



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ  
Διευθυντής: Καθηγητής Νικόλαος ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ

F

**Διδακτορική Διατριβή**

"Εκτίμηση της in vivo δραστικότητας του κυτοχρώματος CYP1A2 με χρωματογραφικό προσδιορισμό των μεταβολιτών της καφεΐνης σε ασθενείς με χρόνια ηπατική νόσο"

Υπό

**ΠΑΠΑΚΩΣΤΑ ΣΤΥΛΙΑΝΗΣ**  
**ΙΑΤΡΟΥ**

Ειδικευόμενης Φυσικής Ιατρικής και Αποκατάστασης 2011

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των  
απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Διδακτορικού Διπλώματος  
Λάρισα, 2011

© 2011 Στυλιανή Παπακώστα

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

## **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

**1<sup>ος</sup> Εξεταστής**  
**(Επιβλέπων)**

Δρ. Νικόλαος **Σακελλαρίδης**  
Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**2<sup>ος</sup> Εξεταστής**

Δρ. Ευτυχία **Ασπροδίνη**  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**3<sup>ος</sup> Εξεταστής**

Δρ. Γεώργιος **Νταλέκος**  
Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**4<sup>ος</sup> Εξεταστής**

Δρ. Γεώργιος **Κουκούλης**  
Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**5<sup>ος</sup> Εξεταστής**

Δρ. Γεώργιος **Κουκούλης**  
Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**6<sup>ος</sup> Εξεταστής**

Δρ. Άννα **Βασιλάκη**  
Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**7<sup>ος</sup> Εξεταστής**

Δρ. Νικόλαος **Πιτσιάκας**  
Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τους αξιότιμους Καθηγητές κ. Σακελλαρίδη Νικόλαο, κ. Νταλέκο Γεώργιο, κ. Ασπροδίνη Ευτυχία όλους μαζί και τον καθένα χωριστά, χωρίς τη συνδρομή, τη βοήθεια και τη συμπαράσταση των οποίων δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Ο αξιότιμος Καθηγητής κ. Νικόλαος Σακελλαρίδης, ο οποίος ήταν και ο υπεύθυνος της διατριβής, με εμπιστεύτηκε, με στήριξε και με υποστήριξε ανιδιοτελώς, ακόμη και σε στιγμές δύσκολες για μένα. Του οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την ανθρωπιά του και την κατανόηση που μου έδειξε.

Ο αξιότιμος Καθηγητής κ. Γεώργιος Νταλέκος μου στάθηκε ως πραγματικός ακαδημαϊκός δάσκαλος, παραδίδοντάς μου μαθήματα επιστημονικών γνώσεων, συνέπειας, ακρίβειας και ανθρωπιάς.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να κάνω μια ιδιαίτερη αναφορά στο συνεργάτη μου, κ. Ηλία Μπέγα, με τον οποίο συνεργαστήκαμε με αξιοπιστία και συνέπεια.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Άννα, που με στηρίζουν και με υποστηρίζουν με αυτοθυσία και χωρίς φειδώ κόπων και θυσιών. Νιώθω τυχερή και ευγνώμων που τους έχω.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης και στο σύζυγό μου, Δήμο Γαλλιόπουλο, που όλο αυτό το διάστημα, εκτός από ψυχολογική υποστήριξη, μου πρόσφερε απλόχερα και τις ανεκτίμητες γνώσεις του.

Αφιερώνω τη διατριβή μου στα παιδιά μου Σταυρούλα, Ηλία και Κωνσταντίνο.



## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΟΝΟΜΑ	Στυλιανή
ΕΠΩΝΥΜΟ	Παπακώστα
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	23-1-1977
ΥΠΗΚΟΟΤΗΤΑ	Ελληνική
ΤΗΛΕΦΩΝΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ	2105541460, 6947064544
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	Έγγαμη, 3 παιδιά

## ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ

### ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ: ΙΑΤΡΟΣ-ειδικευόμενη Φυσικής Ιατρικής και Αποκατάστασης

- **1994** Ιούνιος: Απολυτήριο Λυκείου από το 5<sup>ο</sup> Λύκειο Λάρισας με βαθμό απολυτηρίου 19 και 7/12
- **1995** Αύγουστος: Εισαγωγή στην Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **2001** Ιούλιος: Αποφοίτηση από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με βαθμό πτυχίου 8,17
- **2001** Σεπτέμβριος - **2001** Δεκέμβριος: Τρίμηνη άσκηση αγροτικού
- **2001** Δεκέμβριος - **2003** Ιανουάριος: Εκπλήρωση υπηρεσίας υπαίθρου στο Περιφερειακό Ιατρείο Βαμβακούς-Κέντρο Υγείας Φαρσάλων, Λάρισας
- **2004** Φεβρουάριος - **2004** Μάιος: Ειδικευόμενη Ιατρός στην Παθολογική κλινική του Γ.Ν.Πτολεμαΐδας
- **2004** Ιούνιος - **2005** Μάιος: Ειδικευόμενη Ιατρός στην Ορθοπαιδική κλινική του Γ.Ν.Τρικάλων
- **2005** Νοέμβριος - **2006** Μάιος: Ειδικευόμενη Ιατρός στη Νευρολογική κλινική του Γ.Ν.Νίκαιας-Πειραιά
- **2008** Απρίλιος- σήμερα: Ειδικευόμενη Ιατρός στην Α κλινική Φυσικής Ιατρικής και Αποκατάστασης του Εθνικού Ιδρύματος Αποκατάστασης Αναπήρων.

## ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά: Proficiency of Cambridge  
Γερμανικά: Mittelstufe of Goethe Institut

**ΧΡΗΣΗ Η/Υ** Πιστοποίηση γνώσεων υπολογιστή ICT Hellas

## ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

- E. Begas, E. Kouvaras, A. Tsakalof, S. Papakosta and E.K. Asproдини. In vivo evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and Xanthine Oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios. Biomedical Chromatography, Feb;21(2):190-200, 2007.
- S.Tsourvakas, C.Alexandropoulos, K.Gouvalas, G.Tsougias, S.Papakosta, C.Gimtsas The results of the treatment of closed TIBIA fractures with functional cast brace, 7<sup>th</sup> EFFORT Congress, 4-7 June 2005, Lisboa, Portugal.
- Η.Μπέγας, Ε.Κ.Ασπροδίνη, Σ.Παπακώστα, Λ.Μαγλαράς, Α.Μπενάκης και Γ.Νταλέκος. Μεταβολισμός της καφεΐνης σε ασθενείς με κίρρωση του Ήπατος. Επιθεώρηση Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακοκινητικής 23: 80-82 (2005).

- Μ. Βικελής, Σ. Παπακώστα, Δ. Μητσικώστας. Είναι η δεξαμεθαζόνη αποτελεσματική στην αντιμετώπιση της ημικρανικής κρίσης; Κεφαλαλγία 15(2):207-209 (2007).
- Σ. Παπακώστα, Χ. Κωνσταντινίδης. Ακράτεια ούρων και αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής. 27(2), Μάρτιος-Απρίλιος 2010, 180-186.

## ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΕΙΣ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ-ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ

- «Basic Clinical Research Training Course» by Zeincro Hellas, 21-23 Φεβρουαρίου 2007, Αθήνα
- 6<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής, 12-14 Μαΐου 2000, Θεσσαλονίκη.
- Συμμετοχή σε Πρόγραμμα Εθελοντισμού των Ολυμπιακών και Παραολυμπιακών Αγώνων ΑΘΗΝΑ 2004.
- 1<sup>ο</sup> Καρδιολογικό συνέδριο Κεντρικής Ελλάδος, 4 και 5 Δεκεμβρίου 1998, Λάρισα).
- 13<sup>ο</sup> Διαπανεπιστημιακό Ιατρικό Συμπόσιο, 22-24 Μαΐου 1998, Λάρισα.
- 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικών Λοιμώξεων, 5-7 Νοεμβρίου 1999, Πάτρα.
- «Ερπητοϊοί στην έγκυο και στο νεογνό», 4 και 5 Μαρτίου 2000, Πάτρα.
- «Ιπποκράτεια 2001», 19-21 Οκτωβρίου 2001, Λάρισα.
- 14<sup>ο</sup> Διαπανεπιστημιακό Ιατρικό Συμπόσιο, 20-22 Οκτωβρίου 2000, Λάρισα.
- 4<sup>ο</sup> Καρδιολογικό Συνέδριο Κεντρικής Ελλάδος, 14-16 Δεκεμβρίου 2001, Λάρισα.
- Εαρινό συμπόσιο- Ελληνική Εταιρία Χειρουργικής Ενδοκρινών Αδένων, 6-8 Ιουνίου 2003, Γρεβενά.
- «Επίκαιρα Παιδιατρικά Θέματα», 23 Οκτωβρίου 2004, Καρδίτσα.
- «Εμβόλια και Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας», 10 Νοεμβρίου 2001, Λάρισα.
- 6<sup>ο</sup> Διαπανεπιστημιακό Συνέδριο Ακτινολογίας, 1-3 Νοεμβρίου 1996, Λάρισα.
- Βασική Ουροδυναμική- Κλινικές περιπτώσεις, 26-28 Νοεμβρίου 2004, Πορταριά.
- «Νεώτερες εξελίξεις στον κλινικά εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη», 20 Μαΐου 2006, 401 Στρατιωτικό Νοσοκομείο Αθηνών, Αθήνα.
- The 1th Athenian Euroamerican Congress of Urology, 15-18 June 2006, Athens.
- «Διορθική Υπερηχοτομογραφία και Κατευθυνόμενη Βιοψία του Προστάτη», 14 και 15 Μαΐου 2003, Γενικό Νοσοκομείο Ελευσίνας, Θριάσιο, Αθήνα.
- 17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, 23-26 Ιουνίου 2004, Αλεξανδρούπολη.
- 1<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο του τμήματος Ανδρολογίας Υπογονιμότητας της Ελληνικής Ουρολογικής Εταιρίας «Σεξουαλική Δυσλειτουργία και Ανδρική Υπογονιμότητα», 20-22 Μαΐου 2005, Άνω Χώρα Ναυπακτίας.
- «Λαπαροσκοπική Χειρουργική Ουρολογία επί ζωικών μοντέλων», 17-19 Φεβρουαρίου 2005, Γενικό Νοσοκομείο Ελευσίνας, Θριάσιο, Ελευσίνα.
- 25<sup>ες</sup> Αθηναϊκές Ουρολογικές Ημέρες, 8-10 Απριλίου 2005 Αθήνα.
- 16<sup>th</sup> Video-Urology World Congress, 23-25 June 2005, Athens.
- 18<sup>th</sup> Congress ESUR, 4-6 November 2004, Athens.
- Εκπαιδευτικό Σεμινάριο της European School of Urology, 27 Σεπτεμβρίου 2006, Ρόδος.
- 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, 27 Σεπτεμβρίου- 1 Οκτωβρίου 2006, Ρόδος.
- Β' Επιστημονική Συνάντηση του τμήματος Ουροδυναμικής, Νευροουρολογίας και Γυναικολογικής Ουρολογίας της Ε.Ο.Ε., 27-29/9/2007, Porto Carras, Χαλκιδική

**«Εκτίμηση της in vivo δραστικότητας του κυτοχρώματος CYP1A2 με χρωματογραφικό προσδιορισμό των μεταβολιτών της καφεΐνης σε ασθενείς με χρόνια ηπατική νόσο»**

**ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΠΑΠΑΚΩΣΤΑ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2011

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Δρ. Νικόλαος Σακελλαρίδης**, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας - *(Επιβλέπων)*,
2. **Δρ. Ευτυχία Ασπροδίνη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Γεώργιος Νταλέκος**, Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κλασικοί εργαστηριακοί δείκτες της ηπατικής λειτουργίας (όπως παράγοντες πήξης, χολερυθρίνη, λευκωματίνη, αμινοτρανσφεράσες) είναι αδρόι και μεταβάλλονται σε προχωρημένη ηπατοκυτταρική βλάβη. Σε αρχόμενα στάδια ηπατικής βλάβης είναι μικρής διαγνωστικής αξίας και παρέχουν ανεπαρκείς πληροφορίες σε περιπτώσεις αρχόμενης ηπατοκυτταρικής δυσλειτουργίας.

Η βιομετατροπή της καφεΐνης από τα μικροσωματικά ένζυμα του ήπατος αποτελεί ένα εξαιρετικό μη επεμβατικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της *in vivo* λειτουργίας του κυτοχρώματος CYP1A2. Πρόσφατες μελέτες προσδιορισμού των μεταβολιτών της καφεΐνης σε βιολογικά υγρά ασθενών σε χρόνια ηπατικά νοσήματα έδειξαν ότι τα προϊόντα μεταβολισμού της καφεΐνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν εύκολα ως αξιόπιστοι δείκτες εκτίμησης της ηπατοκυτταρικής λειτουργίας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση λειτουργικής βλάβης σε επίπεδο ηπατικού κυττάρου και η έγκαιρη διάγνωση ηπατοκυτταρικής δυσλειτουργίας σε πρωιμότερα στάδια ηπατικής νόσου σε ασθενείς με χρόνια ηπατοπάθεια διαφορετικής βαρύτητας και αιτιολογίας με τη βοήθεια χρωματογραφικού προσδιορισμού μεταβολιτών καφεΐνης.

Μέθοδος: Στην κλινική μελέτη συμμετείχαν 340 ασθενείς με χρόνια ηπατική νόσο και 165 υγιείς εθελοντές. Οι συμμετέχοντες μετά από 48-ωρη αποχή από μεθυλοξανθίνες, αιθανόλη και φάρμακα κατανάλωσαν 200mg καφεΐνης από το στόμα υπό μορφή κάψουλας. 6 ώρες αργότερα έγινε συλλογή ενός μεμονωμένου δείγματος ούρων, στο οποίο υπολογίστηκαν οι μεταβολίτες της καφεΐνης με τη βοήθεια χρωματογραφίας υψηλής πίεσης ανάστροφης φάσης (HPLC).

Αποτελέσματα: Κατά τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν ελήφθησαν υπόψη οι εξωγενείς παράγοντες του φύλου, της ηλικίας και του δείκτη μάζας σώματος πάνω στη δραστηριότητα του CYP1A2. Στο δείγμα υγιών στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση σε σχέση με τη δραστηριότητα του CYP1A2 παρουσίασε μόνο το κάπνισμα. Για το λόγο αυτό οι συμμετέχοντες διαχωρίστηκαν σε δυο μεγάλες κατηγορίες: καπνιστές και μη καπνιστές.

Διαφορετική επίδραση στη δραστηριότητα του CYP1A2 φαίνεται να υπάρχει ανάλογα με τη βαρύτητα, όχι, όμως, και με την αιτιολογία της ηπατικής νόσου, όποτε και αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών των μεταβολικών λόγων σε λίγες επιμέρους συγκρίσεις.

Επιπρόσθετα, η μέθοδος αναδεικνύει στατιστικά σημαντικές διαφορές του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης στους μη καπνιστές μεταξύ υγιών και ασθενών με “ανενεργό” νόσο, μεταξύ ασθενών με “ενεργό” νόσο και ασθενών με αντιρροπούμενη κίρρωση και μεταξύ κίρρωτικών με αντιρροπούμενη

κίρρωση και κίρρωτικών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση. Τούτο ίσως υποδηλώνει την προοπτική χρησιμοποίησης της μεθόδου ως μη επεμβατικού διαγνωστικού δείκτη για την εκτίμηση της ηπατοπάθειας στην κλινική πράξη.

