέτες σε κυτταρικές σειρές, υποδεικνύουν πως η *IL-1β* και το *NLRP3*, φαίνεται πως αποτελούν παράγοντες φλεγμονής και στην περίπτωση της HIV λοίμωξης, ενώ πρόσφατα οι Ferial και συν. Έδειξαν πως ο πολλαπλασιασμός του ιού HIV, συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα *NLRP3*, *IL1B*, *IL18*, *CASP1*, σε βιοψίες γαστρεντερικού λεμφικού ιστού (GALT)(84). Παρ' όλα αυτά, στη βιβλιογραφία υπάρχουν ελλιπή στοιχεία, ως προς τους μοριακούς μηχανισμούς που αφορούν την ηπατική φλεγμονή στην HIV λοίμωξη και ακόμα λιγότερο στη συλλοίμωξη HIV/HCV.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, δείχνουν πως στην HIV λοίμωξη παρατηρείται ενεργοποίηση του μονοπατιού του φλεγμονοσώματος *NLRP3*, με σημαντικά αυξημένα επίπεδα mRNA, έναντι των ασθενών με HCV λοίμωξη. Επιπλέον, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν και στην έκφραση του γονιδίου της *IL-1β* (*IL1B*) μεταξύ των διαφορετικών ομάδων. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα mRNA στους ασθενείς με HIV έναντι αυτών με HCV λοίμωξη ($P= 0.0369$), καθώς και στους ασθενείς με συλλοίμωξη HIV/HCV, έναντι αυτών με HCV ($P= 0.0145$). Επομένως, μπορεί να συμπεράνει κανείς πως και στην περίπτωση της συλλοίμωξης, κινητήριος μοχλός για την παραγωγή *IL-1B*, είναι περισσότερο ο HIV ιός, παρά ο HCV.

4.2 Η IL-18 στην HIV-σχετιζόμενη ηπατική φλεγμονή

Πρόσφατη μελέτη από τους Veenhuis και συν. (79), έδειξε πως τα επίπεδα IL-18 στον ορό ασθενών με συλλοίμωξη HIV/HCV ήταν αυξημένα σε σχέση με αυτά ασθενών με μόνο μία εκ των δύο λοιμώξεων ($P < 0.0001$). Επίσης, τα επίπεδα της IL-18 ήταν υψηλότερα στην περίπτωση των ασθενών με HIV συγκριτικά με τους ασθενείς με HCV. Τα υψηλά επίπεδα της κυτταροκίνης στον ορό, παρουσίασαν θετική συσχέτιση με την ανιχνεύσιμη HIV ιαυμία, και αρνητική συσχέτιση με τον αριθμό των CD4 κυττάρων ($P < 0.0001$), αποτελέσματα που συνάδουν με τη θεώρηση ότι ο HIV ενεργοποιεί το φλεγμονόσωμα. Η λοίμωξη με HIV, σε ασθενείς με προϋπάρχουσα λοίμωξη από HCV, παρουσίασε αυξημένα επίπεδα IL-18, ενώ σε καταστολή του HIV, τα επίπεδα της IL-18 ήταν φυσιολογικά. Τα αυξημένα αυτά επίπεδα της σχετιζόμενης με τη φλεγμονή κυτταροκίνης, σύμφωνα με τους ερευνητές, μπορεί να εξηγούν την κλινική εικόνα των ασθενών με συλλοίμωξη και την ταχύτερη εξέλιξη ηπατικής νόσου. Παρόλ'αυτά, δεν αναφέρονται μελέτες στη βιβλιογραφία που να αφορούν στην έκφραση του γονιδίου της IL-18 στον ηπατικό ιστό.

Στην προσπάθεια να ελέγξουμε αν η υπόθεση αυτή, για το ρόλο της IL-18 επαληθεύεται και στην περίπτωση του ηπατικού ιστού, όπως και στον ορό, μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου *IL18* σε βιοψίες ηπατικού ιστού. Τα ευρήματα της μελέτης, δεν δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ομάδων, υποδεικνύοντας πως πιθανόν τα αυξημένα επίπεδα της IL-18 να σχετίζονται με κάποιον άλλο φλεγμένον ιστό που έχει πληγεί από τον HIV.

