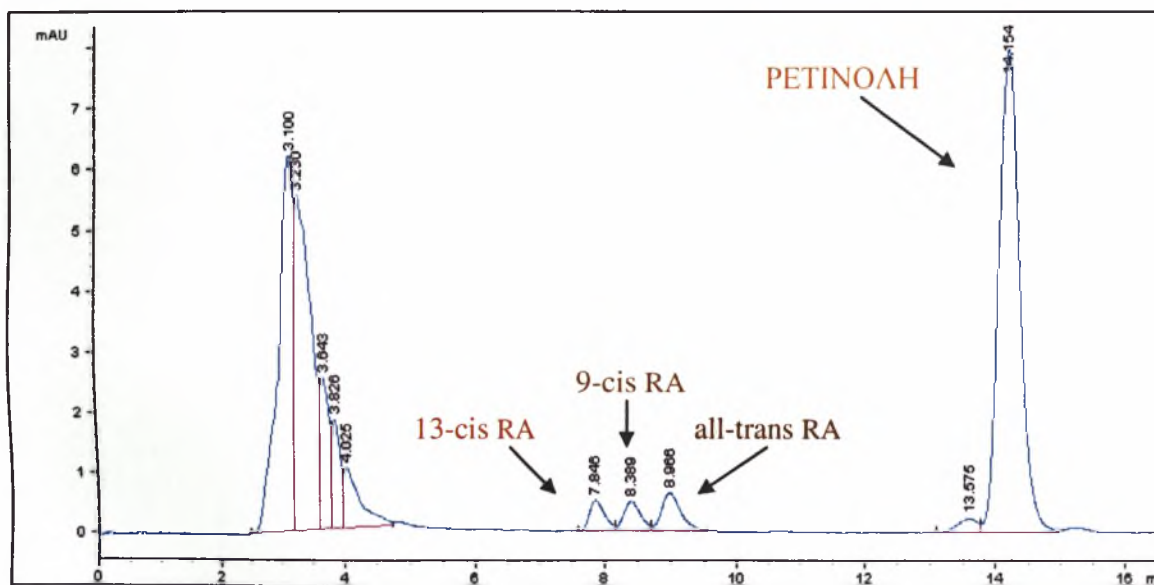


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



Τα επίπεδα της ρετινόλης και των ισομερών του ρετινοϊκού οξέος σε
κυρρωτικούς αρουραίους

Μώκου Ευσταθία

Λάρισα 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4655/1

Ημερ. Εισ.: 14-10-2005

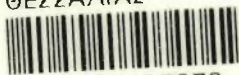
Δωρεά: Π.Θ.

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2005

ΜΩΚ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087878

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	4
I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
II. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
II.1 Βιταμίνη Α	
II.1.a. Διατροφικές πηγές βιταμίνης Α.....	6
II.1.b. Βιταμίνη Α και οι μεταβολίτες της.....	7
II.1.c. Φυσιολογικές λειτουργίες της βιταμίνης Α.....	8
II.1.d. Δεσμευτικές πρωτεΐνες ρετινοειδών.....	9
II.1.e. Μεταγραφική δραστηριότητα των ρετινοειδών.....	11
II.1.f. Εντερική απορρόφηση και κατεργασία των ρετινοειδών.....	13
II.1.g. Μεταφορά ρετινοειδών και αποθήκευση.....	14
II.2 Κίρρωση	
II.2.a. Ήπαρ.....	17
II.2.b. Λειτουργίες ήπατος.....	19
II.2.c. Κίρρωση.....	19
II.2.d. Παθογένεια και μορφές της κίρρωσης.....	20
II.2.e. Ταξινόμηση κίρρωσης.....	21
II.2.f. Κίρρωση ως επακόλουθο της χολικής απόφραξης.....	23
II.2.g. Παθοφυσιολογία της κίρρωσης.....	23
II.2.h. Εμπλοκή της βιταμίνης Α στην κίρρωση.....	24
II.2.i. Κλινική εικόνα.....	25

II.3.Σκοπός της πειραματικής μελέτης.....	27
---	----

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

III.1. Πειραματόζωα.....	28
III.2. Χειρουργικές επεμβάσεις.....	29
III.2.a. Αιμοληψία - Απόφραξη χοληδόχου πόρου.....	29
III.2.b. Χορήγηση βιταμίνης Α.....	31
III.3.Ανάλυση δειγμάτων	31
III.3.a. Σύστημα HPLC.....	32
III.3.b. Επεξεργασία δειγμάτων.....	33
III.3.c. Προσδιορισμός ρετινόλης.....	34
III.4. Ανάκτηση.....	35
III.5. Πρότυπες καμπύλες	36

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....

39

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....

42

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.....

48

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.....

49

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3.....

52

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....

53

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής της σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του ΤΕΙ Λάρισας. Στόχος ήταν το στήσιμο εκτροφείου πειραματόζωων, η διαμόρφωση πειραματικού χειρουργείου με σκοπό τη δημιουργία κίρρωσης σε αρουραίους και τέλος, η καταγραφή των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών της ρετινόλης στα ζώα με κίρρωση σε σύγκριση με τα φυσιολογικά.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Μουλά Ανάργυρο, Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Ζωικής Παραγωγής, για την υπόδειξη του θέματος, την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε σε όλο το πέρασ της πειραματικής εργασίας και για τις χρήσιμες συμβουλές και διορθώσεις, που μου υπέδειξε κατά τη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Επίσης ευχαριστώ τους, κ. Τεπετέ Κωνσταντίνο, Επίκουρο Καθηγητή Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Ζαχαρούλη Δημήτριο Λέκτορα Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και κ. Γιαγκούδη Αντίγονο Παθολόγο υποψήφιο Διδάκτορα Ιατρικής για την πολύτιμη βοήθειά τους στην διεκπεραίωση των χειρουργικών επεμβάσεων και των αιμοληψιών.

Τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής είναι: ο κ. Κομιώτης Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και ο κ. Κουρέτας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μώκου Ευσταθία

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βιταμίνη Α παίζει σημαντικό ρόλο σε αρκετές βιολογικές δραστηριότητες του οργανισμού όπως η όραση, η αναπαραγωγή, επιθηλιακή ομοιοστάση, η εμβρυογένεση, η αναδιοργάνωση των οστών και την ακεραιότητα του αμυντικού συστήματος. Το ήπαρ είναι το κύριο όργανο, που εκτελεί το μεταβολισμό και την αποθήκευση της βιταμίνης Α. Στην παρούσα διπλωματική εργασία στήθηκε ένα πειραματικό μοντέλο εκτροφής και δημιουργίας κίρρωσης σε αρουραίους, με σκοπό τη μελέτη των επιπέδων της ρετινόλης και των οξέων σε κίρρωτικούς αρουραίους και συγκρίθηκαν με τα επίπεδα της ρετινόλης σε φυσιολογικούς αρουραίους.

Η μέτρηση της ρετινόλης έγινε με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης υπό συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης με ανίχνευση υπεριώδους ορατού (UV). Η ταχύτητα ροής είναι 1ml/min και η πίεση κυμαίνεται στα 120bar. Η σύσταση της κινητή φάσης (διαλύτης) είναι 15% ρυθμιστικό διάλυμα Buffer (0,1 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 0,02 M CH_3COOH) pH 5,4, 7% THF, 43% CH_3CN και 35% MeOH. Το 13-cis ρετινοϊκό οξύ, το 9-cis ρετινοϊκό οξύ, το all-trans ρετινοϊκό οξύ και η ρετινόλη εκλούνται στα 7,8min, 8,3min, 8,9min και 14,2 min αντίστοιχα. Ο UV ανιχνευτής είναι ρυθμισμένος στα 350nm.

Παρατηρήθηκε μία μείωση στο ποσό της ρετινόλης στους κίρρωτικούς αρουραίους σε σχέση με τους φυσιολογικούς. Τα αποτελέσματα δεν είναι στατιστικά σημαντικά λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων, άλλα δίνουν το ερέθισμα για πιο εκτεταμένη μελέτη του μεταβολισμού της ρετινόλης στην κίρρωση.

II. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

II.1 ΒΙΤΑΜΙΝΗ Α

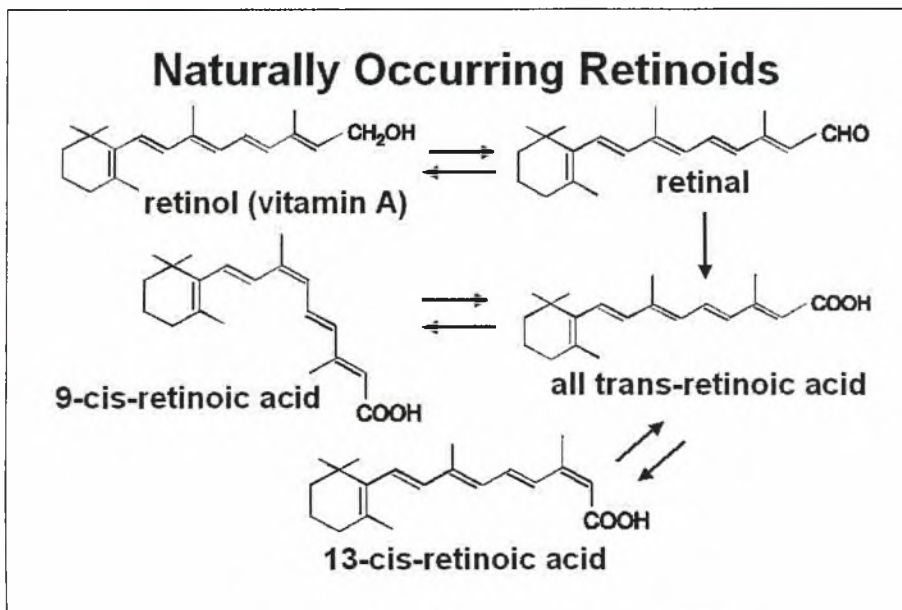
II.1.a. Διατροφικές πηγές βιταμίνης Α

Ο όρος βιταμίνη Α αναφέρεται σε μια ομάδα από διαφορετικώς ενεργά παράγωγα ακόρεστων υδρογονανθράκων συμπεριλαμβάνοντας την ρετινόλη, τους μεταβολίτες της και τα καροτενοειδή (1). Η βιταμίνη Α αναφέρεται με τον όρο *ρετινοειδή*, ο οποίος συμπεριλαμβάνει τους μεταβολίτες της.

Τα ρετινοειδή είναι απαραίτητα θρεπτικά μικροστοιχεία (το σώμα μας δεν μπορεί να τα συνθέσει και χρειάζονται σε μικροποσότητες) και πρέπει να προσληφθούν από την τροφή. Υπάρχουν δύο πηγές ρετινοειδών στη διατροφή. Η πρώτη είναι η προβιταμίνη Α των καροτενοειδών, η οποία αποκτάτε από σκούρα πράσινα και χρωματιστά λαχανικά και η δεύτερη είναι η προσχηματισμένη βιταμίνη Α, η οποία βρίσκεται στα προϊόντα ζωικής προέλευσης, όπως το κρέας και τα γαλακτοκομικά (όπου τα ρετινοειδή έχουν σχηματιστεί από τα φρούτα και τα λαχανικά που καταναλώθηκαν από τα ζώα). Τα ρετινοειδή βρίσκονται κυρίως με τη μορφή ρετινόλης και εστέρες ρετινόλης. Τα ζώα είναι ικανά να αποθηκεύουν τα ρετινοειδή στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό σε άλλους ιστούς. (2, 3).

II.1.b. Βιταμίνη Α και μεταβολίτες της

Η ρετινόλη βρίσκεται στον οργανισμό ως ελεύθερη αλκοόλη, ή με τη μορφή εστέρων (κυρίως με τη μορφή του παλμιτικού εστέρα (Εικόνα 1.1)).



Εικόνα 1.1. Σχηματική απεικόνιση ρετινοειδών.

Η ρετινόλη είναι ακόρεστη αλκοόλη, σχεδόν άχρωμη, λιποδιαλυτή, με μακριά αλυσίδα με πέντε διπλούς δεσμούς, ευαίσθητη στο οξυγόνο και την υπεριώδη ακτινοβολία (4). Εφόσον το μόριο της βιταμίνης Α περιέχει διπλούς δεσμούς μπορεί να υπάρξει σε διαφορετικές γεωμετρικά ισομερείς μορφές. Η ρετινόλη και οι εστέρες της ρετινόλης είναι οι πιο άφθονες μορφές που απαντούνται στον οργανισμό.

Όταν εστεροποιείται το υδροξύλιο της all-trans ρετινόλης δημιουργούνται οι εστέρες της ρετινόλης. Οι πιο άφθονοι εστέρες είναι ο παλμιτικός, ελαϊκός και λινολικός εστέρας. Ο οξικός εστέρας χρησιμοποιείται ως διατροφικό υποκατάστατο, αλλά αυτός ο μικρού μήκους αλυσίδας εστέρας δεν υπάρχει στη φύση. Σε περιόδους ανάγκης ρετινοειδών ή κατά την πρόσληψη από την τροφή μέσω εντέρου, ο εστέρας υδρολύεται σε ρετινόλη. Η δημιουργία των ρετινυλικών εστέρων κάνει τα ρετινοειδή λιγότερο τοξικά και επιτρέπει την αποθήκευση τους μέσα σε ενδοκυτταρικά σταγονίδια λίπους.

Η ρετινόλη μπορεί να οξειδωθεί σε ρετινάλη, η οποία όπως το 11-cis ισομερές είναι βασικό για την όραση (5,6). Σε όλους τους υπόλοιπους ιστούς, η ρετινόλη λειτουργεί ως διαμεσολαβητής για την σύνθεση των ρετινοϊκών οξέων. Το all-trans

και το 9-cis ισομερές είναι μεταγραφικά ενεργά ρετινοειδή και πιστεύεται να ευθύνονται για τις ιδιότητες γονιδιακής ρύθμισης των ρετινοειδών μέσα στα κύτταρα και τους ιστούς.(7,8).

Η συγκέντρωση των ρετινοϊκών οξέων μέσα στους ιστούς είναι γενικά χαμηλή και είναι συνήθως 100-1000 φορές λιγότερη από την ρετινόλη (2,3). Το all-trans ρετινοϊκό οξύ δημιουργείται μέσω αντίστροφης οξειδωσης από την all-trans ρετινάλη. Το all-trans ρετινοϊκό οξύ μπορεί να ισομερειωθεί μη-εξυμικά σε 9-cis ή 13-cis ρετινοϊκό οξύ (3). Είναι όμως πιθανόν το 9-cis ρετινοϊκό οξύ να δημιουργηθεί από την 9-cis ρετινόλη μέσω 2 σταδίων οξειδωσης (9,10). Τα ρετινοϊκά οξέα δημιουργούνται έξω από τον πυρήνα και αφού εισέλθουν στον πυρήνα ενεργοποιούν τους πυρηνικούς ορμονικούς υποδοχείς (7,8). Αυτή η σύνδεση οδηγεί στην μεταγραφή των γονιδίων στόχων των ρετινοειδών. Αν και το 13- cis ρετινοϊκό οξύ υπάρχει φυσικά στο αίμα και στους ιστούς (2,3) κατέχει πολύ λιγότερη μεταγραφική δράση από ότι το all-trans και το 9-cis ρετινοϊκό οξύ (7).

II.1.c. Φυσιολογικές λειτουργίες βιταμίνης A

Οι φυσιολογικές λειτουργίες της βιταμίνης A είναι οι παρακάτω:

1. Συμμετέχει στη διαδικασία της όρασης και συγκεκριμένα στη μετατροπή του φωτεινού ερεθίσματος σε νευρικό ερέθισμα.
2. Επηρεάζει την σύνθεση των γλυκοζαμινοπολυσακχαριτών και των βλεννοπρωτεϊνών. Οι ουσίες αυτές είναι συστατικά της οργανικής ουσίας των οστών. Επίσης παίζει ρόλο στην κανονική ανάπτυξη των οστών ελέγχοντας τη δραστηριότητα των οστεοκλαστών και οστεοβλαστών.
3. Χρειάζεται για τη διατήρηση των επιθηλιακών ιστών.
4. Συμμετέχει στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων: α) δρώντας στον πυρήνα, επηρεάζει την έκφραση γονιδίων, β) επηρεάζοντας τη σύνθεση των κυτταρικών γλυκοπρωτεϊνών.
5. Ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα
6. Είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία των αναπαραγωγικών οργάνων τόσο των αρσενικών, όσο και των θηλυκών ζώων.
7. Είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

8. Συμμετέχει στην παραγωγή ερυθρών κυττάρων του αίματος.

II.1.d. Δεσμευτικές πρωτεΐνες ρετινοειδών

Για τη διαλυτοποίηση, την προστασία και την αποτοξίνωση των ρετινοειδών στο ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό περιβάλλον, η ρετινόλη, η ρετινάλη και τα οξέα συνήθως βρίσκονται συνδεδεμένα με ειδικές δεσμευτικές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές συνοψίζονται στον Πίνακα 1.1. Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες, και πιο συγκεκριμένα η δεσμευτική πρωτεΐνη της ρετινόλης (retinol-binding protein, RBP), η εσωκυτταρική δεσμευτική πρωτεΐνη των φωτοϋποδοχέων της ρετινόλης (interphotoreceptor matrix retinoid-binding protein, IRBP), η δεσμευτική πρωτεΐνη της επιδιδυμίδας του ρετινοϊκού οξέος (epididymal retinoic acid-binding protein, ERABP), και η β-trace βρίσκονται μόνο στα εξωκυττάρια υγρά, αν και υπολείμματα βρίσκονται ενδοκυτταρικά.. Από τις ενδοκυτταρικά συνδεόμενες πρωτεΐνες, μερικές συνδέονται μόνο με ρετινοϊκά οξέα [cellular retinoic acid-binding protein, τύπος I (CRABP I) και cellular retinoic acid-binding protein, τύπος II (CRABP II)], άλλες συνδέονται με ρετινόλη και ρετινάλη [cellular retinol-binding protein, τύπος I (CRBP I) και cellular retinol-binding protein, τύπος II (CRBP II)], και άλλες συνδέονται με ρετινόλη [cellular retinol-binding protein, τύπος III (CRBP III) και cellular retinol-binding protein, τύπος IV (CRBP IV)] και άλλες με ρετινάλη [cellular retinal-binding protein (CRALBP)]. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να ομαδοποιηθούν σύμφωνα με την οικογένεια πρωτεϊνών στην οποία ανήκουν. Οι RBP, ERABP και η β-trace ανήκουν στην οικογένεια των λιποκαλινών (11,12,13). Οι CRBP I, II, III, και IV καθώς και οι CRABP I και II CRALBP ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών που συνδέονται με λιπαρά οξέα (14-18). Η CRALBP ανήκει στην οικογένεια CRAL-TRIO (19,20).