Συμπεράσματα: Η εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 με τη βοήθεια χρωματογραφικού προσδιορισμού μεταβολιτών καφεΐνης χρησιμοποιώντας ένα μεμονωμένο δείγμα ούρων αποτελεί αξιόπιστη δοκιμασία ηπατικής λειτουργίας, ιδιαίτερα για τους μη καπνιστές, ακόμη και για αρχόμενη λειτουργική βλάβη του ήπατος. Αν και κρίνεται απαραίτητο να γίνεται διαχωρισμός μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών, οι πληροφορίες που δίνει η μέθοδος θα μπορούσαν να βοηθήσουν τον κλινικό ιατρό να εκτιμήσει την επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας και τη βαρύτητα της ηπατικής νόσου, προκειμένου να βελτιώσει την πρόγνωση, τη θεραπεία και την παρακολούθηση του ασθενούς.

## SUMMARY

Traditional liver function tests give information in severe hepatocellular dysfunction. The search for a safe, reliable, simple and noninvasive procedure, which assesses hepatocellular dysfunction even in early-stages of chronic liver diseases has been an elusive one. Caffeine has been long considered a suitable probe drug for the quantitative test of liver function.

The aim of this study was to investigate whether the caffeine test may be used as a prognostic factor, for the assessment of the “functional hepatocellular mass” in patients with chronic liver disease of different etiologies and stages even in early stages of liver diseases.

Methods: 340 patients with chronic liver disease and 165 healthy volunteers were included. After a refrainment from caffeine intake for a 48-hour period, a capsula containing 200mg caffeine was administered. 6h later a spot urine samples was collected. Concentrations of caffeine and its metabolites were determined in urine samples by high-performance liquid chromatography (HPLC).

Results: The effects of gender, age and mass index were not taken under account in the statistical analysis. The effects of smoking on caffeine metabolic ratio were assessed in the samples of the healthy volunteers. CYP1A2 activity had a statistically significant positive relationship with cigarette smoking. Therefore we separated the participants in two major groups according to the smoking habits.

In non-smokers, CYP1A2 activity was statistically significant reduced even in mild hepatocellular dysfunction. There were statistically significant differences in CYP1A2 activity among healthy volunteers and patients with “inactive” liver disease, among patients with “active” liver disease and patients with compensated cirrhosis and among patients with compensated cirrhosis and non-compensated cirrhosis.

CYP1A2 activity was not significantly affected according to the etiology of liver disease. There was statistically significant difference only in few comparisons among caffeine metabolic ratios in patients suffering from liver disease of different etiology.

Conclusion: The estimation of CYP1A2 activity using caffeine clearance (spot urine sample) is a sensitive quantitative test of liver function even for early functional impairment, especially for non-smokers. Although it is essential to separate smokers and non-smokers, information obtained from the present study helps the clinician to assess the impairment of liver function and the stage of liver disease, in order to improve prognosis, treatment and the follow up of a particular patient. It is a simple, safe and not innocuous procedure yielding reliable data regarding disease severity and prognosis.

## Πίνακας Περιεχομένων

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>9</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>13</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>16</b>
1. <i>ANATOMIA KAI ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΗΠΑΤΟΣ</i> .....	16
2. <i>ENZΥΜΟ CΥΡΙΑ2</i> .....	16
2.1. <i>CΥΡΙΑ2 ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΞΩΓΕΝΩΝ ΚΑΙ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ</i> .....	17
3. <i>ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ CΥΡΙΑ2</i> .....	21
4. <i>Η ΚΑΦΕΪΝΗ ΚΑΙ Ο ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ</i> .....	22
5. <i>ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ</i> .....	25
5.1. <i>ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΑ</i> .....	26
5.2. <i>ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΣΤΕΑΤΟΗΠΑΤΙΤΙΔΑ</i> .....	30
5.3. <i>ΧΡΟΝΙΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΕΣ</i> .....	32
5.4. <i>ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ</i> .....	38
5.5. <i>ΧΟΛΟΣΤΑΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ</i> .....	40
6. <i>ΗΠΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ</i> .....	48
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>49</b>
1. <i>ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</i> .....	49
2. <i>ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</i> .....	52
2.1. <i>ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΕΣ - ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ</i> .....	52
2.2. <i>ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΟΥΡΩΝ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ</i> <i>ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ (HPLC)</i> .....	62
2.3. <i>ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ</i> .....	64
3. <i>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</i> .....	65
4. <i>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</i> .....	95
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>114</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>115</b>

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ενζυμικά συστήματα του ήπατος που ευθύνονται για το μεταβολισμό φαρμάκων εμφανίζουν γενετικούς πολυμορφισμούς. Έχει βρεθεί ότι διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία των βάσεων του DNA ορισμένων γονιδίων που κωδικοποιούν ορισμένα ένζυμα του ήπατος ευθύνονται για το διαφορετικό γονότυπο μεταξύ των ασθενών και για την παρατηρούμενη ιδιοσυγκρασία στην ανταπόκριση κάποιων ατόμων έναντι κάποιων φαρμάκων. Αποτέλεσμα του φαινομένου του πολυμορφισμού είναι η ιδιοσυγκρασία που παρατηρείται στην ανταπόκριση ατόμων έναντι ορισμένων φαρμάκων και η εκδήλωση ανεπιθύμητων/ τοξικών ενεργειών σε άτομα που παρουσιάζουν μείωση της δραστηριότητας των απαραίτητων ενζύμων, (αργοί μεταβολίτες), ή απουσία του κλινικού αποτελέσματος μετά από τη χορήγηση θεραπευτικής δόσης σε άτομα που παρουσιάζουν σημαντικά αυξημένες δραστηριότητες ηπατικών ενζύμων, (γρήγοροι μεταβολίτες), με αποτέλεσμα τη γρήγορη μετατροπή του φαρμάκου σε ανενεργό μεταβολίτη.

Ο μεταβολισμός των φαρμάκων στο ήπαρ μπορεί αδρά να διακριθεί σε δύο φάσεις: Η πρώτη φάση περιλαμβάνει ένζυμα (μονοοξειδάσες) που ανήκουν στην υπεροικογένεια P450. Αυτά τα ένζυμα συμμετέχουν σε αντιδράσεις, όπως είναι η υδρόλυση, η οξείδωση, η αποακετυλίωση και η μείωση μορίων στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει σύζευξη του αρχικού μορίου ή των μεταβολιτών του με ένα ενδογενές μόριο, (όπως είναι ένα γλυκουρονικό οξύ, μια σουλφοομάδα, μια νιτροομάδα), αντίδραση που το καθιστά πιο υδατοδιαλυτό (Westphal and Brogard).

Κύριοι παράγοντες που καθορίζουν την ικανότητα του ήπατος να μεταβολίζει φάρμακα είναι η ροή αίματος στο ήπαρ, η μεταβολική ικανότητα των ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της εκάστοτε ουσίας, η πυλαία κυκλοφορία και το ποσοστό της ουσίας που κυκλοφορεί ελεύθερα στο πλάσμα. Απαιτείται, λοιπόν, ιδιαίτερη προσοχή σε ασθενείς που χρησιμοποιούν φάρμακα με μικρό μεταβολικό εύρος και σε ασθενείς που παρουσιάζουν είτε έκπτωση της ενζυμικής δραστηριότητας κάποιων ενζυμικών συστημάτων τους, είτε εμφάνιση παράπλευρης κυκλοφορίας (π.χ. πυλαία υπέρταση).

Οι υπάρχουσες εργαστηριακές δοκιμασίες για την εκτίμηση της ηπατικής λειτουργίας, (όπως αλβουμίνη, παράγοντες πηκτικότητας, αμινιτρανσφεράσες, χολερυθρίνη, χολοστατικά ένζυμα), οι απεικονιστικές μέθοδοι, οι επεμβατικές μέθοδοι απεικόνισης του αγγειακού δικτύου του ήπατος και η βιοψία του ήπατος αποτελούν το συνήθη διαγνωστικό αλγόριθμο που χρησιμοποιείται στην καθημερινή κλινική πράξη για την έγκαιρη και την ακριβή διάγνωση και εκτίμηση της «βαρύτητας» και της

«ενεργότητας» της ηπατικής νόσου. Εντούτοις, οι υπάρχουσες μέθοδοι φαίνεται να παρέχουν πληροφορίες κυρίως για ασθενείς με προχωρημένη ηπατική νόσο και ειδικά για ασθενείς υποψήφιους για μεταμόσχευση ήπατος (Papatheodoridis et al, 2005).