4.3 Ανοσορρυθμιστικοί μηχανισμοί στην HIV-σχετιζόμενη ηπατική φλεγμονή

Η ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης αποτελεί έναν φυσιολογικό μηχανισμό, με τον οποίο το ανοσιακό σύστημα, πετυχαίνει την καταστολή της φλεγμονώδους αντίδρασης, όταν ο «κίνδυνος», έχει παρέλθει. Στρέφοντας την προσοχή στους ανοσορρυθμιστικούς μηχανισμούς στη χρόνια ηπατική φλεγμονή, στο μοντέλο της HBV λοίμωξης, βρέθηκε πως ανεξάρτητα από το αίτιο της φλεγμονής, παρατηρείται αυξημένη έκφραση του *FOXP3*, η οποία συσχετίστηκε θετικά με την ένταση της φλεγμονής, αφού ασθενείς με λοίμωξη σε ύφεση, παρουσίαζαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης. Επομένως η παρουσία μεγάλου αριθμού ρυθμιστικών T

κύτταρα, φαίνεται να σχετίζεται με το στάδιο της φλεγμονής στον ηπατικό ιστό, αλλά δεν είναι ξεκάθαρο αν αποτελούν αίτιο, ή αποτέλεσμα της χρόνιας φλεγμονής (33). Στην περίπτωση της HIV λοίμωξης, ο ρόλος των Tregs φαίνεται πως μπορεί να είναι διπλός. Η εξάπλωσή τους, μπορεί να είναι βοηθητική, καταστέλλοντας την γενικότερη ενεργοποίηση των T κυττάρων, ή να συνεισφέρει στην επιμονή της λοίμωξης, αποδυναμώνοντας τις ειδικές απαντήσεις, έναντι του HIV (85). Επίσης, ο FoxP3 μεταγραφικός παράγοντας, απαραίτητος για την ανάπτυξη των Tregs βρέθηκε πως μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφική ικανότητα του υποκινητή του HIV-1, δίνοντας έτσι μια πιθανή εξήγηση για τις περιπτώσεις που μεγάλος αριθμός Tregs, συνοδεύεται από επιμονή της λοίμωξης (86). Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, παρουσιάζουν μία γενικευμένη αύξηση στην έκφραση του γονιδίου *FOXP3* και στις τρεις ομάδες, επιβεβαιώνοντας πως τα ρυθμιστικά T κύτταρα, αποτελούν δείκτη φλεγμονής στον ηπατικό ιστό, παρόλ' αυτά η αύξηση αυτή δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική ούτε μεταξύ των διαφορετικών ομάδων, ούτε συσχετίζοντας τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου με το στάδιο της φλεγμονής.

Άλλα μόρια-παράγοντες ανοσορρύθμισης, τα οποία φαίνεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην πορεία της ηπατικής φλεγμονής στην HIV λοίμωξη είναι ο αναστολέας των T κυττάρων, PD-1 και ο συνδέτης του, PDL-1. Το μοριακό αυτό «ζευγάρι» παίζει κεντρικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού-ξενιστή, συνεισφέροντας στην εξάλειψη παθογόνων μικροοργανισμών. Στην περίπτωση των χρόνιων ιογενών λοιμώξεων, έχει βρεθεί πως η έκφραση του *PDI* είναι αυξημένη και πως αυτά τα T κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την έκφρασή του, χάνουν την ικανότητα παραγωγής κυτταροκινών (86). Επιπλέον, αναφορικά με την HIV λοίμωξη, βρέθηκε χαμηλή έκφραση *PDI* σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα HIV-Ag (Antigen), όπως οι φορείς του ιού και σε υγιή άτομα με ιστορικό HCV, HBV λοιμώξεων, ενώ τα επίπεδα παραμένουν υψηλά σε περιπτώσεις ασθενών με χρόνιες HCV, HBV λοιμώξεις. Επιπλέον παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του *PDL1* και *PDL2*, ως αποτέλεσμα της HCV λοίμωξης και επαγόμενα από ιντερφερόνες τύπου 1, 2. (87) Τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν πως πιθανώς η έκφραση του *PD-1* σε ιο-ειδικά T κύτταρα μπορεί να επηρεάζει αρνητικά τη διαίρεσή τους. Συμπληρωματικά με τα ευρήματα αυτά, στο μοντέλο της XHB βρέθηκε πως τα *PDI/PDL1* παρουσιάζουν χαμηλή έκφραση όταν η λοίμωξη είναι σε ύφεση και η έκφρασή τους συσχετίζεται με την ένταση της φλεγμονής, αλλά όχι με την αναπλήρωση των T κυττάρων στον ηπατικό ιστό (75). Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η έκφραση των δύο αυτών παραγόντων ανοσορρύθμισης στον ηπατικό ιστό ασθενών με λοιμώξεις HIV, HCV και συλλοίμωξη HIV/HCV. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ομάδων ούτε διαφορές που να σχετίζονται με την ένταση της φλεγμονής.