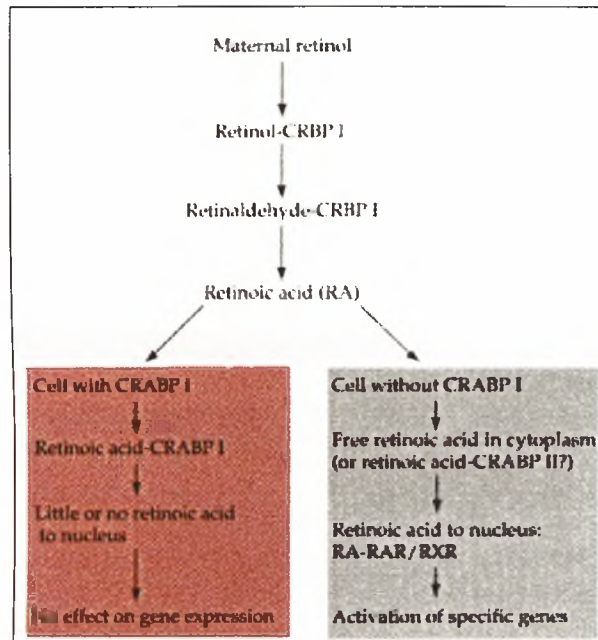
Κάθε μια από τις δεσμευτικές πρωτεΐνες έχει ένα συγκεκριμένο ρόλο για να διευκολύνει τη μεταφορά των ρετινοειδών και/ή το μεταβολισμό (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1. Δεσμευτικές πρωτεΐνες ρετινοϊδών.

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	LIGAND(S)	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	ΙΣΤΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ
ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ			
RBP (retinol-binding protein)	Ρετινόλη	Κινητοποίηση των ηπατικών αποθεμάτων και μεταφορά στο αίμα	Ήπαρ, λιπώδης ιστός, κ.α.
ERABP (epididymal retinoic acid-binding protein)	Ρετινοϊκό οξύ	Μεταφορά ρετινοϊκού οξέος στην επιδιδυμίδα	Επιδιδυμίδα, κ.α.
B-Trace (lipocalin-type prostaglandin D synthase)	Ρετινοϊκό οξύ	Σύνδεση ρετινοϊκού οξέος στο εγκεφαλονωτιαίο μυελό (CSF)	Εγκέφαλο
IRBP (interphotoreceptor matrix retinoid-binding protein)	Ρετινόλη και 11-cis- ρετινάλη	Ειδικεύεται στην παλινδρόμηση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον κύκλο της όρασης	Μάτι
ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ			
CRALBP (cellular retinal-binding protein)	Ρετινόλη και 11-cis- ρετινάλη	Ειδικεύεται στην σύνδεση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον κύκλο της όρασης	Μάτι
CRBP I (cellular retinol-binding protein, type I)	Ρετινόλη και Ρετινάλη	Κυτταρική πρόσληψη ρετινοειδών, μεταφορά και μεταβολισμό	Ήπαρ, όρχεις, νεφρό, πνεύμονες
CRBP II (cellular retinol-binding protein, type II)	Ρετινόλη και Ρετινάλη	Πρόσληψη ρετινόλης και μεταβολισμό της στο βλεννογόνο του εντέρου	Λεπτό έντερο
CRBP III (cellular retinol-binding protein, type III)	Ρετινόλη	Κυτταρική πρόσληψη ρετινόλης, μεταφορά και μεταβολισμό	Καρδιά, μαστός, λίπος
CRBP IV (cellular retinol-binding protein, type IV)	Ρετινόλη	Κυτταρική πρόσληψη ρετινόλης, μεταφορά και μεταβολισμό	Ήπαρ, νεφρό, καρδιά, κ.α.
CRABP I (cellular retinoic acid-binding protein, type I)	Ρετινοϊκό οξύ και μεταβολίτες	Μεταφορά και μεταβολισμό ρετινοϊκών οξέων μέσα στο κύτταρο	Στους περισσότερους ιστούς
CRABP II (cellular retinoic acid-binding protein, type II)	Ρετινοϊκό οξύ και μεταβολίτες	Μεταβολισμό ρετινοϊκών οξέων, μεταφορά από και προς τον πυρήνα και εμπλοκή στην μεταγραφή	Δέρμα, μήτρα, ωοθήκες

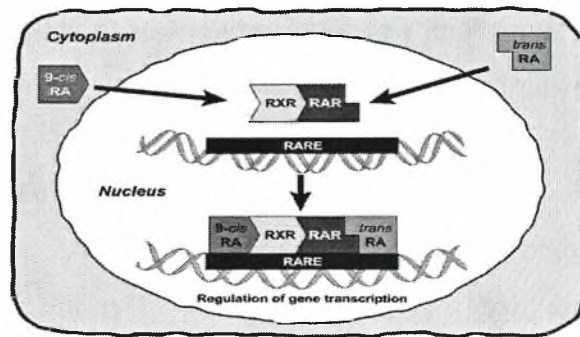
II.1.e. Μεταγραφική δραστηριότητα ρετινοειδών

Τα ρετινοειδή είναι απαραίτητα στην αναπαραγωγή συμπεριλαμβανομένου τη σπερματογένεση, τη σύλληψη, το σχηματισμό του πλακούντα, την εμβρυογένεση τη διαδικασία, η οποία έχει σχέση με την κυτταρική διαφοροποίηση, όπως αναγέννηση των οστών, τη διαφοροποίηση του επιθηλίου και του δέρματος, και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (21). Οι δράσεις αυτές των ρετινοειδών διαμεσολαβούνται μέσω των all-trans- ρετινοϊκού οξέος και 9-cis ρετινοϊκού οξέος τα οποία επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων που επηρεάζονται από τα ρετινοειδή (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Έκφραση γονιδίων από την δράση ρετινοϊκών οξέων.

Τα ρετινοϊκά οξέα μπορούν και συνδέονται σε τρεις υποδοχείς ρετινοϊκών οξέων (RAR α , RAR β και RAR γ) και σε τρεις ρετινοειδής X υποδοχείς (RXR α , RXR β και RXR γ), οι οποίοι στη συνέχεια ενεργοποιούνται και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων (6, 7, 35, 36). Το all-trans ρετινοϊκό οξύ συνδέεται εύκολα και άμεσα με τους τρεις RAR και με τους τρεις RXR, ενώ το 9-cis συνδέεται καλά μόνο με τους RXR υποδοχείς (Εικόνα 1.3). Έτσι, το all-trans ρετινοϊκό οξύ συνήθως θεωρείται ότι συνδέεται με τους RAR, ενώ το 9-cis με τους RXR υποδοχείς (7,8,22,23). Οι λειτουργίες των υποδοχέων φαίνονται στον πίνακα 1.2.



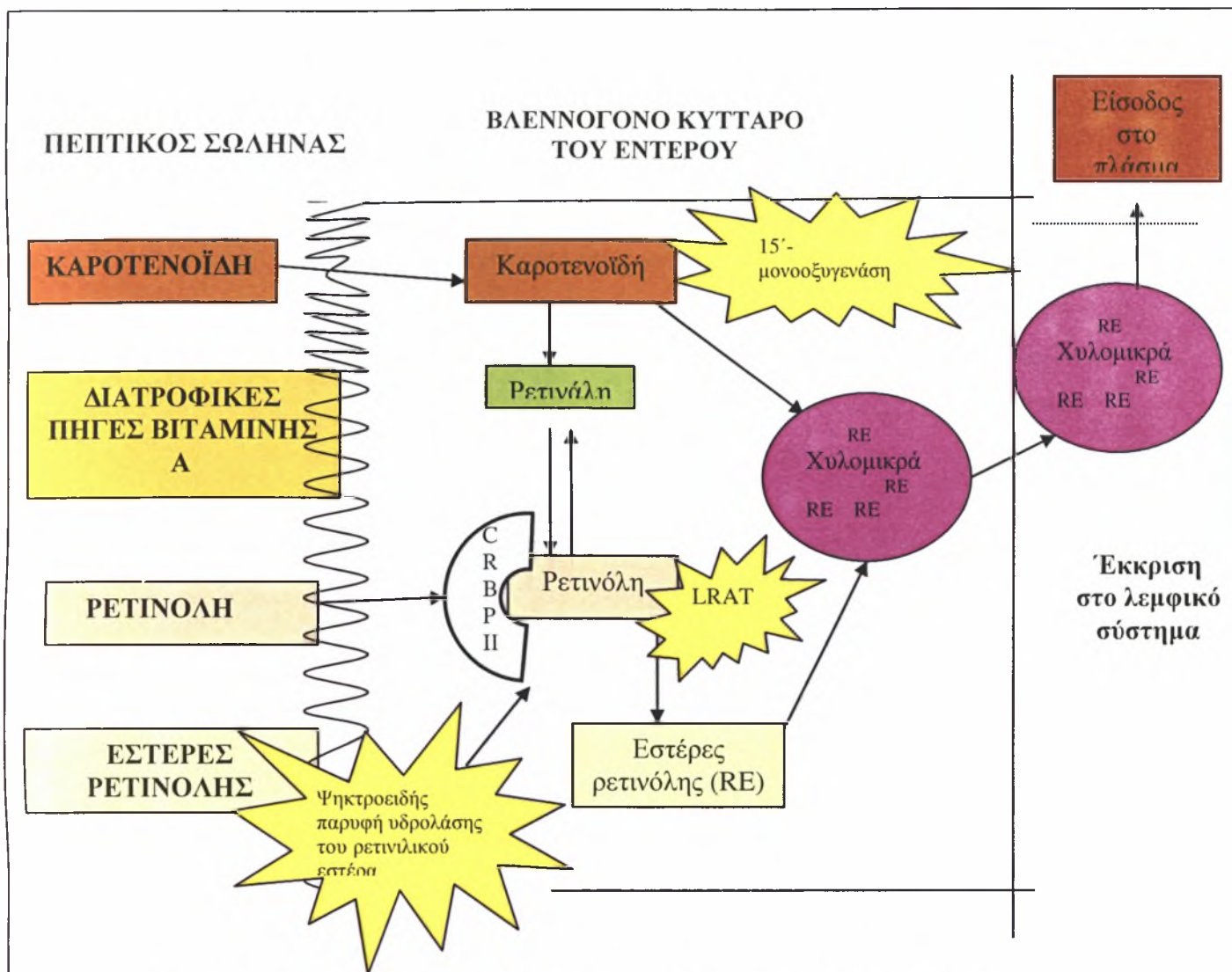
Εικόνα 1.2. Υποδοχείς ρετινοειδών

Πίνακας 1.2. Λειτουργίες υποδοχέων.

ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ	ΡΕΤΙΝΟΪΚΑ ΟΞΕΑ LIGAND(S)	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ
Υποδοχέας ρετινοϊκού οξέος α (RARα)	All-trans και 9-cis	Μεταγραφικός διαμεσολαβητή, ετεροδιμερίζεται με τον RXR
Υποδοχέας ρετινοϊκού οξέος β (RARβ)	All-trans και 9-cis	Μεταγραφικός διαμεσολαβητή, ετεροδιμερίζεται με τον RXR
Υποδοχέας ρετινοϊκού οξέος γ (RARγ)	All-trans και 9-cis	Μεταγραφικός διαμεσολαβητή, ετεροδιμερίζεται με τον RXR
Υποδοχέας ρετινοειδών X α (RXRα)	9-cis	Μεταγραφικός διαμεσολαβητή, ομοδιμερίζεται, ετεροδιμερίζεται με RAR, TR, VDR, PPAR, κ.α.
Υποδοχέας ρετινοειδών X β (RXRβ)	9-cis	Μεταγραφικός διαμεσολαβητή, ομοδιμερίζεται, ετεροδιμερίζεται με RAR, TR, VDR, PPAR, κ.α.
Υποδοχέας ρετινοειδών XΓ (RXRγ)	9-cis	Μεταγραφικός διαμεσολαβητή, ομοδιμερίζεται, ετεροδιμερίζεται με RAR, TR, VDR, PPAR, κ.α.

II.1.f. Εντερική απορρόφηση και κατεργασία των ρετινοειδών

Τα ρετινοειδή προσλαμβάνονται σε μορφή πρόδρομης βιταμίνης Α (κυρίως ως ρετινόλη και εστέρες της ρετινόλης) ή με τη μορφή καροτενοειδών (π.χ. β-καροτένιο, α-καροτένιο ή β-κρυπτοξανθίνη). Τα καροτενοειδή εισάγονται στα εντερικά κύτταρα του βλεννογόνου και είτε πακετάρονται κατευθείαν μέσα στα νεοσυντιθέμενα χυλομικρά ή διασπώνται από την 15'-μονοοξυγενάση και αποδίδουν δύο μόρια ρετινάλης. Στη συνέχεια, η ρετινάλη μπορεί να μετασηματιστεί ενζυμικά σε ρετινόλη με τη δράση της εντερική ρεδοκτάσης της ρετινάλης. Οι ρετινυλικοί εστέρες που προσλαμβάνονται από την τροφή δεν είναι ικανοί να περάσουν την εντερική ψυκτροειδή παρυφή και πρέπει πρώτα να υδρολυθούν σε ελεύθερη ρετινόλη είτε μέσω της παγκρεατικής υδρολάσης ρετινυλικού εστέρα ή μέσω της υδραλάσης του ρετινυλικού εστέρα που βρίσκεται στην ψυκτροειδή παρυφή. Αυτή η ρετινόλη, όπως και η ελεύθερη ρετινόλη διασχίζει εύκολα την ψυκτροειδή παρυφή του εντέρου και συνδέεται με την CRBP II (12,16). Η πρωτεΐνη αυτή μπορεί επίσης με την ελεύθερη ρετινάλη από το προηγούμενο στάδιο. Αφού συνδεθεί η ρετινόλη με την CRBP II εστεροποιείται προς σχηματισμό ρετινυλικών εστέρων μέσω της δράσης της λεκιθίνης: ακυλοτρανσφεράση της ρετινόλης (LRAT) (12,15,24). Αυτοί οι εστέρες ενσωματώνονται μέσω απροσδιόριστων μηχανισμών μέσα στα νεοσυντιθέμενα χυλομικρά. μαζί με τα άλλα λιπίδια., αυτά εκκρίνονται στο λεμφικό σύστημα και μετέπειτα εισέρχονται στην κυκλοφορία, οι περισσότεροι εστέρες προσλαμβάνονται από το ήπαρ, αλλά ένα σημαντικό ποσοστό προσλαμβάνεται από περιφερικούς ιστούς (Σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1. Σχηματική απεικόνιση απορρόφησης και κατεργασίας των ρετινοϊδών.

II.1.g Μεταφορά ρετινοειδών και αποθήκευση

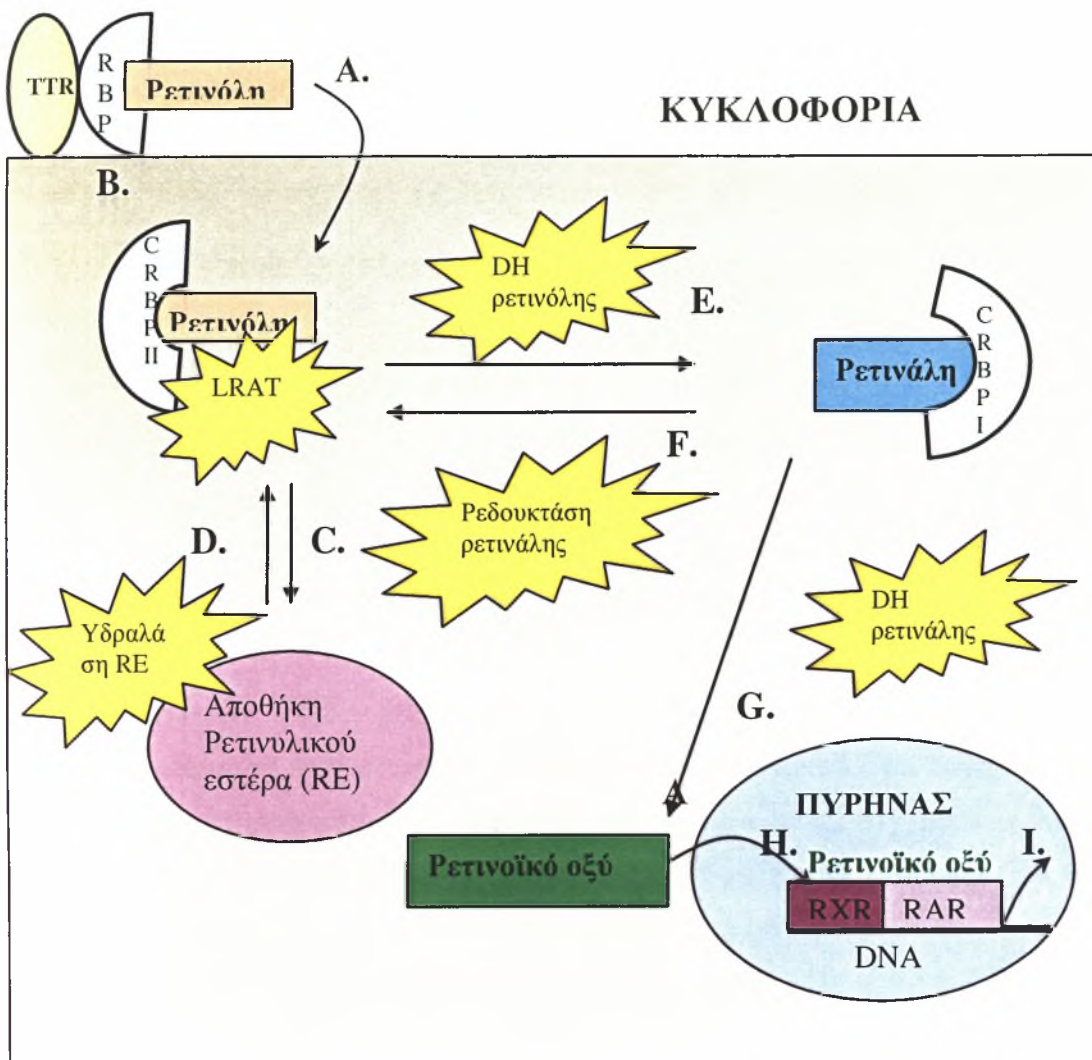
Οι ρετινυλικοί εστέρες εισέρχονται στην κυκλοφορία και προσλαμβάνονται από τους ιστούς. Το 70% των εστέρων αυτών προσλαμβάνονται από το ήπαρ, και το υπόλοιπο από τους περιφερικούς ιστούς (25). Πριν από την απορρόφηση από τους ιστούς, ο εστέρας της ρετινόλης υφίσταται υδρόλυση. Στο ήπαρ, η διαδικασία της υδρόλυσης συμβαίνει καθώς το κατάλοιπο σωματίδιο καθαρίζεται από ηπατοκύτταρα (ηπατικά παρεγχυματικά κύτταρα) (2,3) αλλά δεν είναι γνωστό ποια ένζυμα συμμετέχουν σε αυτή την διαδικασία. Έχει προταθεί ότι το ένζυμο που συμμετέχει

στην υδρόλυση στους περιφερικούς ιστούς είναι η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LP), διευκολύνοντας την πρόσληψη ρετινόλης (26,27). Η ελεύθερη ρετινόλη προσλαμβάνεται από κύτταρα που συνδέονται άμεσα με την CRBP I. Έχει προταθεί ότι η CRBP I διευκολύνει/ βελτιστοποιεί τη διαδικασία πρόσληψης της ρετινόλης (15,28).