Οι εργαστηριακές δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται, αποτελούν αδρούς δείκτες ηπατικής λειτουργίας. Μεταβάλλονται σε προχωρημένη ηπατική νόσο, έχουν μειωμένη ευαισθησία και ειδικότητα σε πρώιμα στάδια ηπατοπάθειας και δε μας επιτρέπουν να εκτιμήσουμε τη λειτουργικότητα σε επίπεδο ηπατοκυττάρου, αφού οι τιμές τους δύναται να βρίσκονται εντός φυσιολογικών ορίων, αν και ήδη υπάρχουν ιστολογικές αλλοιώσεις στο ηπατικό παρέγχυμα. Επιπρόσθετα, υπάρχουν ασθενείς με αρχόμενη κίρρωση και ικανοποιητικά εργαστηριακά ευρήματα που παρουσιάζουν ταχεία επιδείνωση (Shrestha, 1997).

Για το λόγο αυτό καταβάλλονται τα τελευταία χρόνια προσπάθειες για την ανάπτυξη μια ασφαλούς, αξιόπιστης, μη επεμβατικής, απλής και σχετικά μικρού κόστους μεθόδου που θα επιτρέπει την εκτίμηση βλάβης σε επίπεδο ηπατικού κυττάρου και επομένως, την έγκαιρη διάγνωση ηπατοκυτταρικής δυσλειτουργίας σε πρωιμότερα στάδια ηπατικής νόσου. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα ουσίες που μεταβολίζονται/ ή εκκρίνονται σχεδόν αποκλειστικά από το ήπαρ. Τέτοιες δοκιμασίες είναι η δοκιμασία αναπνοής αμινοπυρίνης (αντανακλά την ηπατική μικροσωματική λειτουργία), η δοκιμασία αποβολής γαλακτόζης (αντανακλά τη λειτουργία του κυτταροπλάσματος του ηπατοκυττάρου), η κάθαρση αντιπυρίνης (αντανακλά την ενδογενή δυνατότητα κάθαρσης του ήπατος), η κάθαρση σορβιτόλης (αντανακλά ροή πλάσματος στο ήπαρ), η κάθαρση πράσινης ινδοκυανίνης (αντανακλά τη διάχυση στο ήπαρ). Τα μειονεκτήματα των μεθόδων αυτών, όπως είναι η πολυπλοκότητα σε μέθοδο και ανάλυση, το υψηλό κόστος, η σχετική επεμβατικότητα, οι παρενέργειες στους συμμετέχοντες έχουν περιορίσει τη χρήση τους στην κλινική πράξη και έτσι οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς. Επιπρόσθετα, ως προς την πρόγνωση, οι δοκιμασίες αυτές προσφέρουν ελάχιστες/ ή και καθόλου επιπλέον πληροφορίες σε σχέση με τις υπάρχουσες δοκιμασίες ηπατικής λειτουργίας και το Child-Pugh score.

Τα στοιχεία που έχουμε μέχρι τώρα από τη βιβλιογραφία σχετικά με την έκπτωση της ενζυμικής δραστηριότητας που παρατηρείται σε διάφορους τύπους ηπατοπάθειας αφορούν κατά κανόνα μικρό δείγμα ασθενών και συχνά όχι ικανοποιητικά ταξινομημένο ως προς την κλινική βαρύτητα της ηπατοπάθειας που παρουσιάζουν. Γι'αυτό και επανηλειμμένα είχε τονισθεί η ανάγκη να γίνουν μελέτες που να περιέχουν μεγαλύτερο δείγμα ασθενών, οι οποίοι θα είναι αναλυτικά ταξινομημένοι ως προς το είδος και τη βαρύτητα της ηπατικής νόσου. Επιπλέον, προτάθηκε να χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση της ηπατικής νόσου ουσίες, των οποίων οι μεταβολικοί οδοί και τα ένζυμα που συμμετέχουν να είναι γνωστά (Reidenberg and Breckenridge, 1998; Lelouet et al., 2000).

Τα πλεονεκτήματα της χρησιμοποίησης της καφεΐνης σαν μεταβολικό δείκτη για τον καθορισμό της δραστηριότητας των ενζύμων του ήπατος είναι πολλαπλά. Πρόκειται για ευρέως χρησιμοποιούμενη φαρμακευτική ουσία που θεωρείται σε γενικές γραμμές ασφαλής για τον ανθρώπινο οργανισμό. Όταν χορηγείται από το στόμα, απορροφάται ταχέως και πλήρως από το γαστρεντερικό σωλήνα (Blanchard and Sawers, 1983; Scott et al, 1989). Η μέγιστη συγκέντρωσή της στον ορό του αίματος επιτυγχάνεται σε μία ώρα περίπου και δεν υφίσταται σημαντική μετατροπή πρώτης διόδου (Carrillo et al., 2000). Η κάθαρσή της δεν επηρεάζεται σημαντικά από μεταβολές στην ηπατική ροή αίματος (Scott et al, 1989). Είναι υδρόφοβη, έχει χαμηλή πρόσδεση με πρωτεΐνες (Scott et al, 1988), διέρχεται διαμέσου όλων των βιολογικών μεμβρανών και κατανέμεται ταχέως στο σώμα. Δεν παρατηρείται συσσώρευση της ουσίας σε κάποιο όργανο. Έχει ασήμαντη νεφρική απέκκριση. Μόνο ένα μικρό ποσοστό (1-2%) της χορηγούμενης δόσης στον άνθρωπο απεκκρίνεται αμετάβλητη στα ούρα (Bonati et al., 1982; Carrillo and Benitez, 1994). Επιπρόσθετα, οι μεταβολικές οδοί της καφεΐνης είναι γνωστές και καλά μελετημένες. Ο καθορισμός της καφεΐνης και των μεταβολιτών της επιτυγχάνεται μέσα σε λίγα λεπτά της ώρας μετά από μία σχετικά βραχύχρονη διαδικασία, η οποία είναι σχετικά εύκολη, χαμηλού κόστους και, κυρίως, δεν επιβαρύνει τον ασθενή με τη χορήγηση κάποιου άλλου φαρμάκου.

Σκοπός της παρούσας κλινικής μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας απλής, μη επεμβατικής, ευαίσθητης και αξιόπιστης μεθόδου, η οποία επιτρέπει την εκτίμηση δυσλειτουργίας σε επίπεδο ηπατοκυττάρου, ακόμη και σε «πρώιμα» στάδια χρόνιας ηπατικής νόσου, με τη χρήση απλά ενός μεμονωμένου δείγματος ούρων μετά από κατανάλωση καφεΐνης από το στόμα. Για το λόγο αυτό διερευνάται σε ένα σημαντικό δείγμα ασθενών με χρόνια ηπατοπάθεια, αν μπορούμε να εκτιμήσουμε μεταβολές της μικροσωμιακής λειτουργικής μάζας των ηπατοκυττάρων ανάλογα με τη βαρύτητα και την αιτιολογία των ηπατικών νοσημάτων, χρησιμοποιώντας την καφεΐνη ως υπόστρωμα και μελετώντας τη δραστηριότητα του μικροσωμιακού ενζύμου CYP1A2 (ή P4501A2).

Η κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε ήταν μια μη επεμβατική, μη τυχαιοποιημένη (open-label) κλινική μελέτη φάσης Ib. Η μελέτη διέπεται από τις ηθικές αρχές της διακύρηξης του Ελσίνκι (οι οποίες διέπονται από τους κανόνες «Good Clinical Practice» και τις απαραίτητες νομοθετικές ρυθμίσεις).