4.4 Συμπεράσματα

Η έλλειψη πειραματικών δεδομένων σχετικά με την ηπατική φλεγμονή και ανοσορρύθμιση στην HIV-σχετιζόμενη ηπατική νόσο, ήταν το έναυσμα για τον σχεδιασμό της παρούσας μελέτης. Στο πλαίσιο του γενικότερου ενδιαφέροντος που επικρατεί τα τελευταία χρόνια, για τη σχέση της φυσικής ανοσίας με τη χρόνια ηπατική φλεγμονή, επιλέξαμε να μελετήσουμε την πιθανή ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων NLRP3, AIM2, καθώς και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων των κυτταροκινών IL-1B, IL18. Τα ευρήματά μας, δείχνουν πως στην HIV λοίμωξη, η έκφραση του *NLRP3* είναι σημαντικά μεγαλύτερη συγκριτικά με την HCV λοίμωξη. Επιπλέον, σημαντικά αυξημένη είναι και η έκφραση της *IL1B* στους ασθενείς με HIV, HIV/HCV λοιμώξεις αλλά όχι στους ασθενείς με HCV, ενώ η έκφρασή τους είναι ανεξάρτητη του σταδίου της φλεγμονής. Επομένως, συμπεραίνουμε πως το μονοπάτι του φλεγμονοσώματος NLRP3 και η παραγωγή IL-1B, αποτελούν σημαντικό παράγοντα ηπατικής φλεγμονής στην HIV λοίμωξη, αλλά όχι στην HCV λοίμωξη.

Τα αποτελέσματα αυτά, εγείρουν το ενδιαφέρον όσον αφορά τις πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις για την καταστολή της φλεγμονής στην HIV-σχετιζόμενη ηπατική νόσο. Μία μελλοντική κατεύθυνση στην έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση, είναι η πιθανή χρήση αναστολέων του NLRP3 για την καταστολή της ηπατικής φλεγμονής σε ασθενείς με HIV λοίμωξη. Σε αυτή την περίπτωση, πρέπει φυσικά να διερευνηθεί και η αλληλεπίδραση πιθανών τέτοιων μορίων με την αντιρετροϊκή θεραπεία. Όσον αφορά τους παράγοντες ανοσορρύθμισης που μελετήθηκαν, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ομάδων ασθενών, παρ' όλα αυτά, κρίνεται απαραίτητη περαιτέρω μελέτη αναφορικά με τους μηχανισμούς αυτούς, καθώς ο αριθμός των δειγμάτων που μελετήσαμε στην παρούσα εργασία δεν ήταν αρκετά μεγάλος, ώστε τα αποτελέσματα να παρουσιάζουν μία απόλυτα αντιπροσωπευτική εικόνα των μηχανισμών αυτών. Αυτό ήταν και ένας περιορισμός της μελέτης μας. Σε κάθε περίπτωση, τα ευρήματά μας θέτουν μία βάση για περαιτέρω έρευνα στο πεδίο της χρόνιας φλεγμονής σε ένα μοντέλο λοίμωξης, όπως αυτό της HIV/HCV, για το οποίο γνωρίζουμε πολύ λίγα ακόμη.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Donaldson IML. Celsus: De medicina, Florence 1478. Part 2. Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh. 2014.
2. White E, Mantovani A. Inflammation, wound repair, and fibrosis: reassessing the spectrum of tissue injury and resolution. *J Pathol*. 2013;229(2):141–4.
3. Thannickal VJ, Toews GB, White ES et al. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med*. 2004;55:395–417.
4. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428–35.
5. Nathan C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*. 2006.
6. Jones GW, Hill DG, Jones SA. Understanding immune cells in tertiary lymphoid organ development: It is all starting to come together. *Front Immunol*. 2016;7(October):1–13.
7. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 2009;
8. Martinon F, Burns K, Tschopp J, Adrain C, Slee E., Harte M., et al. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002;
9. Szabo G, Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;
10. Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases. *J Hepatol*. 2012;57(3):642–54.
11. Gkikas I, Palikaras K, Nektarios Tavernarakis. The Role of Mitophagy in innate immunity. 2018;9(June):1–15.
12. Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(8):588–606.
13. de Menthière CS, Terrière S, Pugnère D, Ruiz M, Demaille J, Touitou I. INFEVERS: The registry for FMF and hereditary inflammatory disorders mutations. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(1):282–5.
14. Stienstra S. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Publ Gr*. 2011;
15. Hu C, Ding H, Li Y, Pearson JA, Zhang X, Flavell RA, et al. NLRP3 deficiency protects from type 1 diabetes through the regulation of chemotaxis into the pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(36):11318–23.
16. Henao-Mejia J et al. I. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012;482:179–185.
17. Duewell P et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464:1357–1361.
18. Bauer C et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut*. 2010;59,:1192–1199.
19. Molyvdas A, Georgopoulou U, Lazaridis N, Hytiroglou P, Dimitriadis A, Foka P, et al. The role of the NLRP3 inflammasome and the activation of IL-1 β in the pathogenesis of chronic viral hepatic inflammation. *Cytokine*. 2018;(April).