Επειδή η δράση των ρετινοειδών είναι σημαντική για την καλή υγεία, τα μεγαλύτερα ζώα έχουν αναπτύξει ικανότητα αποθήκευσης των ρετινοειδών ως ρετινυλικούς εστέρες στο ήπαρ (2,3). Αφού προσληφθούν τα ρετινοειδή από το ήπαρ, είτε εκκρίνονται πίσω στην κυκλοφορία συνδεδεμένα με RBP είτε μεταφέρονται στα αστεροειδή ηπατικά κύτταρα για αποθήκευση (2,3,29). Μέσα στα αστεροειδή κύτταρα, τα ρετινοειδή αποθηκεύονται με τη μορφή εστέρων σε μεγάλα λιπιδιακά σταγονίδια, τα οποία είναι χαρακτηριστικά των κυττάρων αυτών. Έτσι, μετά την πρόσληψη και την υδρόλυση της ρετινόλης, πρέπει η ρετινόλη να υποστεί εστεροποίηση μέσω της δράσης LRAT πριν την αποθήκευση στα αστεροειδή κύτταρα.

Η σημαντικότερη αποθήκη ρετινοειδών είναι το ήπαρ, αν και άλλοι ιστοί συμπεριλαμβανομένου του ματιού, των πνευμόνων και του δέρματος έχουν την ικανότητα αποθήκευσης ρετινοειδών, μολονότι βρίσκονται σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με το ήπαρ. Έχει υπολογιστεί σε υγιή οργανισμό, το 60-80% των ρετινοειδών αποθηκεύεται στο ήπαρ και το 70% από αυτά στα αστεροειδή κύτταρα (2,3,29,30). Όταν ο οργανισμός χρειαστεί ρετινοειδή, οι εστέρες αυτοί υδρολύονται από την υδρολάση του ρετινυλικού εστέρα (REH) σε ελεύθερη ρετινόλη.

Το σύμπλοκο ρετινόλη-RBP εκκρίνεται από το ήπαρ στο κυκλοφορικό σαν μέσο παράδοσης της ρετινόλης στους περιφερικούς ιστούς (11,31). Άλλοτε η ρετινόλη παραδίδεται από το σύμπλοκο ρετινόλη-RBP-TTR, προσλαμβάνεται από τα κύτταρα και είτε αποθηκεύεται μέσα στα κύτταρα ως ρετινυλικός εστέρα είτε οξειδώνεται σε ρετινοϊκό οξύ, το οποίο ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων. Η διαδικασία αυτή φαίνεται στην εικόνα.1.4.



Εικόνα 1.4. Μεταφορά ρετινοειδών και αποθήκευση. Η ρετινόλη αφήνεται στα κύτταρα από το κυκλοφορικό μετά από έκκριση από το ήπαρ μέσω του συμπλόκου ρετινόλη-RBP. Στο κυκλοφορικό, το σύμπλοκο αυτό αλληλεπιδρά με την τρανσθυρετίνη (TTR) και κυκλοφορεί σαν τριμερές ρετινόλη-RBP-TTR (A). όταν φτάσει στα κύτταρα η ρετινόλη, εισέρχεται μέσα σε αυτά όπου συνδέεται άμεσα με μια από τις πρωτεΐνες σύνδεσης. Στους περισσότερους ιστούς, η πρωτεΐνη σύνδεσης που συμμετέχει είναι η CRBP I, επειδή εκράζεται ευρέως από τον οργανισμό. Ωστόσο, οι άλλες τρεις μορφές της CRBP μπορεί να παίζουν ρόλο σε αυτή την διαδικασία στους ιστούς όπου εκφράζονται (B). Σύμφωνα με την πρόσληψη των κυττάρων, υπάρχουν δύο πιθανά αποτελέσματα για την ρετινόλη. Μπορεί να εστεροποιηθεί από την λεκιθίνη: ακυλοτρανσφεράση της ρετινόλης (LRAT) (C) και να αποθηκευτεί με τη μορφή εστέρων (RE) στα λιπιδιακά σταγονίδια των κυττάρων. Σε περιόδους που το κύτταρο χρειάζεται ρετινόλη, η υδρολάση του ρετινυλικού εστέρα ελευθερώνει αποθηκευμένη ρετινόλη (D). Εναλλακτικά, η ρετινόλη μπορεί να ενεργοποιηθεί από την ρετινολική δεϋδρογονάση (Retinol DH), η οποία την οξειδώνει προς σχηματισμό ρετινάλης (E). αυτό το στάδιο είναι αντιστρεπτό, και η ρετινάλη μπορεί να

ξανασηματίζει ρετινόλη από κυτταρικές ρεδουκτάσες ρετινάλης (F). Σύμφωνα με τις μορφές αυτές, η ρετινάλη συνήθως ενεργεί μέσω των διάφορων δεϋδρογονασών ρετινάλης (retinal DH) και είναι μη αντιστρεπτός ο σχηματισμός σε ρετινοϊκό οξύ (G). Τα ρετινοϊκά οξέα έπειτα εισέρχονται στον πηρύνα, συνδέονται και ενεργοποιούν τους υποδοχείς ρετινοειδών (H) ρυθμίζοντας την μεταγραφή γονιδίων στόχων (I).

II.2 ΚΙΡΡΩΣΗ

II.2.a. Ήπαρ

Η βασική λειτουργική μονάδα του ήπατος είναι το ηπατικό λοβίο, που αποτελεί κυλινδρική κατασκευή μήκους λίγων χιλιοστομέτρων και με διάμετρο 0,8 ως 2 χιλιοστόμετρα (mm). Στο ήπαρ του ανθρώπου περιέχονται 50.000 ως 100.000 ηπατικά λόβια.

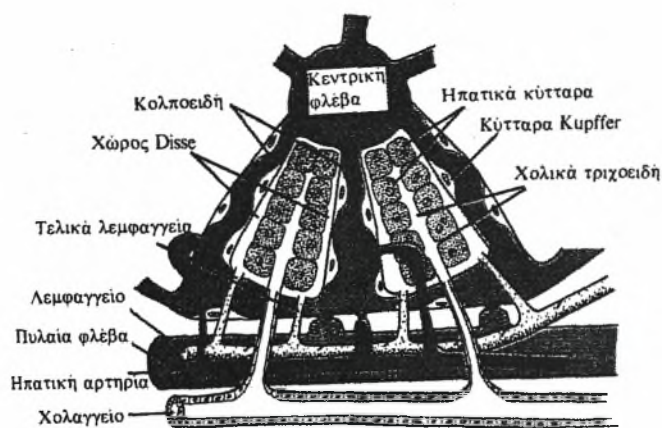
Το ηπατικό λοβίο δομείται γύρω από μια κεντρική φλέβα, η οποία αποχετεύεται προς τις ηπατικές φλέβες, και στη συνέχεια προς την κάτω κοίλη φλέβα. Το ίδιο το ηπατικό λοβίο αποτελείται κυρίως από πολλά πετάλια από ηπατοκύτταρα τα οποία διατάσσονται ακτινοειδώς γύρω από την κεντρική φλέβα, σε σαν ακτίνες σε τροχό. Το κάθε πετάλιο έχει πάχος ένα έως δύο κύτταρα, ανάμεσα δε στα γειτονικά κύτταρα υπάρχουν τα χοληφόρα τριχοειδή, τα οποία εκβάλλουν στα χολαγγεία που βρίσκονται στα ινώδη διαφράγματα, μεταξύ των ηπατικών λοβίων.

Επίσης, στα διαφράγματα υπάρχουν μικρά πυλαία φλεβίδια, η αιμάτωση των οποίων προέρχεται, κατά κύριο λόγο, από τις φλέβες της γαστρεντερικής οδού, μέσα από την πυλαία φλέβα. Από αυτά τα φλεβίδια το αίμα φέρεται σε επίπεδα, διακλαδιζόμενα ηπατικά κολποειδή, τα οποία βρίσκονται ανάμεσα στα ηπατικά πετάλια, και από εκεί προς την κεντρική φλέβα. Με αυτό τον τρόπο τα ηπατικά κύτταρα εκτίθενται συνεχώς στο φλεβικό αίμα της πυλαίας.

Εκτός από τα πυλαία φλεβίδια, στα μεσολόβια διαφράγματα υπάρχουν και τα ηπατικά αρτηρίδια. Τα αρτηρίδια αυτά παρέχουν αρτηριακό αίμα στους ιστούς των μεσολοβιδίων διαφραγμάτων, πολλά δε από τα μικρά αυτά αρτηρίδια εκβάλλουν επίσης κατευθείαν προς τα ηπατικά κολποειδή, συχνά δε κατά το ένα τρίτο της απόστασης από το μεσολοβίδιο διάφραγμα.

Τα φλεβικά κολποειδή επενδύονται από δύο τύπους κυττάρων: (1) Τα τυπικά ενδοθηλιακά κύτταρα και τα (2) τα μεγάλα κύτταρα Kupffer, τα οποία είναι μακροφάγα των ιστών (λέγονται και δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα), που έχουν την ικανότητα της φαγοκύτωσης μικροβίων και άλλων ξένων ουσιών που κυκλοφορούνται στο αίμα. Η ενδοθηλιακή αυτή επένδυση των φλεβικών κολποειδών εμφανίζει εξαιρετικά μεγάλους πόρους, μερικοί από τους οποίους έχουν διάμετρο σχεδόν ενός μικρού (μm). Κάτω από αυτή την επένδυση, μεταξύ των ενδοθηλιακών και των ηπατικών κυττάρων, υπάρχει ένας πολύ στενός χώρος που ονομάζεται χώρος του Disse. Με τη σειρά τους, τα εκατομμύρια των χώρων Disse συνδέονται με τα λεμφαγγεία των μεσολοβιδίων διαφραγμάτων. Κατά συνέπεια, η περίσσεια υγρού από τα διαστήματα αυτά απομακρύνεται με τα λεμφαγγεία. Εξαιτίας της παρουσίας των μεγάλων πόρων στο ενδοθήλιο, ουσίες από το πλάσμα διακινούνται ελεύθερα προς το χώρο Disse. Ακόμα και μεγάλο μέρος των πρωτεϊνών του πλάσματος διαχέονται προς αυτό το χώρο (Guyton) (Εικόνα 2.1).

Το ήπαρ στα ποντίκια εντοπίζεται γειτονικά του διαφράγματος. Το ήπαρ υπολογίζεται ότι κατέχει το 4 με 5% του συνολικού βάρους στους ενήλικες και απαρτίζεται από τέσσερις λοβούς. Ο μεσαίος λοβός περιστοιχίζει τη χοληδόχο κύστη στα ποντίκια.



Εικόνα 2.1. Μορφολογία ήπατος.

II.2.b. Λειτουργίες ήπατος

Οι κύριες λειτουργίες του ήπατος είναι οι παρακάτω (Stevens):

1. **Μεταβολισμός υδατανθράκων:** το ήπαρ αποτελεί θέση εναποθήκευσης γλυκογόνου και την κύρια πηγή γλυκόζης του πλάσματος.
2. **Μεταβολισμός λίπους:** το ήπαρ κατέχει κεντρική θέση στην επεξεργασία των διαιτητικών λιπών προς λιποπρωτεΐνες, οι οποίες εισέρχονται στο αίμα για τον περιφερικό μεταβολισμό.
3. **Μεταβολισμός πρωτεϊνών:** το ήπαρ αποτελεί τη μείζονα θέση σύνθεσης πρωτεϊνών (και ιδίως πρωτεΐνες του πλάσματος), καθώς και μεταβολισμού πρωτεϊνών, με την αναπαραγωγή της ουρίας.
4. **Σύνθεση χολής:** το ήπαρ εκκρίνει χολή, η οποία περιέχει χολερυθρίνη, χοληστερόλη, ηλεκτρολύτες και χολικά άλατα.
5. **Αποθήκευση:** στο ήπαρ αποθηκεύονται γλυκογόνο, σίδηρος, χαλκός και λιποδιαλυτές βιταμίνες, οι οποίες μπορεί να αυξηθούν υπερβολικά σε περιπτώσεις νόσου.
6. **Αποτοξίνωση:** στο ήπαρ αποτοξινώνονται πολλοί μεταβολίτες, ιδίως νιτρώδη στοιχεία, ορμόνες και φάρμακα.

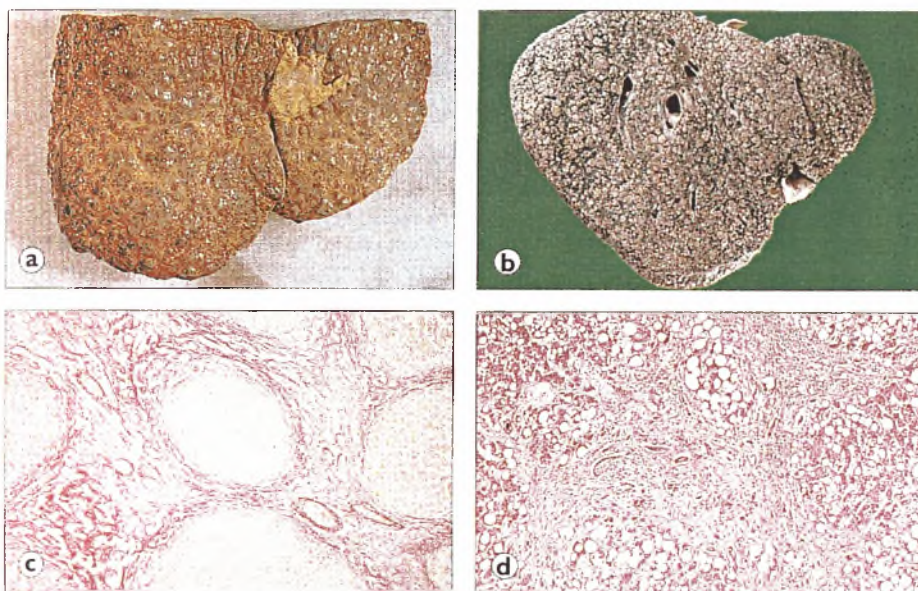
II.2.c. Κίρρωση

Κίρρωση του ήπατος είναι η γενικευμένη ίνωση του οργάνου, η οποία συνδυάζεται με την παρουσία αναγεννητικών όζων¹ (Εικόνα 2.2). Η συνύπαρξη της αύξησης του συνδετικού ιστού και της παρουσίας των αναγεννητικών όζων σε ολόκληρο το ηπατικό παρέγχυμα είναι απαραίτητη προϋπόθεση για να τεθεί η διάγνωση της κίρρωσης. Συνεπώς πρέπει να διακρίνεται από την κίρρωση η εστιακή οζώδης υπερπλασία (ίνωση και αναγεννητικοί όζοι σε τμήματα ήπατος), η οζώδης αναγεννητική υπερπλασία (αναγεννητικοί όζοι σε ολόκληρο το ήπαρ χωρίς ίνωση) και η συγγενής ίνωση (ίνωση σε ολόκληρο το ήπαρ χωρίς όζους).

Όπως φαίνεται από τον ορισμό, η κίρρωση είναι παθολογοανατομική διάγνωση και δεν πρέπει να συγχέεται με την ηπατική ανεπάρκεια. Αποτελεί την κατάληξη πολλών ηπατοπαθειών διαφορετικής αιτιολογίας.

¹ Οζίο: εκφυλισμένη εστία κολλαγόνου που περιβάλλεται από γιγοντοκύτταρα.

Τα κλινικά σύνδρομα που συχνά παρατηρούνται σε ασθενείς με κίρρωση οφείλονται είτε σε ανεπαρκή λειτουργία του ηπατικού κυττάρου (ηπατική εγκεφαλοπάθεια), είτε σε αιμοδυναμικές διαταραχές (πυλαία υπέρταση), είτε σε συνδυασμό αυτών (ασκίτης). Η παρουσία κάποιου από τα ανωτέρω σύνδρομα δεν προϋποθέτει πάντοτε εγκατάσταση κίρρωσης.



Εικόνα 2.2. Μορφολογία κίρρωτικού ήπατος.