Η μέθοδος που μελετήθηκε δύναται να καθιερωθεί ως σημαντική μη επεμβατική μέθοδος ρουτίνας για την παρακολούθηση (monitoring) του βαθμού και του ρυθμού επιδείνωσης της ηπατικής λειτουργίας, αλλά και ως σημαντικός δείκτης για την πρόληψη σοβαρών συνεπειών που θα μπορούσαν να προκύψουν από την μη έγκαιρη προσαρμογή της φαρμακευτικής θεραπείας των ασθενών, ειδικά όσον αφορά φάρμακα με μικρό θεραπευτικό εύρος. Βεβαίως, πάντα η χορηγούμενη φαρμακευτική αγωγή θα πρέπει να αντισταθμίζει όφελος και να χορηγείται μόνο αν είναι απολύτως αναγκαία, πολύ περισσότερο, όταν αφορά ασθενείς με επιβαρυνμένη ηπατική λειτουργία.



## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΗΠΑΤΟΣ

Το ήπαρ είναι το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου οργανισμού με βάρος 1200-1500gr. Η αιματική του παροχή γίνεται από δύο συστήματα: την ηπατική αρτηρία που παρέχει αρτηριακό αίμα για τη θρέψη του οργάνου και την πυλαία φλέβα, η οποία αθροίζει το φλεβικό αίμα από το γαστρεντερικό σωλήνα και το σπλήνα και το οδηγεί στο ήπαρ για περαιτέρω επεξεργασία. Η παροχέτευση του αίματος γίνεται μέσω των τεσσάρων ηπατικών φλεβών.

Η βασική ανατομική και λειτουργική μονάδα του ήπατος είναι το ηπατικό λοβίο. Αποτελεί κυλινδρική κατασκευή μήκους λίγων χιλιοστών και με διάμετρο 0,8-2 χιλιοστά. Το ανθρώπινο ήπαρ υπολογίζεται ότι περιέχει 50.000-100.000 ηπατικά λοβία.

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. Η ιδιάζουσα δομή του αποσκοπεί στο να φέρει σε στενή επαφή τα ηπατοκύτταρα με το αίμα που προσάγει η πυλαία στα κολποειδή.

Το ηπατοκύτταρο επιτελεί πολλές και σημαντικές λειτουργίες, οι οποίες αφορούν τη σύνθεση ουσιών, το μεταβολισμό πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων, καθώς και την ενεργοποίηση, την αδρανοποίηση ή την αποβολή διαφόρων εξωγενών ή ενδογενών ουσιών.

### 2. ENZYMO CYP1A2

Το ένζυμο CYP1A2 αποτελεί μέρος του κυτοχρώματος P450. Το κυτόχρωμα P450 είναι ένα από τα πλέον σημαντικά ενζυμικά συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού. Πρόκειται για αιμοπρωτεΐνη που απαντάται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων. Περιλαμβάνει ένζυμα που καταλύουν την προσθήκη ενός ατόμου οξυγόνου σε διάφορα μόρια (μονοοξειδάσες), καθώς και άλλες αντιδράσεις, όπως O- και N-απακετυλίωση, απαμίνωση, σουλφοξειδάση και αζωτοοξειδάση. Το ένζυμο CYP1A2 αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά ηπατικά ένζυμα που συμμετέχουν στη φάση I του μεταβολισμού. Τελικός στόχος όλων αυτών των αντιδράσεων είναι η μετατροπή υδρόφοβων μορίων σε υδρόφιλα. Επίσης, το κυτόχρωμα P-450 συμμετέχει στο μεταβολισμό και στην απέκκριση πολλών φαρμάκων.

Το κυτόχρωμα CYP1A αποτελείται από τα δομικώς σχετιζόμενα ισοένζυμα CYP1A1 και CYP1A2. Το CYP1A1 εκφράζεται σε εξωηπατικούς ιστούς, ενώ το CYP1A2 απαντάει αποκλειστικά στο ήπαρ.



Είναι ένα από τα πιο άφθονα ισοένζυμα του CYP στο ήπαρ. Το ποσοστό του ανέρχεται περίπου σε 15% του συνολικού περιεχομένου σε CYP (Shimada et al., 1994). Hong et al., 2004; Chi-Chen Hong et al., 2004).

Φαίνεται πως ο φαινότυπός του καθορίζεται από δύο τουλάχιστον ρυθμιστικούς μηχανισμούς: ένα που καθορίζει γονιδιακά το βαθμό έκφρασης και το βαθμό επαγωγής του ενζύμου υπό την επίδραση εξωγενών και ενδογενών παραγόντων και ένα δεύτερο σύμφωνα με τον οποίο η δραστηριότητα του ενζύμου επάγεται και αναστέλλεται υπό την επίδραση εξωγενών και ενδογενών παραγόντων (Landi et al., 1999).

Γονιδιακά καθορισμένοι παράγοντες που φαίνεται να επιδρούν στη δραστηριότητα του CYP1A2 είναι το γένος, η φυλή, οι γενετικοί πολυμορφισμοί (Landi et al., 1999). Αργοί και μέσοι μεταβολίτες φαίνεται να είναι το 50% των Καυκάσιων, ενώ η συχνότητα αυτών παρουσιάζεται σημαντικά μικρότερη σε Ιάπωνες. Δεν έχει βρεθεί καμιά νουκλεοτιδική διαφορά που θα μπορούσε να εξηγήσει τη διαφορά στο φαινότυπο σε κανένα εξόνιο, σύνδεσμο εξονίου-νέτρονιου ή σε περιοχές 5-flanking των γονιδίων. Έχουν βρεθεί μόνο δύο γενετικοί πολυμορφισμοί, οι οποίοι όμως φαίνεται να σχετίζονται μόνο με την επαγωγή. Σε Καυκάσιους δεν έχει αναφερθεί, επίσης, γονιδιακός πολυμορφισμός (Rodopoulos et al., 1995. Piana Tantcheva-Poor et al, 1999). Παρόλη τη λεπτομερή έρευνα, όσον αφορά τον πολυμορφισμό, δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποια μεταβλητότητα στην κωδικοποιούσα περιοχή του ανθρώπινου γονιδίου CYP1A2, εκτός από μια παρατήρηση για μια σπάνια μετάλλαξη σε κινεζικό πληθυσμό (Huang et al., 1999).

Φαίνεται πως γονιδιακά ίσως καθορίζονται και ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου του CYP1A2. Πράγματι, έχουν παρατηρηθεί διάφορες αλλαγές σε αυτές τις περιοχές του γονιδίου CYP1A2, παρόλο που η κλινική τους σημασία παραμένει αδιευκρίνιστη (McKinnon and Evans, 2000).

Ο βαθμός στον οποίο ο φαινότυπος του CYP1A2 καθορίζεται από το γονότυπο παραμένει αδιευκρίνιστος (Sachse et al., 1999). Τα αποτελέσματα της μελέτης υποδηλώνουν ότι η δραστηριότητα του CYP1A2 ίσως σχετίζεται με ενδογενείς παράγοντες που καθορίζονται εν μέρει γενετικά, όπως είναι τα επίπεδα του insulin-like growth factor-1 στο πλάσμα και ο δείκτης μάζας σώματος (Hong et al., 1997; Olson et al., 2001). Επίσης, έχουν αναφερθεί διαφορές σχετικά με τη δραστηριότητα του CYP1A2 σε διάφορους πληθυσμούς (Carrillo and Benitez, 1996; Carrillo and Benitez, 1994; Grant et al., 1983; Kalow, 1985).

## **2.1. CYP1A2 ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΞΩΓΕΝΩΝ ΚΑΙ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ**

Φαίνεται πως υπάρχει και δεύτερος ρυθμιστικός μηχανισμός, κατά τον οποίο η δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2 επάγεται και αναστέλλεται υπό την επίδραση εξωγενών και ενδογενών παραγόντων

(Landi et al., 1999). Η δραστηριότητα του CYP1A2 φαίνεται να παρουσιάζει διακυμάνσεις που φτάνουν το 20%, όταν μελετηθεί στο ίδιο άτομο επί 3 μήνες (Kashuba et al., 1998).