20. Man SM, Karki R, Kanneganti TD. AIM2 inflammasome in infection, cancer, and autoimmunity: Role in DNA sensing, inflammation, and innate immunity. *Eur J Immunol.* 2016;46(2):269–80.
21. Dombrowski, Y., Peric, M., Koglin, S., Kammerbauer, C., Goss, C. A. D., Simanski M et al. Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. *Sci Transl Med.* 2011;3:82ra38.
22. Vanhove, W., Peeters, P. M., Staelens, D., Schraenen, A. V der G, J., Cleynen, I., De Schepper S et al. Strong upregulation of AIM2 and IFI16 inflammasomes in the mucosa of patients with active inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21:2673–2682.
23. Lozano-Ruiz, B., Bachiller, V., Garcia-Martinez, I., Zapater, P. G-, Hurtado, I., Moratalla, A., Gimenez P et al. Absent in melanoma 2 triggers a heightened inflammasome response in ascitic fluid macrophages of patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 2015;62:64–71.
24. Csak, T., Pillai, A., Ganz, M., Lippai, D., Petrasek, J., Park, J. K., Kodys K, Al. E. 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;34:1402– 1413.
25. Man SM, Zhu Q, Zhu L, Liu Z, Karki R, Malik A, et al. Critical Role for the DNA Sensor AIM2 in Stem Cell Proliferation and Cancer. *Cell.* 2015;
26. Wilson JE, Petrucelli AS, Chen L, Koblansky AA, Truax AD, Oyama Y, et al. Inflammasome-independent role of AIM2 in suppressing colon tumorigenesis via DNA-PK and Akt. *Nat Med.* 2015;
27. DeYoung KL, Ray ME, Su YA, Anzick SL, Johnstone RW, Trapani JA, et al. Cloning a novel member of the human interferon-inducible gene family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma. *Oncogene.* 1997;
28. Dihlmann S, Tao S, Echterdiek F, Herpel E, Jansen L, Chang-Claude J, et al. Lack of Absent in Melanoma 2 (AIM2) expression in tumor cells is closely associated with poor survival in colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 2014;
29. Balkwill F MAI. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001;357:539–545.
30. Kelly A, Houston SA, Sherwood E, Casulli J, Travis MA. Regulation of Innate and Adaptive Immunity by TGF β . *Adv Immunol.* 2017;134:137–233.
31. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med.* 2007;13(3):108–16.
32. Jiang H, Chess L, Hong J, Leonard C. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med.* 2006;354(11):1166–76. Available from:
33. 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 Inflamm.* 2011;2011.
34. Stoop JN, Van Der Molen RG, Baan CC, Van Der Laan LJW, Kuipers EJ, Kusters JG, et al. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 2005;
35. Manigold T, Racanelli V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(12):804–13.
36. DeJaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology.* 2006;117(3):289–300.
37. Long SA, Buckner JH. CD4+FOXP3+ Treg in human autoimmunity: more than a numbers game. *J Immunol.* 2012;187(5):2061–6.
38. Erdman SE, Poutahidis T. Cancer inflammation and regulatory T cells. *Int J Cancer.* 2010;127(4):768–79.
39. Robinson MW, Harmon C, Farrelly CO. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. 2016;(January):267–76.
40. *Hepatology AOF. edigraphic.com.* 2003;2(4).