II.2.d. Παθογένεια και μορφές της κίρρωσης

Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην κίρρωση έχουν ως αφετηρία τη νέκρωση των ηπατικών κυττάρων και σε δεύτερο χρόνο την ανάπτυξη του συνδετικού ιστού. Η ηπατοκυτταρική νέκρωση ακολουθείται από σύμπτωση των λοβίων και ανάπτυξη νέου κολλαγόνου συνδετικού ιστού, στη θέση των νεκρωθέντων κυττάρων, με συνέπεια τη δημιουργία ινώδων διαφραγμάτων. Συγχρόνως παρατηρείται έντονη αναγεννητική δραστηριότητα των περιοχών του παρεγχύματος που επιβιώνουν, η οποία όμως δεν αναπαράγει τη φυσιολογική λοβιώδη αρχιτεκτονική. Τα ηπατοκύτταρα αναγεννώνται πλέον κατά μήκος των δοκίδων του λοβίου όχι σε μονούς αλλά σε διπλούς ή τριπλούς στοίχους, ενώ καταργείται η διαδοχή πυλαίου διαστήματος και κεντρικής φλέβας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία όζων και την εγκατάσταση της τυπικής εικόνας της κίρρωσης. Στα αρχικά στάδια η ίνωση είναι αντιστρεπτή. Αργότερα αναπτύσσονται ινώδη διαφράγματα τόσο στην

περιοχή των πυλαίων διαστημάτων όσο και ενδολοβιακά, τα οποία δεν είναι πλέον δυνατόν να υποστραφούν. Συχνά αναπτύσσονται και άφθονα μικρά νεοπλάσματα χολαγγεία μέσα στα ινώδη διαφράγματα. Όταν οι βλάβες έχουν εγκατασταθεί πλήρως, η ιστολογική εικόνα του ήπατος είναι περίπου η ίδια, ανεξάρτητα από την αιτία της αρχικής βλάβης.

Η νέκρωση των ηπατικών κυττάρων, όταν περιορίζεται γύρω από τα πυλαία διαστήματα (piecemeal necrosis), προκαλεί την ανάπτυξη διαφραγμάτων από ινώδη συνδετικό ιστό, που συνδέουν τα πυλαία διαστήματα μεταξύ τους. Η ηπατακυτταρική νέκρωση στις κεντρικές περιοχές των λοβίων (ζώνη 3) οδηγεί σε ανάπτυξη ινωδών διαφραγμάτων μεταξύ πυλαίου διαστήματος-κεντρικής φλέβας, τα οποία αποτελούν το ανατομικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη πυλαιοσυστηματικής επικοινωνίας μέσα στο ήπαρ. Το αίμα από την πυλαία κυκλοφορία παρακάμπτει τμήμα του φυσιολογικού παρεγχύματος με συνέπεια ανεπαρκή αιμάτωση των κεντρικών περιοχών των όζων και περαιτέρω ηπατοκυτταρική νέκρωση, ακόμη και όταν το αρχικό αίτιο της βλάβης έχει αντιμετωπιστεί.

Η διαδικασία που οδηγεί σε κίρρωση είναι βραδεία. Σπανίως παρατηρείται ταχεία εξέλιξη προς κίρρωση, όπως σε υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ ή μετά από κεραυνοβόλο ηπατίτιδα. Η συνήθης όμως έκβαση των ατόμων που επιζούν μετά από κεραυνοβόλο ηπατίτιδα είναι ίαση. Το γεγονός αυτό, όπως και η συνήθως παρατηρούμενη ίαση μετά από φαρμακευτική ή οξεία ιογενή ηπατίτιδα, αποδεικνύουν ότι η ηπατοκυτταρική νέκρωση μόνη δεν αρκεί για να γίνει το ήπαρ κίρρωτικό.

II.2.e. Ταξινόμηση κίρρωσης

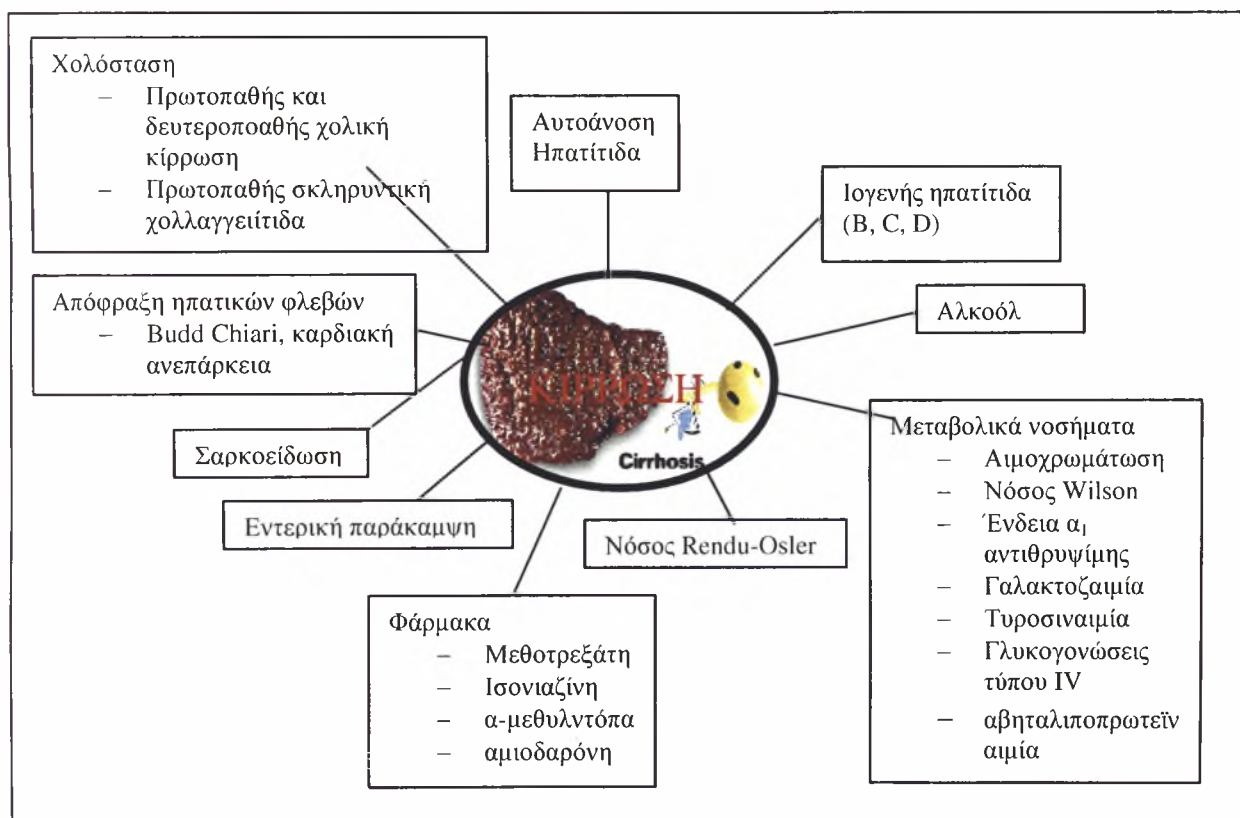
Η κίρρωση ταξινομείται μορφολογικά στο μικροοζώδη, το μεγαλοοζώδη και το μεικτό τύπο (Πίνακας 2.1). Η μικροοζώδης κίρρωση χαρακτηρίζεται από μικρούς, παρόμοιου μεγέθους αναγεννητικούς όζους, από ινώδη διαφράγματα που διατάσσονται σε ολόκληρο το ηπατικό παρέγχυμα με αξιοσημείωτη ομοιογένεια και από το ότι συμμετέχουν όλα τα ηπατικά λόβια. Η μεγαλοοζώδης κίρρωση χαρακτηρίζεται από διαφορετικού μεγέθους ινώδη διαφράγματα και όζους και από την παρουσία φυσιολογικών λοβίων εντός των μεγάλων όζων. Συχνά παρατηρούνται πολλαπλά πυλαία διαφράγματα σε παραπλήσιες θέσεις, αποτέλεσμα της σύμπτωσης

του συνδετικού ιστού, μετά από καταστροφή και απώλεια ηπατοκυττάρων και της ανάπτυξης νέου κολλαγόνου συνδετικού ιστού.

ΜΙΚΡΟΟΖΩΔΗΣ	ΜΕΓΑΛΟΟΖΩΔΗΣ
Όζοι < 3 mm σε διάμετρο	Όζοι > 3 mm σε διάμετρο
Αλκοολική	Αλκοολική (κυρίως μετά τη διακοπή του ποτού)
Δευτερογενής χολική	
Αιμοχρωμάτωση	Ιογενής ηπατίτιδα
Σύνδρομο Budd-Chiari	Νόσος Wilson

Πίνακας 2.1. Ταξινόμηση της κίρρωσης.

Η αιτιολογική ταξινόμηση της κίρρωσης (Σχήμα 2.1) υπερέχει, χωρίς όμως να είναι πάντοτε επιτυχής. Η παθολογοανατομική εικόνα δεν αποδεικνύει συνήθως το αίτιο της κίρρωσης, η οποία είναι πιθανό να οφείλεται σε περισσότερα από ένα αίτια. Σε μικρό ποσοστό κίρρωτικών το αίτιο δεν ανευρίσκεται, παρά τη λεπτομερή διερεύνηση (κρυψιγενής κίρρωση).



Σχήμα 2.1. Αιτιολογική ταξινόμηση της κίρρωσης.

II.2.f. Κίρρωση ως επακόλουθο της χολικής απόφραξης

Η χολική κίρρωση είναι το αποτέλεσμα μακρόχρονης απόφραξης των χοληφόρων πόρων, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αποφρακτικού ικτέρου, ηπατοκυτταρικής νέκρωσης και ίνωσης με αναγεννητικούς όζους.

Οι κύριες αιτίες είναι η πρωτοπαθής χολική κίρρωση, η παρατεταμένη απόγραξη των κύριων εξωηπατικών χοληφόρων πόρων, που καλείται και δευτεροπαθής χολική κίρρωση και η σκληρυντική χολαγγειίτιδα.

Κατά την έναρξη της χολικής απόφραξης παρατηρείται οίδημα, διάταση των ενδοηπατικών πυλαίων διαστημάτων και ίνωση. Σταγονίδια χολής εμφανίζονται μέσα από χοληφόρα τριχοειδή, τα οποία μπορεί να ραγούν και να προκαλέσουν το θάνατο των γειτονικών ηπατικών κυττάρων (χολικά έμφρακτα). Μετά από πολύχρονη πορεία η ηπατοκυτταρική νέκρωση, η αναγέννηση και η ίνωση οδηγούν στην ανάπτυξη κίρρωσης (Stevens).

II.2.g. Παθοφυσιολογία της κίρρωσης

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα όσον αφορά την παθογένεια της κίρρωσης κατευθύνεται προς το μεταβολισμό του κολλαγόνου συνδετικού ιστού και τη φυσιολογία των ινών που απαρτίζουν το σκελετό του ήπατος. Δεν έχει διευκρινισθεί γιατί μια συγκεκριμένη ηπατική βλάβη σε ορισμένους ασθενείς οδηγεί σε ίαση και τέλεια “επισκευή” των βλαμμένων ηπατικών δοκίδων και σε άλλους έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ουλώδους συνδετικού ιστού και μόνιμη διαταραχή της αρχιτεκτονικής του ηπατικού παρεγχύματος.

Ο μεταβολισμός του ηπατικού κολλαγόνου είναι δυναμικό φαινόμενο. Μεγάλο μέρος του κολλαγόνου υποστρώματος του ήπατος αντικαθίσταται συνεχώς από νεοπαραγόμενο. Οι τυπικοί ινοβλάστες εντοπίζονται μόνο στα πυλαία διαστήματα, ενώ οι μυοϊνοβλάστες, που επίσης παράγουν κολλαγόνο, βρίσκονται στο χώρο του Disse. Οι πρόδρομες μορφές ινοβλαστών είναι τα κύτταρα Ito, που είναι λιποκύτταρα πλούσια σε βιταμίνη Α και βρίσκονται στα κολλοειδή. Σε υπερπαραγωγή κολλαγόνου εντοπίζονται σε ολόκληρο το ηπατικό λόβιο.

Υπάρχουν τέσσερις τύποι κολλαγόνου και είναι αυξημένοι σε όλους τους ασθενείς, ανεξάρτητα από την αιτία της κίρρωσης. Η αυξημένη σύνθεση του

κολλαγόνου οφείλεται σε αύξηση του αριθμού των ινοβλαστών, αλλά και σε υπερπαραγωγή κολλαγόνου από κάθε κύτταρο ξεχωριστά.

Η διαταραχή των μηχανισμών που διατηρούν την ομοιοστασία μεταξύ των ηπατοκυττάρων και του υποστρώματος φαίνεται ότι είναι πολύ σημαντικός παράγοντας στην ανάπτυξη της ηπατικής ίνωσης. Στο σημείο αυτό εμπλέκονται οι κυτοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες του ήπατος, οι οποίοι φαίνεται ότι ελέγχουν το μεταβολισμό του κολλαγόνου.

Οι κυτοκίνες είναι πρωτεΐνες που δρουν σαν ορμόνες. Σα μεσολαβητικοί παράγοντες, συμβάλλουν στην επικοινωνία τόσο μεταξύ ήπατος και του υπόλοιπου οργανισμού όσο και μεταξύ διαφόρων θέσεων ενδοηπατικά. Ρυθμίζουν το διάμεσο μεταβολισμό αμινοξέων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, λιπιδίων και μετάλλων. Στο ήπαρ παράγονται κυρίως από τα κύτταρα Kupffer, ινταρλευκίνη-1 (IL-1), ιντερλευκίνη-6 (IL-6), παράγοντας νέκρωσης των όγκων α (TNF- α).

Η ηπατική αναγεννητικότητα αναστέλλεται από της κυτοκίνες, ενώ η αναγεννητική δραστηριότητα του παρεγχύματος που παρατηρείται μετά από προσβολή ιογενούς ηπατίτιδας ή μετά από μερική ηπατεκτομή πιθανόν να εκλύεται από αυξητικούς παράγοντες της επιδερμίδας (EGF) και οι μετατρεπτικοί αυξητικοί παράγοντες α και $\beta 1$ (TGF α , TGF- $\beta 1$), η δράση των οποίων φαίνεται ότι επιτελείται μέσω ειδικών υποδοχέων που εκφράζονται κυρίως στην ηπατοκυτταρική μεμβράνη.

II.2.h. Εμπλοκή της βιταμίνης A στην κίρρωση

Ηπατική ίνωση χαρακτηρίζεται από μια μη-φυσιολογική ηπατική συσσώρευση εξωκυττάριας μήτρας που προέρχεται από την αυξανόμενη απόθεση και μειωμένη αποδιάταξη των κολλαγόνων ινών. Το κυτταρικό γεγονός που σχετίζεται με αυτό το φαινόμενο είναι η ενεργοποίηση των ηπατικών stellate κυττάρων (HSCs) που ενεργοποιούν ιογενετικά, μυοινοβλαστικά κύτταρα (32,33,34). Η ενεργοποίηση των HSCs επίσης σχετίζεται με την μείωση των λιπιδιακών κυττάρων, τις αποθήκες της βιταμίνης A. Αν και τα αποθέματα των ρετινοϊδων δείχνουν να είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην ινογένεση (34), ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα ρετινοειδή εμπλέκονται είναι ακόμη υπό αμφισβήτηση.

Η βιταμίνη A (ρετινόλη) και τα παράγωγα της (ρετινοειδή) πιστεύεται να παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην ενεργοποίηση των HSCs κυττάρων και στον μετασχηματισμό τους κατά την διαδικασία της ινογένεσης. Έλλειψη

κυτταροπλασματικού ρετινυλικών εστέρων σχετίζεται με ενεργοποίηση των HSCs κυττάρων στην προχωρημένη ίνωση. In vitro μεταχείριση των προδρόμων HSCs κυττάρων με ρετινόλη, οδηγεί στην αναστολή της ενεργοποίησής τους, που καταλήγει στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της σύνθεσης του κολλαγόνου. Όμως άλλες μελέτες έδειξαν ότι η υπερβιταμίνωση Α επίσης σχετίζεται με ηπατική ίνωση πιθανόν μέσω ενεργοποίησης του TGF β στα HSCs (35)

Από άλλα πειράματα έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα της ρετινόλης και των εστέρων μειώνονται σε υποβιταμινικά μη-κίρρωτικά ζώα, ενώ τα υποβιταμινικά κίρρωτικά ζώα επίσης εκθέτουν μειωμένα επίπεδα ρετινόλης, αλλά όχι μειωμένα επίπεδα ρετινυλικών εστέρων. (36)

II.2.i. Κλινική εικόνα

Η κίρρωση εγκαθίσταται αθόρυβα. Το 30-40% των αρρώστων είναι συνήθως ασυμπτωματικοί. Συχνά διαπιστώνεται τυχαία σε κλινική εξέταση ή χειρουργική επέμβαση για άλλη αιτία. Με την προοδευτική εγκατάσταση των βλαβών εγκαθίσταται ηπατοκυτταρική ανεπάρκεια και πυλαία υπέρταση, ο βαθμός των οποίων καθορίζει την πρόγνωση και τη θεραπεία. Η ανεπάρκεια του ηπατικού κυττάρου και η πυλαία υπέρταση ευθύνονται για τις επιπλοκές της κίρρωσης, όπως ο ίκτερος, ο ασκίτης, η εγκεφαλοπάθεια και η αιμορραγία από το γαστρεντερικό σωλήνα.

Η κίρρωση χαρακτηρίζεται σαν αντιρροπούμενη, εάν δεν υπάρχουν επιπλοκές, ιστολογικά δεν παρατηρούνται έντονα φλεγμονώδη στοιχεία στους αναγεννητικούς όζους και ο ασθενής είναι ασυμπτωματικός ή παρουσιάζει ήπια ενοχλήματα, όπως ανορεξία, καταβολή ή χαμηλό πυρετό. Συχνά συνυπάρχει αναιμία, θρομβοπενία ή λευκοπενία λόγω υπερσπληνισμού. Η μη αντιρροπούμενη κίρρωση χαρακτηρίζεται από την παρουσία των επιπλοκών της κίρρωσης και από εκτεταμένες διηθήσεις με φλεγμονώδη κύτταρα στους αναγεννητικούς όζους. Η καταβολή είναι η πιο συχνή εκδήλωση στην κίρρωση. Συνοδεύεται από ανορεξία και απώλεια βάρους, η οποία μπορεί να μη γίνεται αντιληπτή λόγω συλλογής πλευριτικού ή ασκίτικού υγρού.