Σε μελέτη που έγινε σε προ- και μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, το 40% της ιδιοσυγκρασίας στη δραστηριότητα του CYP1A2 μπορούσε να αποδοθεί στην επίδραση εξωγενών παραγόντων. Το υπόλοιπο 60% αποδόθηκε σε παράγοντες αδιευκρίνιστους, ίσως γενετικούς (Chi-Chen Hong et al., 2004). Σε διπλή μελέτη που έγινε στη Δανία σε 49 ζευγάρια μονοζυγωματικών διδύμων και σε 34 ζευγάρια διζυγωματικών διδύμων του ίδιου φύλου που δεν κάπνιζαν και δεν έκαναν χρήση αντισυλληπτικών δισκίων (Rasmussen et al., 2002), παρόλη τη λεπτομερή έρευνα, όσον αφορά τον πολυμορφισμό, δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποια μεταβλητότητα στην κωδικοποιούσα περιοχή του ανθρώπινου γονιδίου CYP1A2.

Παράγοντες που σχετίζονται με επαγωγή ή καταστολή του CYP1A2 είναι το φύλο, η ηλικία, το κάπνισμα, διατροφικοί παράγοντες, φάρμακα, το σωματικό βάρος, ηπατοπάθειες (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1.** Εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες που επιδρούν στη δραστηριότητα του CYP1A2

ΕΠΑΓΩΓΗ	ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ
<p>Φύλο Ανδρες</p> <p>Διατροφικές συνήθειες Κρέας ψημένο στα κάρβουνα Σταυρανθή λαχανικά (μπρόκολα) Καφές</p> <p>Κάπνισμα Φάρμακα</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φαινοβαρβιτάλη</li> <li>• Καρβαμαζεπίνη</li> <li>• Λοπιναβίρη/ριτοναβίρη</li> <li>• Ομεπραζόλη</li> <li>• Φαινυτοΐνη</li> <li>• Ριφαμπικίνη</li> <li>• Ινσουλίνη</li> </ul>	<p>Φύλο Γυναίκες (Κύηση, Γαλουχία)</p> <p>Διατροφικές συνήθειες Γκρέϊπ φρουτ Αλκοόλ Ηπατική νόσος ↑ηλικία ↑δείκτης μάζας σώματος Γονίδια για οξείδωση λίπων/ βιοσύνθεση χοληστερίνης Φάρμακα</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Αντισυλληπτικά</li> <li>• Οιστρογόνα</li> <li>• Θεραπεία αποκατάστασης ανδρογόνων</li> <li>• Φλουβοξαμίνη</li> <li>• Φουραφυλλίνη</li> <li>• Σιμετιδίνη</li> <li>• Αιθανόλη</li> <li>• Βεραπαμίλη</li> <li>• Κινολόνες</li> <li>• Μεξιλετίνη</li> <li>• Προπαφαινόνη</li> <li>• Κετοконаζόλη</li> </ul>

Το CYP1A2 μπορεί να επαχθεί από κρέας ψημένο στα κάρβουνα (Sinha et al., 1994; Sinha and Rothman, 1999), από υψηλή πρόσληψη σταυρανθών (cruciferous) λαχανικών, όπως είναι τα μπρόκολα και τα λαχανάκια Βρυξελλών (Vistisen et al., 1991; Vistisen et al., 1992) και από αυξημένη κατανάλωση καφεΐνης (Denaro et al, 1990). Αντίστροφα, ο χυμός γκρεϊπφρουτ (Fuhr et al., 1993), το αλκοόλ (Le Marchand et al., 1997; Rizzo et al., 1997) έχουν κατασταλτική δράση στη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2.

Φάρμακα που επάγουν το ένζυμο CYP1A2 είναι η ομεπραζόλη, η φαινοβαρβιτάλη, η καρβαμαζεπίνη (Piana Tatcheva-Poor et al, 1999), η λοπιναβίρη/ριτοναβίρη, (Yeh RF et al, 2006), η ριφαμπίνη, (Wietholtz et al, 1995). Αντίθετα, φάρμακα όπως η φλουβοξαμίνη, (Rasmussen et al, 1998), η φουραφυλλίνη, (Sesardic et al, 1990), η σιμετιδίνη, (Loi et al, 1993), τα αντισυλληπτικά δισκία (Campbell et al, 1987), τα οιστρογόνα, (Pollock et al, 1999), η αιθανόλη, (Rizzo et al, 1997) η βεραπαμίλη, (Fuhr, Woodcock et al, 1992) και οι κινολόνες, (Fuhr, Anders et al, 1992) δρουν κατασταλτικά πάνω στο ένζυμο CYP1A2.

Η ηπατική νόσος είναι αποδεκτό από τη βιβλιογραφία πως σε προχωρημένα στάδια σχετίζεται με μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου CYP1A2 (Denaro et al., 1996).

Από τις πρώτες μελέτες αναφέρεται βιβλιογραφικά η επαγωγική επίδραση του καπνίσματος πάνω στη δραστηριότητα του CYP1A2 (Carrillo and Benitez., 1996; Kalow and Tang, 1991; Catteau et al., 1995). Φαίνεται πως ουσίες που εμπεριέχονται στον καπνό του τσιγάρου, όπως πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες και αλογονομένοι υδρογονάνθρακες (Chung et al., 2004). συνδέονται στον υποδοχέα των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (Ah) ή στον υποδοχέα διοξίνης (Waxman et al, 1999) και προκαλούν αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου του CYP1A2, σύνθεση του κατάλληλου mRNA και *de novo* σύνθεση της πρωτεΐνης του CYP1A2. Δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί, εάν η ενεργοποίηση της οδού του υποδοχέα Ah συμβάλλει στην αύξηση του κινδύνου από την ενεργοποίηση των προκαρκινογόνων μορίων ή συμβάλλει στην ταχεία αποβολή από τον οργανισμό χημικών ουσιών δυνητικά επικίνδυνων (Guengerich et al., 1990; Waxman et al, 1999; Smith et al. 1998).

Η δραστικότητα του ενζύμου φαίνεται να επηρεάζεται από το φύλο και την ηλικία. Όταν το υπό μελέτη δείγμα υγιών εθελοντών είναι σημαντικό, φαίνεται πως οι άντρες παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2 σε σχέση με τις γυναίκες (Carrillo and Benitez, 1996; Tatcheva-Poor et al, 1999; Relling et al., 1992; Krul and Hageman, 1998). Οι γυναίκες φαίνεται να έχουν χαμηλότερες τιμές, εύρημα που επιβεβαιώνεται ως παράγοντας ανεξάρτητος από τη λήψη αντισυλληπτικών και το κάπνισμα. Εντούτοις, σε άλλες μελέτες δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές στατιστικά διαφορές στη δραστηριότητα του CYP1A2 όσον αφορά το φύλο.

Η επίδραση του φύλου στη δραστηριότητα του CYP1A2 έχει μελετηθεί με αντιφατικά αποτελέσματα. Οι Vistisen et al. (1992) και οι Rasmussen and Brosen (1996) παρατήρησαν κατά 16% και 14% υψηλότερες τιμές στη δραστηριότητα του CYP1A2 στους άντρες χρησιμοποιώντας το μεταβολικό λόγο  $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$  σε 335 και 277 υγιείς Καυκάσιους, αντίστοιχα. Επίσης, οι Tantcheva-Poór et al. (1999) παρατήρησαν 10% υψηλότερες τιμές στη δραστηριότητα του CYP1A2 στους άντρες χρησιμοποιώντας το μεταβολικό λόγο  $17X/137X$  από τη σίελο σε 786 υγιείς Καυκάσιους. Αντιθέτως, σε μελέτες στις οποίες συμμετείχαν 20-245 υγιείς, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη δραστηριότητα του CYP1A2 μεταξύ αντρών και γυναικών, χρησιμοποιώντας το μεταβολικό λόγο  $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$  (Carrillo and Benitez., 1996; Kalow and Tang, 1991; Catteau et al., 1995, Kashuba et al., 1998; Sinues et al., 1994; Saruwatari et al., 2002). Λαμβάνοντας υπόψη τις προαναφερθείσες μελέτες, φαίνεται πως το φύλο παρουσιάζει ίσως μικρή επίδραση στη δραστηριότητα του CYP1A2, η οποία αναδεικνύεται, όταν μελετάται μεγάλος αριθμός υγιών.