41. Hernandez-gea V, Friedman SL. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu Rev.* 2011;
42. Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S et al. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792:746–756.
43. Αργεντου ΝΠ. ΠΥΘΜΙΣΤΙΚΑ Τ-ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ". 2014.
44. Manns MP, Buti M, Gane E, Pawlotsky J, Razavi H, Terrault N, et al. Hepatitis C virus infection.
45. World Health Organization. Hepatitis C [Internet]. [cited 2018 Aug 18]. Available from: www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c
46. Negro F et al. Extrahepatic morbidity and mortality of chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2015;149:1345–1360 (.
47. van der Meer AJ et al. Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *JAMA.* 2012;308:2584–2593.
48. Khakoo SI et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science (80-).* 2004;305:872–874.
49. Pestka JM et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single- source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104:6025–6030.
50. Gerlach JT et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4+ T- cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology.* 1999;117:933–941.
51. Nishitsuji H et al. Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells. *J Virol.* 2013;87:8169–8178.
52. World Health Organization. HIV/AIDS.
53. Konopnicki D, Mocroft A, de Wit S et al. Hepatitis B and HIV: prevalence, AIDS progression, response to highly active antiretroviral therapy and increased mortality in the EuroSIDA cohort. *AIDS.* 2005;19:593–601.
54. Kaspar MB, Sterling RK. Mechanisms of liver disease in patients infected with HIV. 2017;(figure 1):1–8.
55. Shepard CW, Finelli L AM. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:558–67.
56. Lemoine M, Serfaty L CJ. From nonalcoholic fatty liver to nonalcoholic steatohepatitis and cirrhosis in HIV-infected patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2012;25:10–16.
57. Maartens G, Celum C, Lewin SR, Town C, Africa S. Seminar HIV infection : epidemiology , pathogenesis , treatment , and prevention. *Lancet [Internet].* 2014;384(9939):258–71. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60164-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60164-1)
58. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K et al. Mechanisms of gastrointestinal CD4+ T-cell depletion during acute and early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2007;81:599–612.
59. Prendergast A, Prado JG, Kang YH et al. HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161+ Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells. *AIDS.* 2010;24:491–502.
60. Cosgrove C, Ussher JE, Rauch A et al. Early and nonreversible decrease of CD161++ /MAIT cells in HIV infection. *Blood.* 2013;121:951–61.
61. Zeng M, Southern PJ, Reilly CS et al. Lymphoid tissue damage in HIV-1 infection depletes naïve T cells and limits T cell reconstitution after antiretroviral therapy. *PLoS Pathog.* 2012;8:e1002437.
62. Del Cornò M, Cappon A, Donninelli G et al. HIV-1 gp120 signaling through TLR4 modulates innate immune activation in human macrophages and the biology of hepatic stellate cells. *J Leukoc Biol.* 2016;100:599–606.