Ενδεικτικά κλινικά σημεία της πυλαίας υπέρτασης είναι η σπληνομεγαλία, η παρουσία παράπλευρης κυκλοφορίας στο κοιλιακό τοίχωμα και κισμών στον οισοφάγο και το θολό του στομάχου. Οι αποτιτανώσεις στο πάγκρεας και η εγκατάσταση χρόνιας υποτροπιάζουσας παγκρεατίτιδας συσχετίζονται με αλκοολική ηπατοπάθεια. Παρατηρείται συχνά στεατόρροια, η οποία είναι δυνατόν να μην οφείλεται σε παγκρεατίτιδα ή αλκοολισμό, αλλά να προκαλείται από μειωμένη έκκριση χολικών αλάτων. Το πεπτικό έλκος, παρατηρείται πιο συχνά στην κίρρωση (10-15%), ιδιαίτερα στους αλκοολικούς, από ότι στο γενικό πληθυσμό.

Κήλη στο κοιλιακό τοίχωμα παρουσιάζεται συχνά με την εμφάνιση του ασκιτή. Κατά κανόνα δεν πρέπει να αντιμετωπίζεται χειρουργικά. Η πληκτροδακτυλία και η υπερτροφική οστεοαρθροπάθεια παρατηρούνται συχνότερα στη χολική κίρρωση, ενώ αλκοολικούς επισημαίνεται συχνά αύξηση του μεγέθους των παρωτίδων.

Στην κίρρωση ανεξάρτητα από την αιτία που την προκάλεσε, έχει διαπιστωθεί ανακατανομή της αιματικής ροής στους νεφρούς με αποτέλεσμα σχετική ισχαιμία του φλοιού και προδιάθεση για το λεγόμενο ηπατονεφρικό σύνδρομο. Η ανάπτυξη πυλαιοσυστηματικών επικοινωνιών μέσα στο ήπαρ επηρεάζει την ικανότητα για φαγοκύτωση του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος με συνέπεια τη συχνή εμφάνιση μικροβιακών λοιμώξεων εντερικής προέλευσης. Στο τελικό στάδιο της κίρρωσης η σηψαιμία και η αυτόματη βακτηριακή περιτονίτιδα είναι συχνά φαινόμενα, πολλές φορές διαφεύγουν της προσοχής και πρέπει να τις υποπτευόμαστε στους ασθενείς με πυρετό ή ξαφνική επιδείνωση της γενικής τους κατάστασης.

II.3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της πειραματικής μελέτης ήταν το στήσιμο σταθμού πειραματόζωων και η εξασφάλιση των κατάλληλων συνθηκών για την εκτροφή και το στήσιμο πειραματικού χειρουργείου για τη δημιουργία πειραματικού μοντέλου κίρρωσης σε επίμυες. Ειδικότερα έγινε εφαρμογή τεχνικών μεθόδων κίρρωσης (απόφραξη χοληδόχου πόρου και λήψη αίματος από την ουρά). Και τέλος, εξετάστηκε αν υπάρχει συσχέτιση στο μεταβολισμό της βιταμίνης Α με την κίρρωση του ήπατος. Επίσης εξετάστηκε εάν κατά τη χορήγηση μεγάλης ποσότητας βιταμίνης Α ακολουθείται διαφορετικός μεταβολισμός στο παθολογικό ήπαρ.

Για τον λόγο αυτό μελετήθηκε ο μεταβολισμός της βιταμίνης Α σε αρουραίους με κίρρωση και χωρίς. Ειδικότερα μετρήθηκαν τα επίπεδα στο αίμα (ορό) της ρετινόλης (βιταμίνη Α) και των μεταβολιτών της all trans-ρετινοϊκό οξύ, 9-cis ρετινοϊκό οξύ και 13-cis ρετινοϊκό οξύ.

Οι παραπάνω παράμετροι μετρήθηκαν στα ζώα σε αιμοληψίες που έγιναν πριν οποιαδήποτε επέμβαση, μετά την πρόκληση της ηπατικής βλάβης με απόφραξη του χολικού πόρου και σε διαδοχικές αιμοληψίες μετά την εφάπαξ χορήγηση μεγάλης ποσότητας βιταμίνης Α.

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι προμηθευτές των χημικών αναλωσίμων καθώς και τα πρωτόκολλα παρασκευής των διαλυμάτων αναγράφονται στα παραρτήματα 1 και 2.

III.1. Πειραματόζωα

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 25 αρουραίοι (Wistar), οι οποίοι προμηθεύτηκαν από το ινστιτούτο Παστερ ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Οι αρουραίοι αυτού χωρίστηκαν σε δύο ομάδες και τοποθετήθηκαν σε ειδικά κλουβιά (Εικόνα 3.1).

- ✓ Ομάδα Α n=8: Μάρτυρες
- ✓ Ομάδα Β n=17: Ηπατική βλάβη (κίρρωση)



Εικόνα 3.1. Αρουραίος Wistar.

Προκειμένου να είναι ίδιες οι συνθήκες στις δύο ομάδες ακολουθήθηκε μια τεχνική που ονομάζεται διατροφή κατά ζεύγη (pair feeding). Έτσι σε κάθε ζεύγος ποντικών ο μάρτυρας λαμβάνει τόση τροφή όση καταναλώνει ο ασθενής.

Ειδικότερα, για την εκτροφή και το χειρισμό των πειραματόζωων ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Καθημερινά ζύγισμα. 10:30 – 11:30 π.μ.
2. Ζύγιση της τροφής της ομάδας Β που καταναλώθηκε (ομάδα Β) 11:30 – 12:00 π.μ.
3. Τροφή μαρτύρων (ομάδα Α). Σε κάθε μάρτυρα χορηγήθηκε τροφή τόση όση κατανάλωσε το ζευγάρι του.
4. Χορήγηση καθαρού νερού καθημερινά
5. Καθαριότητα 3 φορές την εβδομάδα.

Οι συνθήκες διαβίωσης των πειραματόζων κατά τη διεξαγωγή του πειράματος ήταν: θερμοκρασία δωματίου 25 °C και φωτισμός 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι.

III.2. Χειρουργικές επεμβάσεις

Για την πραγματοποίηση των αιμοληψιών και της απόφραξης του χοληδόχου πόρου έλαβε μέρος μια ομάδα που απαρτιζόταν από την υπογράφουσα, από δύο χειρουργούς και έναν παθολόγο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Στην ομάδα Β πραγματοποιήθηκε αιμοληψία από την ουρά και ακολούθως έγινε απόφραξη στο χοληδόχο πόρο, με σκοπό τη δημιουργία χολικής κίρρωσης. Ενώ στην ομάδα Α πραγματοποιήθηκε αιμοληψία από την ουρά και ακολούθως έγινε ανάδευση των σπλάχνων τους χωρίς να γίνει απόφραξη του χοληδόχου πόρου.

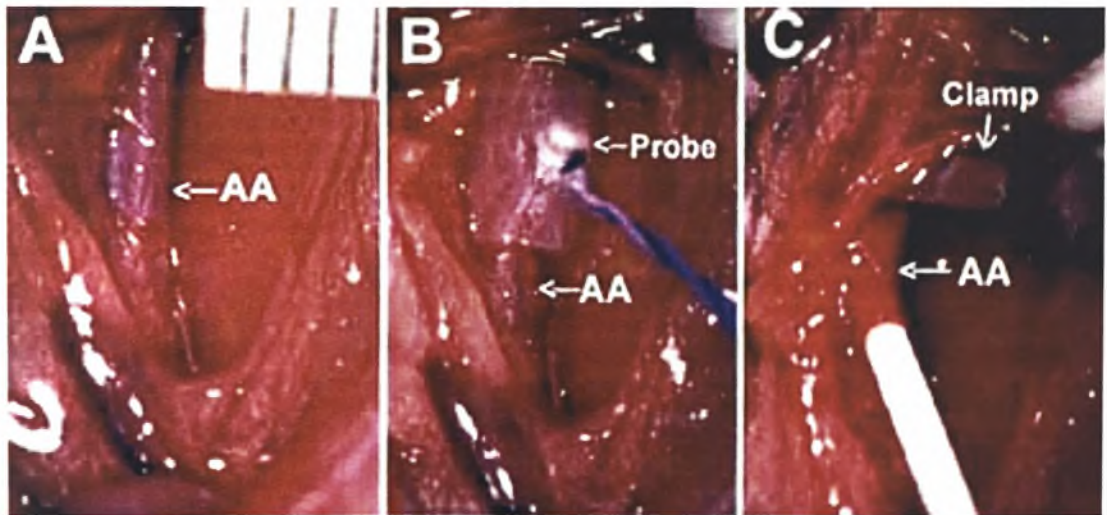
III.2.a. Αιμοληψία - Απόφραξη χοληδόχου πόρου

Αρχικά, οι αρουραίοι αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα. Μόλις άρχιζαν να χάνουν τις αισθήσεις τους τοποθετήθηκαν στο χειρουργικό τραπέζι και ακινητοποιήθηκαν ανάσκελα για να είναι η διαδικασία της επέμβασης εφικτή. Αρχικά έγινε λήψη αίματος από την ουρά (απαραίτητη η διατήρηση των αρουραίων σε κατάσταση αναισθησίας) (Εικόνα 3.2) και στη συνέχεια ακολουθήθηκε τομή κατά μήκος της λευκής γραμμής και αποκάλυψη των σπλάχνων. Εύρεση του χοληδόχου πόρου και απολίνωσή του με ειδικό εργαλείο (Εικόνα 3.3). Μετά το τέλος της

επέμβασης οι αρουραίοι τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη κουβέρτα ωστόσο ανακτήσουν τις αισθήσεις τους (αποφυγή μετεγχειρητικού υποθερμικού σοκ). Από την ομάδα Β κατέληξαν 9 πριν τη δημιουργία κίρρωσης πιθανόν ως συνέπεια της επέμβασης.



Εικόνα 3.2. Αναισθησία κατά τη διάρκεια της επέμβασης.

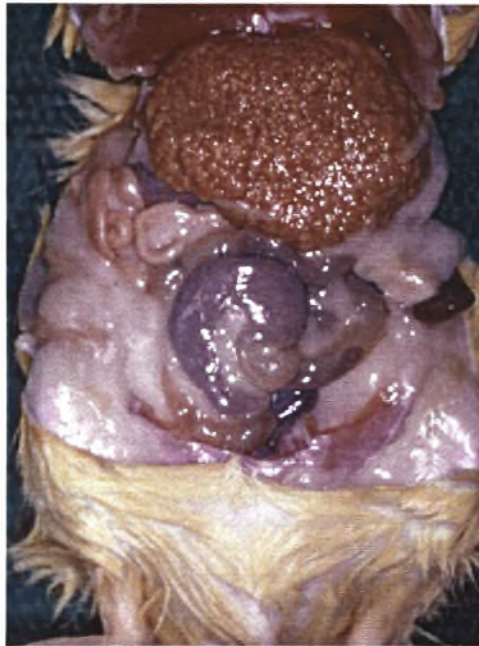


Εικόνα 3.3. Διαδικασία απολίνωσης χοληδόχου πόρου.

Στην ομάδα Α πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και ακολούθως έγινε η ίδια διαδικασία επέμβασης με την ομάδα Β, δίχως απόφραξης χοληδόχου πόρου. Από αυτά κατέληξαν 2 κατά την αναισθησία.

III.2.b. Χορήγηση βιταμίνης A

Μετά το πέρας τεσσάρων εβδομάδων πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και στις δύο ομάδες αρουραίων. Τέσσερις ημέρες μετά από την αιμοληψία, χορηγήθηκε βιταμίνη A ενδομυϊκά με τη μορφή ρετινόλης (Παράρτημα 2). Πριν την χορήγηση της βιταμίνης και συγκεκριμένα 15 ώρες πριν, τους αφαιρέθηκε η τροφή. Με την πάροδο 4 ωρών από τη χορήγηση, πραγματοποιήθηκε ξανά αιμοληψία και μετά από 24 ώρες έγινε αιμοληψία από την κάτω κοίλη φλέβα, θανάτωση με αφαίμαξη και λήψη του ήπατος, το οποίο μεταφέρθηκε στο παθολογοανατομικό τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για ιστολογική εξέταση. Στην Εικόνα 3.4 παρατίθεται η μορφή του ήπατος των κίρρωτικών πριν την λήψη του.



Εικόνα 3.4. Μορφολογία κίρρωτικού ήπατος.

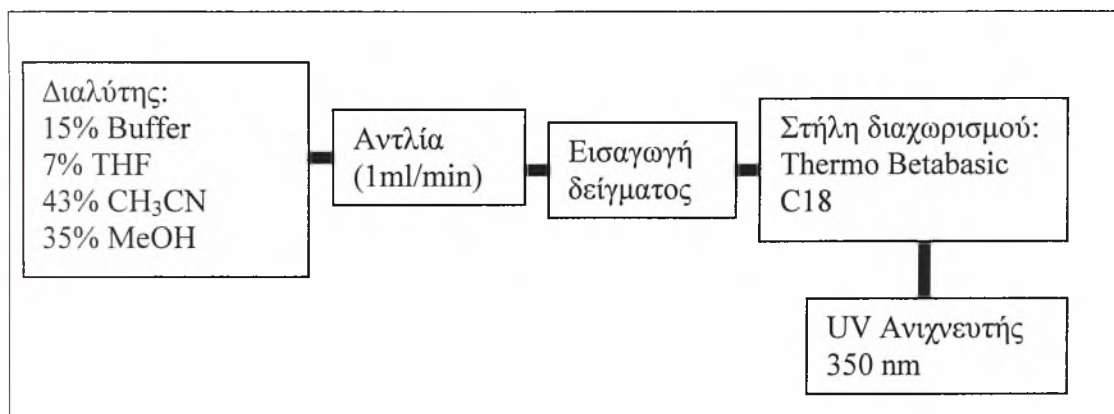
III.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για την ανάλυση και την ποσοτικοποίηση δειγμάτων ορού, χρησιμοποιήθηκε η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high performance liquid chromatography, HPLC). Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης είναι μια χρωματογραφική τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος, το οποίο μετά από διαλυτοποίηση στον κατάλληλο διαλύτη, εισάγεται σε μια χρωματογραφική στήλη η οποία περιέχει το κατάλληλο υλικό, ανάλογα με τη φύση των ουσιών που

πρόκειται να διαχωριστούν, υπό υψηλή πίεση ώστε να διαχωρίζονται τα συστατικά καθώς εκκλούνται με το διαλύτη ή με το σύστημα (μίγμα) διαλυτών έκλουσης που επίσης διοχετεύονται υπό υψηλή πίεση στη στήλη, μέσω μιας αντλίας. Γενικά, μπορεί να θεωρηθεί ως επέκταση της κλασσικής υγρής χρωματογραφίας στήλης, με εφαρμογή υψηλών πιέσεων. Η ταυτοποίηση των συστατικών του μίγματος γίνεται με βάση το χρόνο συγκράτησής τους, ενώ η ποσοτική τους αποτίμηση γίνεται με βάση την καμπύλη αναφοράς, με ή χωρίς εσωτερικού προτύπου.

III.3.a. Σύστημα HPLC

Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υγρής χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης υπό συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης. Το σύστημα HPLC που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Hewlett-Packard σύστημα (HP1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) που παρατίθεται στο Σχήμα 3.1.:



Σχήμα 3.1. Σχηματική απεικόνιση του συστήματος HPLC.

Αναλυτικά το σύστημα HPLC αποτελείται από:

- 1) **Το σύστημα άντλησης και απαέρωσης διαλύτη.** Στο σύστημα αυτό ο διαλύτης βρίσκεται αποθηκευμένος σε δοχείο και προωθείται προς τη στήλη με αντλία υψηλής πίεσης. Η απαέρωσή του γίνεται μέσω διήθησης από ειδικά φίλτρα υπό κενό. Σε αυτήν την πειραματική μελέτη η κινητή φάση είναι σταθερή και πολικότερη από τη στατική φάση (αντίστροφη φάση).

- 2) **Το σύστημα εισαγωγής δείγματος.** Αποτελείται από περιστρεφόμενη βαλβίδα (Rheodyne) υψηλής πίεσης, που είναι συνδεδεμένη με ένα βρόγχο χωρητικότητας 100μl. Η περιστρεφόμενη βαλβίδα έχει μια θέση «φορτώσεως» του δείγματος μέσω ειδικής σύριγγας. Μετά την πλήρωση του με το δείγμα, ο βρόχος στρέφεται ώστε η κινητή φάση να παρασύρει ποσοτικά τον όγκο του δείγματος και να το προωθήσει προς τη στήλη.
- 3) **Τη στήλη.** Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι Thermo Betabasic C18 (Pore Size 150A, Part Size 5nm, Lot No P1L11, Serial No 0320816H, Part No 255-715, Dimension 250X4,6). Στο σύστημα αυτό πριν από τη στήλη παρεμβάλλεται μια προστήλη. Ο ρόλος της είναι να προστατεύει την κύρια στήλη από ακαθαρσίες του δείγματος, καθώς και τη στατική φάση της κύρια στήλης από τη μερική διάλυσή της από την κινητή φάση (προκαλείται κορεσμός στην κινητή φάση με την υγρή στατική φάση, λόγω του ότι η προστήλη αποτελείται από το ίδιο υλικό πλήρωσης με την κύρια στήλη).
- 4) **Τον ανιχνευτή.** Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των δειγμάτων είναι ο UV ανιχνευτής HP 1100 με ανίχνευση στα 350 nm.

Η λειτουργία του παραπάνω συστήματος ελέγχεται με υπολογιστή που περιέχει το λογισμικό HP Chemstation, το οποίο ελέγχει τη λειτουργία του συστήματος παροχής κινητής φάσης, αναλαμβάνει τη συλλογή, αποθήκευση και επεξεργασία των σημάτων των ανιχνευτών και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης.