Με την πάροδο της ηλικίας επέρχονται αλλαγές στη δραστηριότητα και στο περιεχόμενο του P450, οι οποίες αποδίδονται σε μειωμένο αριθμό ηπατοκυττάρων, σε μειωμένη μεταβολική ικανότητα των ενζύμων (Durnas et al., 1990), σε μεταβολές στην ηπατική ροή αίματος, στη σύνδεση μορίων με πρωτεΐνες και στην κατανομή αυτών στα υγρά του σώματος (Hunt et al., 1992). Πράγματι, σε προηγούμενη μελέτη οι Shimada et al. (1994), δε βρήκαν διαφορές στο περιεχόμενο και στη δραστηριότητα του κυτοχρώματος P450 συνολικά, αλλά και σε επιμέρους ισοένζυμα, μεταξύ των οποίων και του CYP1A2 σε υγιείς και ασθενείς ηπατοπαθείς ηλικίας 12-73 ετών. Επιπρόσθετα, οι Park et al. (2003) μελετώντας απέκκριση ραδιοσημασμένης καφεΐνης από την αναπνοή επίσης δε βρήκαν σημαντική συσχέτιση ηλικίας και δραστηριότητας του CYP1A2. Αντίθετα, οι Schnegg and Lauterburg (1986), σε μελέτη αναφέρουν πως η κάθαρση καφεΐνης και η απομεθυλίωση της 14C-αμινοπυρίνης ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε υγιείς ηλικίας άνω των 70 ετών σε σχέση με νεότερους υγιείς. Στη δική μας κλινική μελέτη συμμετείχαν 8 υγιείς (ποσοστό 4,85% επί του συνόλου των υγιών) και 30 ηπατοπαθείς (ποσοστό 8,8% επί του συνόλου των ηπατοπαθών) ηλικίας άνω των 70 ετών. Έτσι, ακόμη και αν θεωρήσουμε πως υπάρχει επίδραση αυτών των ηλικιών πάνω στη δραστηριότητα του CYP1A2, αυτή θα είχε μικρή συνολικά επίδραση στην ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης.

Πράγματι, σε προηγούμενη μελέτη οι Shimada et al. (1994), δε βρήκαν διαφορές στο περιεχόμενο και στη δραστηριότητα του κυτοχρώματος P450 συνολικά, αλλά και σε επιμέρους ισοένζυμα, μεταξύ των οποίων και του CYP1A2 σε υγιείς και ασθενείς ηπατοπαθείς ηλικίας 12-73 ετών. Επιπρόσθετα, οι Park et al. (2003) μελετώντας απέκκριση ραδιοσημασμένης καφεΐνης από την αναπνοή επίσης δε βρήκαν σημαντική συσχέτιση ηλικίας και δραστηριότητας του CYP1A2. Αντίθετα, οι Schnegg and Lauterburg

(1986), σε άλλη μελέτη αναφέρουν πως η κάθαρση καφεΐνης και η απομεθυλίωση της 14C-αμινοπυρίνης ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε υγιείς ηλικίας άνω των 70 ετών σε σχέση με νεότερους υγιείς.

Η κάθαρση της καφεΐνης είναι ηπιώς μεγαλύτερη σε λεπτόσωμα άτομα σε σύγκριση με παχύσαρκα (στη βάση ml/min/kg σωματικού βάρους) (Tantcheva-Poór et al., 1999). Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε μεταβολή της βασικής κάθαρσης της καφεΐνης κατά 0,99 φορές για κάθε αύξηση του δείκτη μάζας σώματος κατά 1kg/m<sup>2</sup>. Εντούτοις, σε άλλες μελέτες δεν αναδεικνύεται αυτή η διαφορά. Οι Caraco et al., 1995 διερεύννησαν τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες της αντιπυρίνης σε παχύσαρκα άτομα και κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η παχυσαρκία έχει αμελητέα επίδραση στην οξειδωτική μεταβολική ικανότητα του ήπατος. Όσον αφορά το CYP1A2, δεν έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας του ενζύμου, όπως αυτή προσδιορίστηκε με τον μεταβολικό λόγο (17U+17X)/137X στα ούρα και του σωματικού βάρους (Le Marchand et al, 1997).

Σε μελέτες με ζώα υπάρχουν ενδείξεις πως η ινσουλίνη επάγει το CYP1A2 (Barnett et al., 1992). Επίσης, φαίνεται πως γονίδια που σχετίζονται με την οξείδωση λιπών και τη βιοσύνθεση χοληστερίνης δρουν κατασταλτικά στη δραστηριότητα του CYP1A2 στα ποντίκια (Chi-Chen Hong et al., 2004).

### **3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ CYP1A2**

Οι υπάρχουσες εργαστηριακές δοκιμασίες (χρόνος προθρομβίνης, αλβουμίνη, χολεριθρίνη, αμινοτανσφεράσες) αποτελούν αδρούς δείκτες ηπατικής λειτουργίας, δε μας επιτρέπουν όμως να εκτιμήσουμε την λειτουργικότητα σε επίπεδο κυττάρου. Οι δοκιμασίες που αντανακλούν την ηπατική μικροσωματική λειτουργία, όπως η κάθαρση αντιπυρίνης, η δοκιμασία αναπνοής αμινοπυρίνης, η δοκιμασία αποβολής γαλακτόζης, είναι μάλλον πολύπλοκες, έχουν μεγάλο κόστος και χρησιμοποιούνται κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς.

Στη μέχρι τώρα καθημερινή κλινική πράξη για την εκτίμηση του σταδίου και της βαρύτητας της ηπατικής νόσου συνεκτιμώνται τα ευρήματα της αντικειμενικής εξέτασης, των αιματολογικών και βιοχημικών εξετάσεων, της βιοψίας ήπατος και των απεικονιστικών μεθόδων, όπως είναι ο υπέρηχος και η υπολογιστική τομογραφία άνω κοιλίας. Εντούτοις, με εξαίρεση τη βιοψία, οι κλασικοί εργαστηριακοί δείκτες της ηπατοκυτταρικής λειτουργίας είναι αδροί, μεταβάλλονται σε προχωρημένη ηπατοκυτταρική βλάβη και είναι μικρής διαγνωστικής αξίας σε αρχόμενη ηπατοκυτταρική δυσλειτουργία. Πράγματι, κάποιοι ασθενείς με αρχόμενη κίρρωση φαίνεται να έχουν μικρή βλάβη με βάσει τα βιοχημικά τους ευρήματα και παρουσιάζουν ταχεία επιδείνωση της κλινικής τους εικόνας (Shrestha et al., 1997).

Για αυτό το λόγο τα τελευταία χρόνια καταβάλλονται προσπάθειες για την ανάπτυξη ποσοτικών δοκιμασιών που θα επιτρέπουν την εκτίμηση της ηπατοκυτταρικής λειτουργίας. Τέτοιες δοκιμασίες είναι η δοκιμασία αναπνοής της αμινοπυρίνης, (aminopyrine breath test) (Keiding et al, 2007), για την



εκτίμηση της μικροσωμιακής ηπατοκυτταρικής λειτουργίας, η δυνατότητα απέκκρισης γαλακτόζης, (galactose elimination capacity), για την εκτίμηση της κυτταροπλασματικής ηπατοκυτταρικής λειτουργίας, η κάθαρση αντιπυρίνης, (antipyrine clearance), για την εκτίμηση της ενδογενούς δυνατότητας κάθαρσης του ήπατος, η κάθαρση σορβιτόλης, (sorbitol clearance), για την εκτίμηση της ηπατικής ροής πλάσματος, η κάθαρση πράσινης ινδοκυανίνης, (indocyanine green clearance), για την εκτίμηση της διάχυσης στο ήπαρ.