63. Tuyama AC, Hong F, Saiman Y et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-1 infects human hepatic stellate cells and promotes collagen I and monocyte chemoattractant protein-1 expression: implications for the pathogenesis of HIV/hepatitis C virus-induced liver fibrosis. *Hepatology*. 2010;52:612–22.
64. Mehal WZ FS. The Role of Inflammation and Immunity in the Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Liver Immunol Clifton, NJ, USA Humana Press*. 2007;111–21.
65. Platt L, Easterbrook P, Gower E et al. Prevalence and burden of HCV co-infection in people living with HIV: A global systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2016;16:797–808.
66. Merchante N G-GJ, Gonzalez-Serrano M et al. Survival and prognostic factors of HIV-infected patients with HCV-related end-stage liver disease. *AIDS*. 2006;20:49–57.
67. Hernandez, M.D.; Sherman KE. HIV/HCV coinfection natural history and disease progression. *HIV AIDS*. 2011;6:478–482.
68. Kovacs, A.; Al-Harhi, L.; Christensen, S.; Mack, W.; Cohen, M.; Landay A. CD8+ T cell activation in women coinfecting with human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus. *J Infect Dis*. 2008;197:1402–1407.
69. Han, S.H.; Kim, S.U.; Kim, C.O.; Jeong S.J.; Park, J.Y.; Choi, J.Y.; Kim, D.Y.; Ahn SH., Song YG. HKH. et al. Abnormal liver stiffness assessed using transient elastography (Fibroscan) in HIV-infected patients without HBV/HCV coinfection receiving combined antiretroviral treatment. *PLoS One*. 2013;8:e52720.
70. Hasson, H.; Merli, M.; Galli, L.; Gallotta, G.; Carbone, A.; Messina, E.; Bagaglio, S.; Morsica G., Salpietro, S.; Castagna A. et al. Non-invasive fibrosis biomarkers—APRI and forms are associated with stiffness in HIV-monoinfected patients receiving antiretroviral drugs. *Liver Int*. 2013;33:1113–1120.
71. Szabo, G.; Mandrekar, P.; Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin Liver Dis*. 2007;27,:339–350.
72. Mastroianni CM, Lichtner M, Mascia C, Zuccalà P. Molecular Mechanisms of Liver Fibrosis in HIV / HCV Coinfection. 2014;9184–208.
73. Gressner, A.M.; Weiskirchen, R.; Breitkopf, K.; Dooley S. Roles of TGF- β in hepatic fibrosis. *Front Biosci*. 2002;7:793–807.
74. Artlett, C.M.; Sassi-Gaha, S.; Rieger, J.L.; Boesteanu, A.C.; Feghali-Bostwick, C.A.; Katsikis PD, In. The inflammasome activating caspase-1 mediates fibrosis and myofibroblast differentiation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2011;63:3563–3574.
75. Germanidis G, Argentou N, Hytiroglou P, Vassiliadis T, Patsiaoura K, Germentis AE, et al. Liver FOXP3 and PD1/PDL1 expression is down-regulated in chronic HBV hepatitis on maintained remission related to the degree of inflammation. *Front Immunol*. 2013;4(JUL):1–9.
76. S. Lebel-Binay, A. Berger, F. Zinzindohoue, P. Cugnenc, N. Thiounn, W.H. Fridman FP. Interleukin-18: biological properties and clinical implication. *Eur Cytokine Netw*. 2000;11:15–26.
77. M.O. Lee, Y.H. Choi, E.C. Shin, H.J. Kang, Y.M. Kim SYJ et al. Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J J Hepatol*. 2002;37:380–386.
78. Haitao G, Jianmei G, Debra J JP et al. HIV-1 Infection Induces Interleukin-1 β Production via TLR8 Protein-dependent and NLRP3 Inflammasome Mechanisms in Human Monocytes . *J Biol Chem*. 2014;289:21716–26.
79. Veenhuis RT1, Astemborski J2, Chattergoon MA1, Greenwood P1, Jarosinski M1, Moore RD1, Mehta SH2 CA. Systemic Elevation of Proinflammatory Interleukin 18 in HIV/HCV Coinfection versus HIV or HCV Monoinfection. *Clin Infect Dis*. 2017;64(5):589–96.
80. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease

- progression. *Nature*. 2006;443(7109):350–4.
81. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1559–82.
 82. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
 83. Negash AA, Ramos HJ, Crochet N, Lau DTY, Doehle B, Papis N, et al. IL-1 β Production through the NLRP3 Inflammasome by Hepatic Macrophages Links Hepatitis C Virus Infection with Liver Inflammation and Disease. 2013;9(4):1–13.
 84. Taborda NA, Hernandez JC, Rugeles T. HIV replication is associated to inflammasomes activation , IL-1 β , IL-18 and caspase-1 expression in GALT and peripheral blood. 2018;1–14.
 85. Chevalier MF, Weiss L. The split personality of regulatory T cells in HIV infection. 2018;121(1):29–38.
 86. Holmes D, Knudsen G, Mackey-cushman S, Su L. FoxP3 Enhances HIV-1 Gene Expression by Modulating NF κ B Occupancy at the Long Terminal Repeat in Human T Cells * \square . 2007;282(22):15973–80.
 87. Urbani S, Amadei B, Tola D, Pedrazzi G, Sacchelli L, Cavallo MC, et al. Restoration of HCV-specific T cell functions by PD-1 / PD-L1 blockade in HCV infection : Effect of viremia levels and antiviral treatment q. 2008;48:548–58.