III.3.b. Επεξεργασία δειγμάτων

Για τη συλλογή και ανάλυση των δειγμάτων των ποντικών τηρήθηκαν οι προβλεπόμενοι κανόνες που αφορούν την προστασία των δειγμάτων από το φως και την υψηλή θερμοκρασία. Μετά την αιμοληψία ακολουθήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για το διαχωρισμό των ερυθροκυττάρων από το πλάσμα και μεταφορά του υπερκείμενου σε δοκιμαστικό σωλήνα. Τα προς ανάλυση δείγματα διατηρήθηκαν στους -40°C μέχρι την ανάλυσή τους. Συνολικά συλλέχθηκαν συνολικά 16 δείγματα ορού πριν την επέμβαση, 9 δείγματα ορού μετά τη δημιουργία κίρρωσης (3 από τους

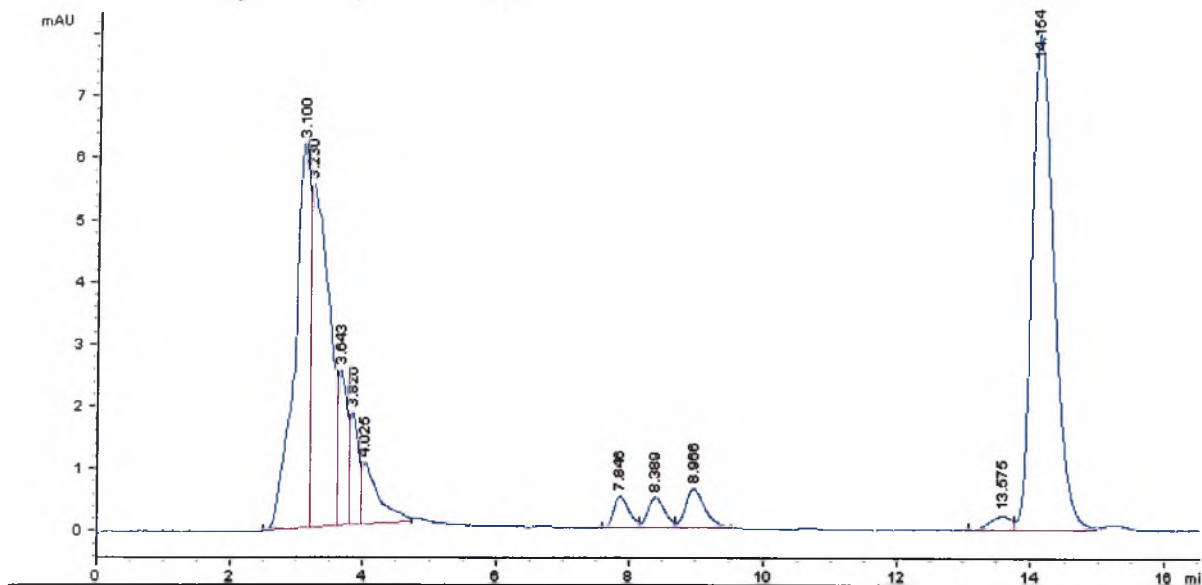
μάρτυρες και 6 από τα κίρρωτικά), 12 δείγματα ορού μετά το πέρας 4 ωρών από τη χορήγηση βιταμίνης A (6 από τους μάρτυρες και 6 από τα κίρρωτικά) και 8 δείγματα ορού μετά από 24 ώρες από τη χορήγηση βιταμίνης A (3 από τους μάρτυρες και 5 από τα κίρρωτικά).

Την περίοδο της ανάλυσής τους τα δείγματα ορού αποψύχθηκαν. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκε ορισμένος όγκος ορού του κάθε δείγματος και ακολούθησε αποπρωτεϊνοποίησή τους ως εξής:

1. Προσθήκη CH_3CN σε αναλογία 1:1 με τον κάθε όγκο ορού
2. Καλή ανάδευση για 2 min
3. Φυγοκέντρηση για 10 min στις 4.000 στροφές
4. Διατήρηση στους 4°C λίγο πριν τη ανάλυσή τους.

III.3.c. Προσδιορισμός οξέων και ρετινόλης

100μl από το υπερκείμενο λαμβάνονται με την ειδική σύριγγα και εκχύνονται μέσω της θέσης φορτώσεως του δείγματος στο σύστημα χρωματογραφίας HPLC. Η ταχύτητα ροής είναι 1ml/min και η πίεση κυμαίνεται στα 120bar. Η σύσταση της κινητή φάσης (διαλύτης) είναι 15% Buffer (0,1 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 0,02 M CH_3COOH) pH 5,4, 7% THF, 43% CH_3CN και 35% MeOH. Το 13-cis ρετινοϊκό οξύ, το 9-cis ρετινοϊκό οξύ, το all-trans ρετινοϊκό οξύ και η ρετινόλη εκλούνται στα 7,8min, 8,3min, 8,9min και 14,2 min αντίστοιχα. Μετά την ανίχνευσή τους από τον UV ανιχνευτή λαμβάνουμε το χρωματογράφημά (Εικόνα 3.5) τους από τον υπολογιστή όπου αναγράφονται το ύψος και το εμβαδόν των κορυφών σε μονάδες mAu.



Εικόνα 3.5. Χρωματογράφημα ορού και spike Ανίχνευση του 13-cis ρετινοϊκού οξέος, του 9-cis ρετινοϊκού οξέος, του all trans ρετινοϊκού οξέος και της ρετινόλης από τον UV ανιχνευτή (350nm) με χρόνους έκλουσης 7,848min, 8,389min, 8,966 min,14,154 min. αντίστοιχα.

III.4. Ανάκτηση

Χρειάστηκε επίσης να εξεταστεί το ποσό της ανάκτησης κατά την εκχύλιση.

Παρασκευάστηκαν τρία διαφορετικά δείγματα ως εξής:

1. 500μl ορός και 500μl CH₃CN
2. 500μl ορός, 50μl μίγματος προτύπων οξέων και ρετινόλης (spike) και 450μl CH₃CN
3. 50 μl μίγματος spike σε 950 μl διαλύτη

Στα παραπάνω δείγματα γίνεται καλή ανάδευση για 2 min και φυγοκέντρωση για 10 min στις 4.000 στροφές. Μετά την ανάλυσή τους στο σύστημα χρωματογραφίας καταγράφονται τα ύψη των κορυφών των οξέων και της ρετινόλης του κάθε δείγματος.

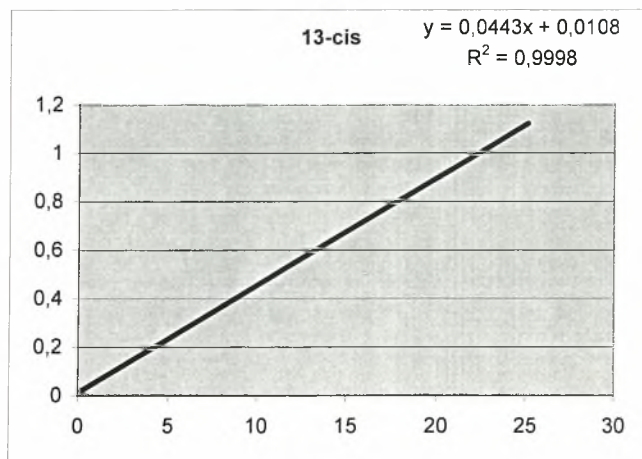
III.5. Πρότυπες καμπύλες

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν οι πρότυπες καμπύλες της ρετινόλης και των οξέων. Για την δημιουργία αυτών των καμπυλών παρασκευάστηκαν τα πρότυπα δείγματα των οξέων, της ρετινάλης και της ρετινόλης (παράρτημα 2). Στη συνέχεια δημιουργήθηκε ένα μίγμα (spike) που περιείχε τα οξέα, τη ρετινάλη και τη ρετινόλη σε αναλογία 1:25 (παράρτημα 2). 2ml spike αραιώθηκε με 2ml διαλύτη (standar 1) και στη συνέχεια ακολουθήθηκε σειριακή αραιώση του standar 1 με διαλύτη (παράρτημα 2).

Κάθε δείγμα standar αναλύθηκε τέσσερις φορές και πήραμε το μέσο όρο των τιμών του ύψους των κορυφών του χρωματογραφήματός του. Αυτές οι τιμές για το 13-cis ρετινοϊκό οξύ, το 9-cis ρετινοϊκό οξύ, το all-trans ρετινοϊκό οξύ, τη ρετινάλη και τη ρετινόλη αναγράφονται στους πίνακες 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 αντίστοιχα. Με τη βοήθεια των πινάκων αυτών δημιουργήσαμε τις πρότυπες καμπύλες που φαίνονται παρακάτω.

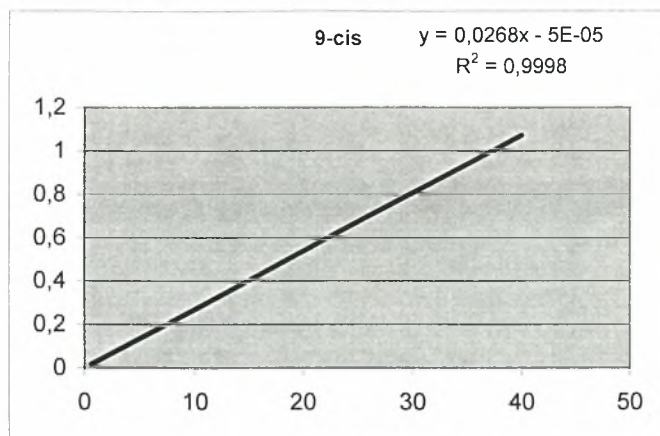
Πίνακας 3.1

13-cis ρετινοϊκό οξύ	
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ng/ml)	ΥΨΟΣ (mAu)
0,049	0,02
0,098	0,02
0,196	0,024
0,39	0,029
0,78	0,043
1,57	0,076
3,14	0,16
6,28	0,28
12,55	0,565
25,1	1,125



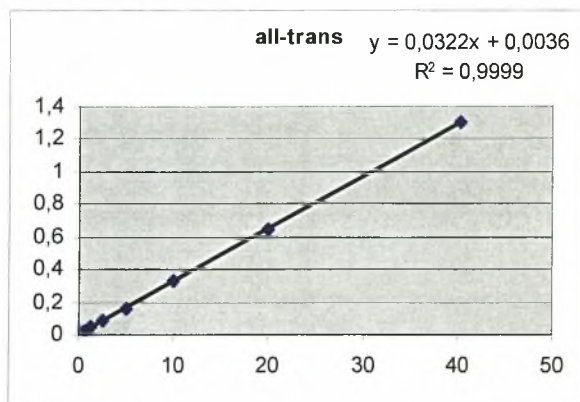
Πίνακας 3.2

9-cis ρετινοϊκό οξύ	
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ng/ml)	ΥΨΟΣ (mAu)
0,078	0,01
0,156	0,016
0,3125	0,0175
0,625	0,019
1,25	0,04
2,5	0,067
5	0,1275
10	0,2675
20	0,53
40	1,075



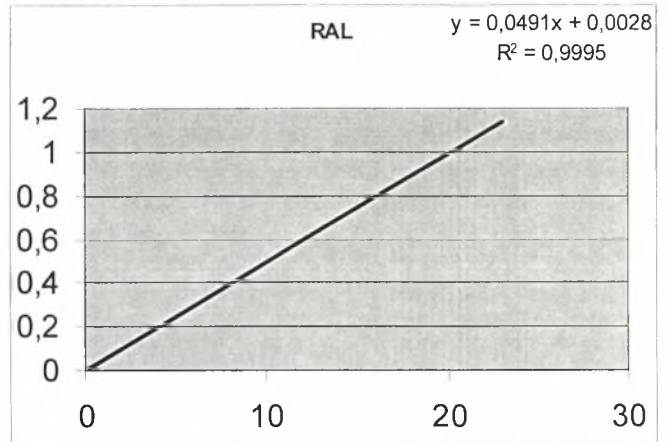
Πίνακας 3.3

all-trans ρετινοϊκό οξύ	
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ng/ml)	ΥΨΟΣ (mAu)
0,078	0,017
0,157	0,017
0,314	0,019
0,628	0,028
1,25	0,046
2,5125	0,082
5,025	0,16
10,05	0,33
20,1	0,65
40,2	1,3



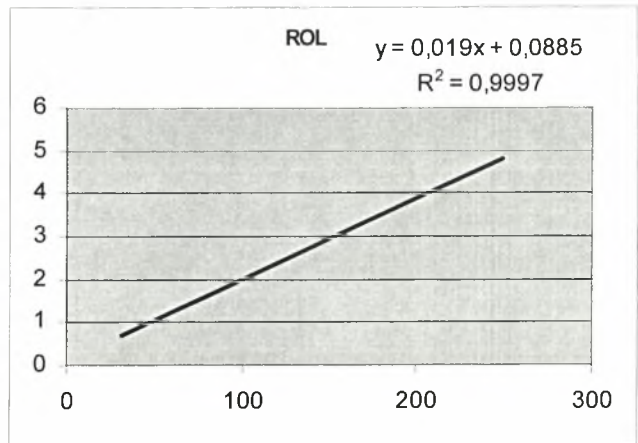
Πίνακας 3.4

Ρετινάλη	
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ng/ml)	ΥΨΟΣ (mAu)
0,045	0,012
0,09	0,011
0,18	0,0135
0,36	0,02
0,72	0,035
1,44	0,058
2,88	0,1475
5,75	0,295
11,5	0,58
23	1,125



Πίνακας 3.5

Ρετινόλη	
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ng/ml)	ΥΨΟΣ (mAu)
31,05	0,64
62,1	1,3
124,2	2,475
248,4	4,8
496,87	9,35
993,75	18,5
1987,5	35,875
3975	72,3
7650	138,85
15900	274,525



IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για την διαπίστωση του ποσού της ρετινόλης και των οξέων που ανακτάται κατά την εκχύλιση των δειγμάτων υπολογίσαμε το ποσό της ρετινόλης και των οξέων σε τρία διαφορετικά δείγματα:

- ✓ Δείγμα 1:500μl ορός+500μl CH₃CN
- ✓ Δείγμα 2:500μl ορός, 50μl spike+450μl CH₃CN
- ✓ Δείγμα 3:50 μl spike+950 μl διαλύτη.

	Δείγμα 1	Δείγμα 3	Δείγμα 2	Ανάκτηση
Ρετινόλη	2,83	46,95	48,12	97%
13-cis	0,03	0,3	0,29	88%
9cis		0,12	0,12	100%
All-trans	0,04	0,25	0,28	97%
Ρετινάλη	0,06	0,62	0,52	76%

Η ανάκτηση των ρετινοειδών υπολογίστηκε σύμφωνα με το τύπο:

$$\text{Ύψος δείγματος 2} / (\text{ύψος δείγματος 1 και 3})$$

Στο συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήσαμε τέσσερις αιμοληψίες στο κάθε πειραματόζωο. Η πρώτη αιμοληψία (start) έγινε πριν τη επέμβαση σε όλους τους αρουραίους (n = 25). Σε κάθε αιμοληψία η ποσότητα του αίματος που πάρθηκε δεν ξεπερνούσε το 1,5 ml, αυτό έγινε γιατί ο συνολικός όγκος του κυκλοφορούντος αίματος στους αρουραίους είναι 15-35ml και λήψη αίματος πάνω από το 10% του συνολικού όγκου αίματος μπορεί να καταστεί επιβλαβής για τον οργανισμό τους. Στο τέλος της αιμοληψίας αυτής συγκεντρώθηκαν 16 δείγματα αίματος στα οποία ήταν δυνατή η ανάλυση. Στα υπόλοιπα δεν ήταν δυνατόν η ανάλυσή τους διότι η ποσότητα αίματος που μπόρεσαν να δώσουν δεν ήταν επαρκής.

Μετά το πέρας τεσσάρων εβδομάδων από την απολίνωση πραγματοποιήθηκε δευτερή αιμοληψία στους εναπομείναντες 11 αρουραίους (4 weeks). Οι υπόλοιποι αρουραίοι (n=14) απεβίωσαν λίγες ημέρες μετά την απολίνωση. Τα επαρκή προς ανάλυση δείγματα που μαζεύτηκαν τελικά ήταν 9 (6 δείγματα αίματος από τα

κιρρωτικά και 3 δείγματα από τους μάρτυρες), διότι 2 αρουραίοι δεν έδωσαν επαρκή ποσότητα αίματος.

Την επόμενη τους χορηγήθηκε βιταμίνη Α και τέσσερις ώρες μετά την ενδομυϊκή χορήγηση της, πραγματοποιήθηκε η τρίτη αιμοληψία (4 hours). Λήψη επαρκούς ποσότητας αίματος ήταν εφικτή μόνο στους 12 αρουραίους (6 κιρρωτικούς και 6 μάρτυρες).

Την επόμενη ημέρα (24 ώρες από τη χορήγηση βιταμίνης Α), πραγματοποιήθηκε λήψη αίματος από την κάτω κοίλη φλέβα, παραλαβή ήπατος και θανάτωση. Συλλέχθηκαν 8 δείγματα αίματος (24 Hours).

Μετά τη συλλογή τους, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την ανάλυση τους.

Από τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων, καταγράφηκε το ύψος της κάθε κορυφής. Με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης, υπολογίστηκε η συγκέντρωση της ρετινόλης και των οξέων του κάθε δείγματος. Στην πλειονότητα των δειγμάτων δεν ήταν εφικτή η ανίχνευση των οξέων διότι τα περισσότερα δείγματα ήταν αιμολυμένα. Η αιμόλυση προκάλεσε την εμφάνιση μιας πλατιάς κορυφής που επικάλυπτε τις κορυφές των οξέων στο χρωματογράφημα.

Οι συγκεντρώσεις των οξέων παρατίθενται στον πίνακα 4.1. Οι συγκεντρώσεις της ρετινόλης, στα κιρρωτικά και στους μάρτυρες παρατίθενται στους πίνακες 4.2 και 4.3 αντίστοιχα.

Πίνακας 4.1. Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων κιρρωτικών και μαρτύρων για ρετινοϊκά οξέα.

	13-CIS	ALL-TRANS	Χρονική στιγμή λήψης αίματος
ΚΙΡΡΩΤΙΚΑ	Συγκέντρωσης οξέων (ngr/ml)		
2Δ	3,14	4,24	START
4ΔΕ	1,83	3,61	4WEEKS
7Δ	4,72	5,48	4WEEKS
6Δ	1,29	1,53	4HOURS
ΜΑΡΤΥΡΕΣ			
12		0,60	4WEEKS
10	0,43		4HOURS

Πίνακας 4.2. Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων κίρρωτικών αρουραίων.

ΚΙΡΡΩΤΙΚΑ	START	4 WEEKS	4 HOURS	24 HOURS
Συγκέντρωσης ρετινόλης (ng/ml)				
1ΑΕ	58,5	Κατέληξε		
4Δ	100,6	Κατέληξε		
5Δ	90,08	Κατέληξε		
8Δ	121,66	Κατέληξε		
2ΑΕ	79,55	58,5	58,50	53,24
7Δ	126,92	100,61	53,24	38,50
2Δ	100,61	70,45	79,55	12,71
6Δ	100,61	42,71	8,50	13,76
4ΔΕ	ΑΠΔ ²	74,29	74,29	4,82
11	121,66	47,97	79,55	Κατέληξε
8	90,08	Κατέληξε		
13	116,39	Κατέληξε		
AV	100,61	76,92	58,94	24,61
SD	16,04	39,28	30,26	14,59
CV%	15,94%	51,17%	51,34%	59,28%

Πίνακας 4.3. Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων μαρτύρων (sham).

ΜΑΡΤΥΡΕΣ	START	4 WEEKS	4 HOURS	24 HOURS
Συγκέντρωσης ρετινόλης ρετινόλης (ng/ml)				
5A	47,97	ΑΠΔ	26,92	40,61
6A	100,61	ΑΠΔ	36,39	14,29
7A	95,34	ΑΠΔ	47,97	24,82
10	47,97	69,03	84,82	Κατέληξε
9	137,45	105,87	110	Κατέληξε
12	ΑΠΔ	36,92	Κατέληξε	Κατέληξε
14	ΑΠΔ	ΑΠΔ	58,5	Κατέληξε
AV	85,87	70,61	60,76	26,57
SD	38,21	34,50	35,02	13,25
CV%	44,49%	48,86%	58,09%	49,87%

² ΑΠΔ: Ανεπαρκής ποσότητα δείγματος.

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της εργασίας ήταν να στηθεί ένα πειραματικό εργαστήριο με επίμυες και ένα πειραματικό μοντέλο κίρρωσης. Στο μοντέλο αυτό διερευνήθηκε το πώς σχετίζεται ο μεταβολισμός της βιταμίνης Α με κάποια βλάβη στο ήπαρ (κίρρωση). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία στην κίρρωση έχουμε καταστροφή των κυττάρων από τα σταγονίδια χολής που εμφανίζονται μέσα στα χοληφόρα τριχοειδή. Άρα θα αναμένουμε απώλεια ή μείωση της λειτουργικότητας τους.

Έχει βρεθεί ότι η υπερβιταμίνωση Α επιδεινώνει την ηπατική ινογέννεση, ενισχύει την ηπατική βλάβη και προκαλεί θνησιμότητα. Η υποβιταμίνωση Α δεν μεταβάλλει την ινογενετική διαδικασία και δεν σχετίζεται με την αυξημένη τοξικότητα. Προφανώς η έλλειψη βιταμίνης Α, δεν επιδεινώνει την ηπατική ίνωση,

Από πειράματα που έγιναν σε ποντίκια όπου τους χορηγήθηκε CCL_4 (τετραχλωράνθρακας) για την δημιουργία κίρρωσης βρέθηκε πως η υποκινούμενη από τον CCL_4 κίρρωση σε συνδυασμό με την υπερβιταμίνωση Α, ενισχύει την σοβαρότητα της κίρρωσης γιατί η βιταμίνη Α αυξάνει την λιπιδική υπεροξειδωση (37,38). Η βιταμίνη Α ίσως να μεταβολίζεται στα ηπατικά μικροσωμάτια, ειδικά όταν η δράση του κυτοχρώματος P-450 ενισχύεται από την μεταχείριση με CCL_4 .

In vitro και in vivo πειράματα έχουν δείξει ότι ανεπάρκεια βιταμίνης Α οδηγεί σε αυξανόμενη σύνθεση κολλαγόνου (39). Το γεγονός ότι η έλλειψη ρετινοειδών μπορεί να προάγει την ινογέννεση, ιδιαίτερα στο ήπαρ, σχετίζεται με την ενεργοποίηση των δορυφορικών κυττάρων (40). Έχει βρεθεί ότι υπάρχει μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των ρετινυλικών εστέρων (παλμιτικός εστέρας) και το περιεχόμενο του κολλαγόνου, υπαινίσσοντας πως η μείωση του παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης ίσως να επιταχύνει την διαδικασία της ηπατικής ίνωσης (41) έτσι συμπεραίνουμε πως υψηλά επίπεδα παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης στα υποβιταμινικά ζώα προστατεύει από την ενίσχυση της ίνωσης. Επιπλέον, ζώα που τρέφονται με τροφή χωρίς βιταμίνη Α και φυσιολογικά τρεφόμενα ζώα, δεν διαφέρουν στα συμπτώματα που δίνουν όταν τους χορηγείται CCL_4 (κοκκινάδα, οίδημα, φλεγμονή).

Επίσης και η μικροσκοπική παρατήρηση έχει επιβεβαιώσει το γεγονός ότι η υπερβιταμίνωση Α επιδεινώνει την ηπατοτοξικότητα του CCL_4 , ενώ η ανεπάρκεια σε βιταμίνη Α δεν επηρεάζει την διαδικασία της ίνωσης. Συνεπώς η έλλειψη της

βιταμίνης Α είναι πιθανόν να είναι περισσότερο μια παρενέργεια της ηπατικής ίνωσης παρά η αιτία της έναρξης και της προόδου της ασθένειας. Τέλος υψηλά επίπεδα λήψης βιταμίνης Α δρουν σαν επιταχυντές, και όχι σαν εκκινητές της ηπατικής ίνωσης.

Στο δικό μας πείραμα, όπου δημιουργήσαμε στους αρουραίους κίρρωση με απολίνωση του χοληδόχου πόρου και στη συνέχεια (μετά την δημιουργία της κίρρωσης) τους χορηγήσαμε βιταμίνη Α παρατηρήσαμε τα παρακάτω όσον αφορά τα επίπεδα της ρετινόλης στον ορό τους.

Πρώτη Αιμοληψία

Στην πρώτη αιμοληψία (START) όλοι οι αρουραίοι ήταν υγιείς. Οι συγκεντρώσεις της ρετινόλης κυμαίνονται από 48-138 ngr/ml στο σύνολο των αρουραίων. Η μέση τιμή της είναι 96 ± 28 ngr/ml. Αυτήν η μεγάλη διακύμανση στην τιμή της πιθανόν να οφείλεται στην διαφορετική ποσότητα της τροφής που καταναλώνει ο κάθε αρουραίος καθημερινά (Παράρτημα 3). Αναλυτικότερα η ομάδα που θα αποτελούσε την ομάδα των μαρτύρων $n=5$ είχε κατά μέσο όρο συγκέντρωση ρετινόλης 85 ± 38 ngr/ml και εύρος 48-138 ngr/ml. Η ομάδα που θα αποτελούσε την ομάδα των κίρρωτικών εμφάνισε 100 ± 16 ngr/ml $n=11$ συγκέντρωση ρετινόλης (εύρος 58-126 ngr/ml).

Δεύτερη Αιμοληψία

Στην δεύτερη αιμοληψία η μια ομάδα των αρουραίων ήταν υγιείς αλλά τρεφόταν με την ίδια ποσότητα τροφής όπως και η ομάδα των αρουραίων που υπέστησαν απολίνωση του χοληδόχου πόρου. Σ' αυτήν την ομάδα η μέση τιμή της ρετινόλης στον ορό ήταν 71 ± 35 ngr/ml ($n=3$). Παρατηρούμε μια ελαφρά μείωση στο ποσό της ρετινόλης στο σύνολο των αρουραίων. Συγκρίνοντας, τις συγκεντρώσεις της ρετινόλης στις 2 αιμοληψίες στον κάθε αρουραίο ξεχωριστά (μόνο σε δύο μπορεί να γίνει η σύγκριση) βλέπουμε πως στον ένα αυξάνεται και στον άλλον μειώνεται η ποσότητα της ρετινόλης στον ορό. Αυτήν η διαφορά δεν είναι σημαντική και επιπλέον οι τιμές της ρετινόλης στους 2 αρουραίους στην δεύτερη αιμοληψία είναι μέσα στα φυσιολογικά επίπεδα της βιταμίνης Α στον ορό.

Η άλλη ομάδα που είχε υποστεί απολίνωση αναμένεται σύμφωνα με την βιβλιογραφία να έχουν πάθει κίρρωση μέσα σε 4 εβδομάδες. Σύμφωνα με τα

αποτελέσματα (πίνακας 4.2) βλέπουμε πως εμφανίζουν συγκέντρωση ρετινόλης κατά μέσο όρο 65 ± 21 ngr/ml, (n=6). Σε σχέση με το προηγούμενο στάδιο παρατηρούμε μια μείωση κατά 35 ngr/ml, κατά μέσο όρο. Αυτήν η μείωση παρατηρείται σε όλους της αουραίους με τον αουραίο 11 να εμφανίζει την μεγαλύτερη μείωση (κατά 62%). Ακολουθεί ο 6Δ στον οποίο μειώνεται η βιταμίνη Α κατά 50%. Στους υπόλοιπους αουραίους η μείωση είναι λιγότερο αισθητή (περίπου στα 20-30%)

Σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων που δεν εμφάνισαν αξιοσημείωτη μεταβολή στο ποσό της ρετινόλης (αυξομείωση σε σχέση με την πρώτη αιμοληψία κατά ένα παράγοντα 17%), παρατηρούμε πως η ομάδα των κίρρωτικών παρουσιάζει αξιοσημείωτη μείωση στο ποσό της ρετινόλης.

Τρίτη Αιμοληψία

Στην τρίτη αιμοληψία η ομάδα των μαρτύρων παρουσίασαν μια τιμή ρετινόλης 60 ± 35 ngr/ml (n=6). Παρατηρούμε πως σε σχέση με το προηγούμενο στάδιο η συγκέντρωση της βιταμίνης Α είναι ελαφρώς μειωμένη. Πάλι συγκρίνοντας τον κάθε αουραίο ξεχωριστά (2 πάλι στο σύνολο) στις διαδοχικές αιμοληψίες παρατηρούμε πως και στις 2 αυξάνεται (ελάχιστα βέβαια) η ρετινόλη. Σ' αυτό το στάδιο θα αναμέναμε να αυξάνεται το ποσό της ρετινόλης 4 ώρες μετά την ενδομυϊκή χορήγηση της. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία 4 ώρες μετά την ενδομυϊκή χορήγηση της ρετινόλης, η συγκέντρωση της αναμένεται να φτάνει στο μέγιστό της συγκέντρωσης της στο αίμα.. 15 ώρες πριν την χορήγηση βιταμίνης Α είχε αφαιρεθεί η τροφή, άρα η ποσότητα της βιταμίνης Α που παρατηρήθηκε στον ορό μπορεί να προερχόταν μόνο από το ποσό που τους χορηγήσαμε. Γι αυτό δεν παρατηρήσαμε κάποια σημαντική μεταβολή στο ποσό της ρετινόλης σε σχέση με πριν.

Η ομάδα των κίρρωτικών πάλι εμφανίζει μια μείωση στο σύνολο των αουραίων

- πριν την χορήγηση βιταμίνης Α, συγκέντρωση ρετινόλης: 65 ngr/ml,
- μετά την χορήγηση βιταμίνης Α, συγκέντρωση ρετινόλης: 58,9 ngr/ml

αυτήν η διαφορά δεν είναι σημαντική. Συγκρίνοντας ,όμως το ποσό της βιταμίνης στον κάθε αουραίο ξεχωριστά (πρίν και μετά την χορήγηση βιταμίνης Α) παρατηρούμε πως στους 3 αουραίους παραμένει στα ίδια επίπεδα, μόνο σε έναν αυξάνεται λίγο και στους άλλους 2 μειώνεται. Η πιο δραματική μείωση παρατηρείται στον 6Δ που μειώνεται κατά πέντε φορές το ποσό της ρετινόλης.

Τέταρτη Αιμοληψία

Σ' αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκε η αιμοληψία από την κάτω κοίλη φλέβα και ακολούθησε η θανάτωση τους. Στην ομάδα των μαρτύρων παρατηρούμε πως η μέση τιμή της ρετινόλης μειώνεται στο μισό σε σχέση με την τρίτη αιμοληψία. Συγκρίνοντας τον κάθε αρουραίο ξεχωριστά παρατηρούμε πως στους 2 από τους 3 που μπορεί να γίνει η σύγκριση, η ρετινόλη μειώνεται σχεδόν στο μισό (αρουραίους 6A και 7A). Αντίθετα στον τρίτο αρουραίο (5A) παρατηρείται αύξηση (από 26 ngr/ml αυξάνεται στα 40 ngr/ml). Αυτήν η διαφορά στο ποσό της βιταμίνης A οφείλεται στο γεγονός ότι ανάμεσα στις 2 τελευταίες αιμοληψίες μεσολάβησε ένα διάστημα (24 ώρες) που οι αρουραίοι κατανάλωσαν ελάχιστη τροφή λόγω της αδιαθεσίας που τους προκλήθηκε από την τρίτη αιμοληψία. Σε κάθε αιμοληψία ήταν αναγκαία η αναισθησία των αρουραίων για την λήψη του αίματος. Συνεπώς μετά την αιμοληψία χρειαζόταν να περάσουν κάποιες ώρες (διαφορετικές για τον κάθε αρουραίο) μέχρι να επανέλθουν στην προηγούμενή τους κατάσταση. Όση ώρα ήταν ακόμη αδιάθετοι, παρατηρήθηκε μη-κατανάλωση τροφής και αδιαθεσία για οποιαδήποτε κίνηση. Στους 2 αρουραίους που παρατηρήθηκε μείωση της βιταμίνης A, η τροφή που κατανάλωσαν στις 24 ώρες ήταν ελάχιστη έως μηδαμινή(4 gr).

Τέλος στην ομάδα των κίρρωτικών παρατηρήσαμε πως η μέση τιμή της ρετινόλης μειώνεται στο μισό σε σχέση με την τρίτη αιμοληψία. Συγκρίνοντας τον κάθε αρουραίο ξεχωριστά παρατηρούμε πως αυτήν η μείωση παρουσιάζεται σε όλους σχεδόν τους αρουραίους που ανήκουν στην ομάδα των κίρρωτικών. Σε κάποιους παρατηρείται σημαντική μείωση στο ποσό της ρετινόλης (4ΔΕ και 2Δ αρουραίους), σε κάποιους μικρή σχετικά μείωση (αρουραίους 2ΑΕ και 7Δ) και στον 6Δ αρουραίο παρατηρείται μια μικρή αύξηση στο ποσό της ρετινόλης σε σχέση με την προηγούμενη αιμοληψία. Αυτήν η μείωση στους περισσότερους αρουραίους κατά πιθανόν να οφείλεται όπως προείπαμε πάλι στην μη-επαρκή κατανάλωση τροφής στο 24ωρο που μεσολάβησε στις 2 αιμοληψίες.

Γενικά παρατηρούμε πως στην δεύτερη αιμοληψία αν και δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στη μέση τιμή της ρετινόλης μεταξύ των κίρρωτικών και των μαρτύρων (66 και 71 ngr/ml αντίστοιχα), εντούτοις υπάρχει σημαντική διαφορά στην κάθε ομάδα ξεχωριστά αν συγκρίνουμε τις 2 πρώτες αιμοληψίες. Στα κίρρωτικά η βιταμίνη A μειώνεται κατά 50% στο μέσο όρο και παρουσιάζει καθοδική πορεία σε όλους τους κίρρωτικούς αρουραίους. Το γεγονός ότι η μείωση είναι πιο δραματική

μόνο στους 2 από τους 6 αρουραίους πιθανόν έχει να κάνει με το στάδιο της κίρρωσης που βρισκόταν ο κάθε αρουραίος την στιγμή της αιμοληψίας. Από την μακροσκοπική και ιστολογική εξέταση του ήπατος στο παθολογοανατομικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Λάρισας (Π.Π.Ν.Σ.Λ) βρέθηκε να έχει φτάσει στο τρίτο στάδιο η κίρρωση μόνο στα 2 ήπατα από το σύνολο των κίρρωτικών (συγκεκριμένα στον 6Δ και στον 11 αρουραίος). Στους υπόλοιπους αρουραίους η κίρρωση τους ήταν ακόμη πρώτου σταδίου. Αυτό έχει να κάνει πιθανός με μη σωστή απολίνωση από τον χειρουργό.

Αντίθετα στους μάρτυρες η μέση τιμή μειώνεται μόνο κατά 17% και παρουσιάζει αυξομείωση στο αν την δούμε στον κάθε αρουραίο ξεχωριστά. Αυτήν η μείωση είναι μέσα στα φυσιολογική διακύμανση που έχει η βιταμίνη Α στο αίμα του κάθε αρουραίο και σχετίζεται με τις διατροφικές συνθήκες του κάθε πειραματόζωου.

Συνεπώς, η μείωση της βιταμίνης Α μόνο στα κίρρωτικά, μας οδηγεί να συμπεράνουμε ότι στην κίρρωση κάποιος μηχανισμός (μεταφοράς, αποθήκευσης ή μεταβολισμού της βιταμίνης Α) πιθανόν να διαταράσσεται.

Στην τρίτη αιμοληψία παρατηρούμε πως μόνο στους αρουραίους που διαπιστώθηκε κανονική κίρρωση (6Δ και 11 αρουραίοι) η βιταμίνη Α μειώνεται σημαντικά. Στους μάρτυρες και στους αρουραίους που ανήκουν στην ομάδα των κίρρωτικών και δεν είχαν πάθει ακόμη κανονική κίρρωση δεν παρατηρείται μεταβολή στην βιταμίνη Α. Συνεπώς στους 2 κίρρωτικούς αρουραίους η χορηγηθείσα βιταμίνη δεν υπάρχει στο αίμα τους στην μορφή της ρετινόλης γιατί έχει διαταραχθεί κάποιος από τους μηχανισμούς μεταφοράς στο ήπαρ, μεταβολισμού και εξαγωγής της βιταμίνης Α από το ήπαρ. Το μικρό ποσό που υπάρχει στον ορό αυτών των αρουραίων προφανώς προέρχεται από τους υπόλοιπους ιστούς που θα είχαν κάποιο ποσό από πριν την κίρρωση.

Στους υπόλοιπους κίρρωτικούς που δεν έπαθαν 3^{ου} σταδίου κίρρωση (άρα ένα σημαντικό ποσό βιταμίνης Α, μπορεί να μεταβολισθεί από το ήπαρ) παρατηρείται η βιταμίνη Α να βρίσκεται στα ίδια επίπεδα σε σχέση με πριν την χορήγηση βιταμίνης Α, πάλι για τον ίδιο λόγο που προαναφέραμε για τους μάρτυρες. Όμως, όσον αφορά την πορεία της ρετινόλης, στους μάρτυρες αυξάνεται ελάχιστα, ενώ στους κίρρωτικούς πρώτου σταδίου μειώνεται ελάχιστα,. Συνεπώς υπάρχει κάποια διαφορά (όχι στατιστικά σημαντική λόγω του μικρού μεγέθους των συγκρινόμενων δειγμάτων) που υποδηλώνει μια ελαφριά παρεμπόδιση στον μεταβολισμό της βιταμίνης Α στους πρώτου σταδίου κίρρωτικούς αρουραίους.

Στην εργασία αυτή στήθηκε ένα πειραματικό μοντέλο κίρρωσης σε αρουραίους. Διερευνήθηκαν οι συνθήκες, οι τεχνικές και οι προϋποθέσεις που απαιτούνται για την εφαρμογή του μοντέλου αυτού στα συγκεκριμένα εργαστήρια της μελέτης. Διαπιστώθηκαν κάποιες αδυναμίες του μοντέλου αυτού και πιθανοί τρόποι άρσης τους, για την αποφυγή κυρίως των μετεγχειρητικών τραυμάτων τα οποία οδηγούν σε θάνατο των αρουραίων. Τα πιθανά μέτρα αντιμετώπισης είναι:

- ✓ Βελτίωση της τεχνικής της αιμοληψίας
- ✓ Βελτίωση της αναισθησίας
- ✓ Βελτίωση των συνθηκών της χειρουργικής επέμβασης
- ✓ Διαμόρφωση κατάλληλου περιβάλλοντος μετά την επέμβαση

Το μοντέλο αυτό είναι χρήσιμο για τη μελέτη του μεταβολισμού της βιταμίνης Α στην κίρρωση αλλά και για άλλες μελέτες που αφορούν τη συγκεκριμένη παθολογική κατάσταση.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Χημικά αναλώσιμα	Εταιρία
13-cis ρετινοϊκό οξύ	Sigma, St. Louis, MO
all trans ρετινοϊκό οξύ	Sigma, St. Louis, MO
9-cis ρετινοϊκό οξύ	Sigma, St. Louis, MO
ρετινόλη	Fluka (Buchs, Switzerland)
CH ₃ COH	J.T.Baker HPLC Analyzed, Holland
CH ₃ CN	Merck KGaA Darmstadt, Germany
CH ₃ COOH	Fluka Chemie AG, CH-9470 Buchs
CH ₃ COONa	PA Panreac, Barcelona, Espana
H ₃ PO ₄	J.T. Baker, Holland
HNaO	Merk KGaA, Germany

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

A) Παρασκευή πρότυπων βιταμίνης A

Η παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων έγινε στο εργαστήριο υπό τον φωτισμό αμυδρού φωτός, με σκοπό την προστασία των ρετινοειδών από την φωτοϊσομερείωση. Τα πρότυπα διαλύματα φυλάχτηκαν σε ογκομετρικές φιάλες και σφραγίστηκαν με καθαρό καπάκι, το οποίο το περιβάλαμε με ταινία παραφίνης για αποφυγή οξείδωσης. Τα πρότυπα διαλύματα μετά την παραγωγή τους φυλάχτηκαν στους -40°C .

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων ρετινόλης.

1. Ζύγισμα 31,8 mg ρετινόλης σε ογκομετρική των 100ml
2. Προσθήκη αιθανόλης ως τα 100ml

⇒ Παρασκευή διαλύματος stock ρετινόλης με συγκέντρωση 318.000 ng/ml

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων 13-cis ρετινοϊκού οξέως

1. Ζύγισμα 13,8mg 13-cis ρετινοϊκού οξέως σε ογκομετρική 100ml
2. Προσθήκη αιθανόλης ως τα 100ml
3. Παρασκευή διαλύματος 13-cis ρετινοϊκού οξέως με συγκέντρωση 138.000 ng/ml
4. Πρόσληψη 1 ml και αραιώση σε ογκομετρική των 10 ml με αιθανόλη

⇒ Παρασκευή διαλύματος stock 13-cis ρετινοϊκού οξέως με συγκέντρωση 13.800 ng/ml

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων 9-cis ρετινοϊκού οξέως (Το 9-cis ρετινοϊκό οξύ βρίσκεται σε φιαλίδιο και η ποσότητα που περιέχει είναι 1 mgr).

1. Σε ογκομετρική 50ml προσθήκη 25ml αιθανόλης

2. Καλός καθαρισμός εξωτερικά του φιαλιδίου και προσθήκη του φιαλιδίου στην ογκομετρική
3. Προσθήκη αιθανόλης μέχρι τα 50ml

⇨ Παρασκευή διαλύματος stock 9-cis ρετινοϊκού οξέως με συγκέντρωση 20.000 ng/ml

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων all trans ρετινοϊκού οξέως.

1. Ζύγισμα 20,1 mg all trans ρετινοϊκού οξέως σε ογκομετρική 100ml
2. Προσθήκη αιθανόλης ως τα 100ml
3. Πρόσληψη 1 ml και αραιώση σε ογκομετρική των 10 ml με αιθανόλη

⇨ Παρασκευή διαλύματος stock all trans ρετινοϊκού οξέως με συγκέντρωση 20.100 ng/ml

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων ρετινάλης.

4. Ζύγισμα 11,5 mg all trans ρετινάλης σε ογκομετρική 100ml
5. Προσθήκη αιθανόλης ως τα 100ml
6. Πρόσληψη 1 ml και αραιώση σε ογκομετρική των 10 ml με αιθανόλη

⇨ Παρασκευή διαλύματος stock ρετινάλης με συγκέντρωση 11.500 ng/ml.

B) Παρασκευή μείγματος spike

Σε ογκομετρική των 50 ml προστέθηκε 5 ml από το stock ρετινόλης (ROL), 0.2 ml από το stock all-trans ρετινοϊκό οξύ (ALL-TRANS) , 0.2 ml από το stock 13-cis ρετινοϊκό οξύ (13-CIS), 0.2 ml από το stock 9-cis ρετινοϊκό οξύ (9-CIS) και 0,2 ml από το stock ρετινάλης (RAL). Συμπλήρωση όγκου με ακετονιτρίλιο.

Γ) Πρότυπη καμπύλη

Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρειάστηκαν δέκα τιμές αναφοράς για το κάθε συστατικό. Έτσι δημιουργήθηκαν δέκα διαφορετικά διαλύματα (standars).

Δημιουργία standar 1 (ST1): σε σωληνάκι αναμείχθηκε 1 ml SPIKE, 0.7 ml Μεθανόλη και 0,3 ml buffer (0.02M AcOH, 0.1M AcONa): pH 5.4.

Στη συνέχεια σειριακή αραιώση εννιά φορές με διαλύτη. Οι συγκεντρώσεις του spike και των δέκα standar που δημιουργήθηκαν παρατίθενται παρακάτω:

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	C _{SPIKE}	C _{ST1}	C _{ST2}	C _{ST3}	C _{ST4}	C _{ST5}	C _S T6	C _{ST7}	C _{ST8}	C _{ST9}	C _{ST10}
ROL	31800	15900	7950	3975	1987.5	993.75	497	248.4	124.2	62.1	31.05
ALL-TRANS	402	25.1	12.55	6.28	3.14	1.57	0.78	0.39	0.196	0.098	0.049
13-CIS	55.2	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.15625	0.078125
9-CIS	80	40.2	20.1	10.05	5.025	2.5125	1.25625	0.628125	0.3140625	0.15703125	0.078515625
RAL	80.4	23	11.5	5.75	2.88	1.44	0.72	0.36	0.18	0.09	0.045

Δ) Παρασκευή διαλύματος ρετινόλης (βιταμίνης A) για ενδομυϊκή χορήγηση στους αρουραίους.

1. Ζύγιση 0,3 gr ρετινόλης σε ογκομετρική των 10 ml σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού.
2. Προσθήκη 2 ml (με σιφόνιο πλήρωσεως) αιθανόλης.
3. Καλή διάλυση και αποθήκευση στους - 40°C.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

A) Η ποσότητα της τροφή που καταναλώθηκε

	ΚΙΡΡΩΤΙΚΑ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ
Τροφή που καταναλώθηκε (gr)		
START	24 -100	24 - 100
4 WEEKS	10 - 15	10 - 15
4 HOURS	Νηστεία	Νηστεία
24 HOURS	3 - 5	3 - 5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fennema O. R.: Vitamins. In : “ Food Chemistry ” (ed. Dekker M.), 3rd Edition, Marcel Dekker Inc., New York 1996
2. Blaner, W.S., and Olson, J.A. (1994) Retinol and Retinoic Acid Metabolism, in the Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine, 2nd edn., Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S., eds., Raven Press, New York, pp. 229-256.
3. Vogel, S., Gamble, M.V., and Blaner, W.S. (1999) Retinoid Uptake, Metabolism and Transport, in The Handbook of Experimental Pharmacology, The Retinoids, Nau, H., and Blaner, W.S., eds., Springer Verlag, Heidelberg, pp. 31-96.
4. Ball C. F. M: The fat soluble vitamins. In: “ Food Analysis by HPLC ” (ed. Nollet L. M.), 1st Edition, Marcel Dekker, Inc., New York 1996.
5. Wald, G. (1968) Molecular Basis of Verlag Excitation, *Nature* 219: 800-807.
6. Saari, J.C. (1999) Retinoids in Mammalian Vision, in The Handbook of Experimental Pharmacology, The Retinoids, Volume 139, Nau, H., and Blaner, W.S., eds., Springer Verlag, Heidelberg, pp. 563-588.
7. Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., and Evans, R.M. (1994) The Retinoids Receptors, in the Retinoids, Biology, Chemistry and Medicine, 2nd edn., Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S., eds., Raven Press, New York, pp. 319-350.
8. Chambon, P. (1994) The Retinoid Signaling Pathway: Molecular and Genetic Analysis, *Cell Biology* 5: 115-125.
9. Mertz, J.R., Shang, E., Piantedosi, R., Wei, S., Wolgemuth, D.J., and Blaner, W.S. (1997) Identification and Characterization of a Stereospecific Human Enzyme That Catalyzes 9-cis-Retinol Oxidation, *J. Biol. Chem.* 272: 11744-11749.
10. Chai, X., Zhai, Y., and Napoli, J.L. (1997) Cdna Cloning and Charactirization of a cis-Retinol/3 α -Hydroxysterol Short-Chain Dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 272: 3125-3131.
11. Soprano, D.R., and Blaner, W.S. (1994) plasma Retinol-Binding Protein, in The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine, 2nd edn., Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S., Raven Press, New York, pp. 229-256.
12. Ong, D.E., Newcomer, M.E., Lareyre, J.J., and Orgebin-Crist, M.C. (2000) Epididymal Retinoic Acid-Binding Protein, *Biochim, Biophys. Acta* 1482: 209-217.
13. Tanaka, T., Urade, Y., Kimura, H., Eguchi, N., Nishikawa, A., and Hayaishi, O. (1997) Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase (β -Trace) Is a Newly Recognized Type of Retinoid Transporter, *J. Biol. Chem.* 272: 15789-15795.

14. Ong, D.E., Newcomer, M.E., and Chytil, F. (1994) Cellular Retinoid-Binding Proteins, in *The Retinoids, Biology, Chemistry, and Medicine*, 2nd edn., Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S., eds., Raven Press, New York, pp. 283-318.
15. Noy, N. (2000) Retinoid-Binding Proteins: Mediators of Retinoid Action, *Biochem. J.* 348: 481-495.
16. Levin, M.S., Locke, B., Yang, N.C., Li, E., and Gordon, J.I. (1998) Comparison of The Ligand Binding Properties of Two Homologous Rat Apocellular Retinol-Binding Proteins Expressed in *Escherichia coli*, *J. Boil. Chem.* 263: 17715-17723.
17. Vogel, S., Mendelsohn, C.L., Mertz, J.R., Piantedosi, R., Waldburger, C., Gottesman, M.E., and Blaner, W.S. (2001) Characterization of a New Member of The Fatty Acid-Binding Protein Family that Binds all-trans-Retinol, *J. Boil. Chem.* 276: 1353-1360.
18. Folli, C., Calderone, V., Ramazzina, I., Zanotti, G., and Berni, R. (2002) Ligand Binding and Structural Analysis of a Human Putative Cellular Retinol-Binding Protein, *J. Bio. Chem.* 277: 41970-41977.
19. Saari, J.C., Bredberg, L., and Garwin, G.G. (1982) Identification of The Endogenous Retinoids Associated with Three Cellular Retinoid-Binding Proteins From Bovine Retina and Retinal Pigment Epithelium, *J. Bio. Chem.* 257: 13329-13333.
20. Panagabko, C., Morley, S., Hernandez, M., Cassolato, P., Gordon, H., Parsons, R., Manor, D., and Atkinson, J. (2003) Ligand Specificity in The Cral-Trio Protein Family, *Biochemistry* 42: 6467-6467.
21. Gudas, L.J., Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1994) Cellular Biology and Biochemistry of Retinoids, in *The Retinoids, Biology, Chemistry and Medicine*, 2nd edn., Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S., eds., Raven Press, New York, pp. 443-520.
22. Bastien, J., and Rochette-Egly, C. (2004) Nuclear Retinoid Receptors and The Transcription of Retinoid-Target Genes, *Gene* 328: 1-16.
23. Shulman, A.I., Larson, C., Mangelsdorf, D.J., and Ranganathan, R. (2004) Structural Determinants of Allosteric Ligand Activation in RXR Heterodimers, *Cell* 116: 417-429.
24. Herr, F. M., and Ong, D. E. (1992) Differential Interaction of Lecithin-Retinol Acyltransferase with Cellular Retinol Binding Proteins, *Biochemistry* 31: 6748-6755.
25. Goodman, D.S., Huang, H.S., and Shiratori, T. (1965) Tissue Distribution and Metabolism of Newly Absorbed Vitamin A in The Rat, *J. Lipid Res.* 6: 390-396.
26. Blaner, W.S., Obunike, J.C., Kurlandsky, S.B., Al-Haideri, M., Piantedosi, R., Deckelbaum, R.J., and Goldberg, I.J. (1994) Lipoprotein Lipase Hydrolysis of Retinyl Ester. Possible Implications for Retinoid Uptake by Cells, *J. Bio. Chem.* 269: 16559-16565.

27. van Bennekum, A.M., Kako, Y., Weinstock, P.H., Harrison, E.H., Deckelbaum, R.J., Goldberg, I.J., and Blaner, W.S. (1999) Lipoprotein Lipase Expression Level Influences Tissue Clearance of Chylomicron Retinyl Ester, *J. Lipid Res.* 40: 565-574.
28. Noy, N., and Blaner, W.S. (1991) Interactions of Retinol with Binding Proteins: Studies with Rat Cellular Retinol-Binding Protein and With Rat Retinol-Binding Protein, *Biochemistry* 30: 6380-6386.
29. Blaner, W.S. (1994) Retinoid (Vitamin A) Metabolism and The Liver, in *The Liver, Biology and Pathobiology*, 3rd edn., Arias, I.M., Jakoby, W.B., Popper, H., Schacter, D., and Shafritz, D.S., eds., Raven Press, New York, pp. 529-542.
30. Geerts, A., Bleser, P.D., Hautekeete, M.L., Niki, T., and Wisse, E. (1994) Fat-Storing (Ito) Cell Biology, in *The Liver: Biology and Pathobiology*, 3rd edn., Arias, I.M., Boyer, J.L., Fausto, N., Jakoby, W.B., Schachter, D., and Shafritz, D.A., eds., Raven Press, New York pp. 819-837.
31. Goodman, D.S. (1980) Vitamin A Metabolism, *Fed. Proc.* 39: 2716-2722.
32. Fausto Andreola, Diego F. Calvisi, Guillermo Elizondo, Sonia B. Jakowlew, Jennifer Mariano, Frank J. Gonzales, and Luigi M. De Luca. Reversal of Liver Fibrosis in Aryl Hydrocarbon Receptor null Mice by Dietary Vitamin A Depletion. *Hepatology* 2004;39: 157-166.
33. Friedman SL. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *J. Bio. Chemistry* 2000; 275:2247-2250.
34. Blomhoff R. Retinoids may Increase Fibrotic Potential of TGF-beta: Crosstalk Between Two Multi-Functional Effectors. *Hepatology* 1997; 26:1067-1068.
35. Geubel AP, De Galosy C., Alves N., Rahier J., Dive C., Liver Damage Caused by Therapeutic Vitamin A Administration: Estimate of Dose-Related Toxicity in 41 Cases. *Gastroenterology* 1991; 100:1701-1709.
36. Okuno M, Moriwaki H, Imai S, Muto Y, Kawada N, Suzuki Y, Kojima S. Retinoids Exacerbate Rat Liver Fibrosis by Inducing the Activation of Latent TGF-beta in Liver Stellate Cells. *Hepatology* 1997; 26:913-921.
37. Brigitte Vollmar, Christine Heckman, Sven Richter and Michael D. Menger. High, but not Low, Dietary Retinoids Aggravate Manifestation of Rat Liver Fibrosis. *J. of Gastroenterology and Hepatology* 2002; 17:791-799.
38. Elsis Aed, Earnest D, Sipes I. Vitamin A Potentiation of Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity: Enhanced Lipid Peroxidation without Enhanced Biotransformation. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 1993; 119:289-294.
39. Knook D, Bosma A, Seifert W. Role of Vitamin A in Liver Fibrosis. *J. Gastroenterology Hepatology* 1995; 10:47-49.

40. Davis B, Vucic A. The Effect of Retinol on Ito Cell Proliferation in Vitro. *Hepatology* 1988; 8:788-793.

41. Yamane M, Tanaka Y, Marumo F, Sato C. Role of Hepatic Vitamin A and Lipocyte Distribution in Experimental Hepatic Fibrosis. *Liver* 1993; 13:282-287.