Η μέθοδος των μεταβολικών λόγων μπορεί να δώσει μία ένδειξη για το βαθμό της ενζυμικής δραστηριότητας, χωρίς όμως να μπορεί να υποδείξει, εάν η ποικιλοότητα οφείλεται σε γενετικά ή άλλα αίτια. Η εμφάνιση μέσα σε έναν υπό μελέτη πληθυσμό μιας ξεκάθαρης δικόρυφης ή τρικόρυφης κατανομής των μεταβολικών λόγων, που αντανακλούν την ενζυμική δραστηριότητα, υποδεικνύει έντονα την παρουσία γενετικού πολυμορφισμού. Εντούτοις, εξωγενείς ή ενδογενείς παράγοντες, όπως είναι η προσλαμβανόμενη διαίτα ή η λήψη φαρμάκων είναι δυνατό να επηρεάζουν τους μεταβολικούς λόγους.

Το CYP1A2 απαντάται αποκλειστικά στο ήπαρ (Ikeya et al., 1989). Έτσι, ο προσδιορισμός της ενζυμικής του παρουσίας με τη βοήθεια της μεθόδου του Western blot ή ο προσδιορισμός του σχηματισμού του μέσω της μέτρησης του mRNA είναι δυνατός μόνο με εξέταση ηπατικού ιστού μετά από βιοψία ήπατος, η οποία είναι μέθοδος επεμβατική, και δεν είναι πάντα εύκολο να γίνει σε ασθενείς με προχωρημένη ηπατική νόσο. Επιπρόσθετα, η βιοψία δίνει πληροφορίες για τη μορφολογική κατάσταση των ηπατοκυττάρων, όχι όμως και για τη λειτουργική ικανότητα αυτών.

Ο  $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$  είναι ίσως ο πιο χρησιμοποιούμενος για τη μελέτη της δραστηριότητας του CYP1A2 (Campbell et al., 1987, Kalow and Tang 1991; Rostami-Hodjegan et al, 1996) και ο λόγος που χρησιμοποιούμε στην κλινική μελέτη μας. Ο συγκεκριμένος μεταβολικός λόγος είναι δεν επηρεάζεται από τη νεφρική ροή, από το χρόνο συλλογής των ούρων και από το ποσό των ούρων που πρέπει να συλλέξει ο εξεταζόμενος, αφού περιέχει μόνο τελικά μεταβολικά προϊόντα του μεταβολισμού της καφεΐνης παρουσιάζεται ανεξάρτητος από το χρόνο συλλογής των ούρων. Απλά χρειάζεται να μεσολαβήσει κάποιο χρονικό διάστημα μεταξύ της λήψης της καφεΐνης και της συλλογής των ούρων, ώστε οι μεταβολίτες στα ούρα να έχουν ικανοποιητικές συγκεντρώσεις. Εντούτοις, φαίνεται πως όταν το CYP1A2 επάγεται σε μεγάλο βαθμό, ο λόγος χάνει την ευαισθησία του (Campbell et al., 1987). Αυτό ίσως μειώνει την αξιοπιστία του μεταβολικού λόγου σε κατηγορίες, όπως είναι οι καπνιστές.

#### 4. Η ΚΑΦΕΪΝΗ ΚΑΙ Ο ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ

Η καφεΐνη είναι ίσως η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη φαρμακευτική ουσία στον κόσμο. Πρόκειται για αλκαλοειδές παράγωγο τριμεθυλοξανθίνης (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη). Η χρήση της σε γενικές

γραμμές θεωρείται ασφαλής. Δρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα και θεωρείται ότι βελτιώνει τη διάθεση, καταπολεμά την υπνηλία, ενώ αυξάνει την ικανότητα για εργασία. Αντίθετα, μελέτες έχουν συσχετίσει την αυξημένη κατανάλωση καφέ με αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου (Denary et al, 1990). Επίσης, αυξημένη κατανάλωση καφεΐνης για μακρό χρονικό διάστημα έχει συσχετιστεί με διαταραχές της αναπαραγωγής, οστεοπόρωση, ψυχιατρικές διαταραχές και προδιάθεση για κατάχρηση φαρμάκων (Carrillo and Benitez, 2000). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται, επίσης, πως όσο αυξάνει η κατανάλωση καφέ μειώνεται αντιστρόφως ανάλογα η κίρρωση αλκοολικής αιτιολογίας, αλλά και ο κίνδυνος θανάτου από κίρρωση αλκοολικής αιτιολογίας (Gallus et al., 2001; Klatsky et al., 1992; Klatsky et al., 1994). Επιπλέον, η κατανάλωση καφέ σχετίζεται αρνητικά με την κατανάλωση αλκοόλ και σχετίζεται θετικά με κάπνισμα.

Αναφέρεται επίσης πως η κατανάλωση καφέ δρα προστατευτικά για την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Πιο συγκεκριμένα, η καφεΐνη εμποδίζει την εξάπλωση καρκινικών ηπατοκυττάρων μέσω ενεργοποίησης μιας οδού αναστολής των καρκινικών κυττάρων διαφορετικής από αυτή της απόπτωσης (Okano J. et al, 2008).

Σε γενικές γραμμές θεωρείται ασφαλής για τον ανθρώπινο οργανισμό. Όταν χορηγείται από το στόμα απορροφάται ταχέως και πλήρως από το γαστρεντερικό σωλήνα (Blanchard and Sawers, 1983; Scott et al, 1989). Η μέγιστη συγκέντρωσή της στον ορό του αίματος επιτυγχάνεται σε μία ώρα περίπου μετά την από του στόματος κατανάλωσή της, χωρίς να συμβαίνει σημαντική μετατροπή πρώτης διόδου (Carrillo et al., 2000). της δεν επηρεάζεται σημαντικά από μεταβολές στην ηπατική ροή του αίματος (Scott et al, 1989). Το μόριο της καφεΐνης έχει χαμηλή πρόσδεση με πρωτεΐνες (μόνο το 30% αυτής είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες) (Scott et al, 1988), διέρχεται διαμέσου όλων των βιολογικών μεμβρανών και κατανέμεται ταχέως στο σώμα. Δεν παρατηρείται συσσώρευση της ουσίας σε κάποιο όργανο. Ο όγκος κατανομής της είναι περίπου 0,7 l/Kg (Bonati et al., 1984). Ανιχνεύεται σε όλα τα σωματικά υγρά (στέλε, μητρικό γάλα, σπέρμα, χολή, ούρα). Έχει ασήμαντη νεφρική απέκκριση και μόνο ένα μικρό ποσοστό (1-3%) της χορηγούμενης δόσης στον άνθρωπο απεκκρίνεται αμετάβλητη στα ούρα (Bonati et al., 1982; Carrillo and Benitez, 1994).

Ο χρόνος ημίσειας ζωής της καφεΐνης για τους περισσότερους ενήλικες είναι 3-6h και υπολογίζεται πως φθάνει να είναι σχεδόν διπλάσιος σε άτομα που δεν καταναλώνουν καφέ σε σχέση με αυτά που καταναλώνουν τακτικά μεγάλες ποσότητες (Carrillo et al., 2000). Τα νεογόννητα αποβάλλουν την καφεΐνη με πολύ αργό ρυθμό παρουσιάζοντας χρόνους ημίσειας ζωής με μέσο όρο τις 100 ώρες (Benowitz, 1990).

Η καφεΐνη μεταβολίζεται σχεδόν ολοκληρωτικά από το ήπαρ (όπως ήδη έχει αναφερθεί, μόνο 1-3% της χορηγούμενης δόσης αποβάλλεται αμετάβλητη στα ούρα) (Scott et al, 1988; Arnaud, 1987; Bonati

and Garattini, 1988; Lelouet et al., 2000). Είναι καλά μελετημένες οι μεταβολικές οδοί και τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της (Arnaud, 1984; Lelouet et al., 2000)..

Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότεροι από 25 μεταβολίτες στον άνθρωπο (Somaní and Gupta, 1988). Οι μεταβολίτες που θα μας απασχολήσουν άμεσα στη μελέτη μας είναι:

- AFMU: 5-ακετυλο-αμινο-6-φορμυλοαμινο-3-μεθυλουρακίλη
- 1U: 1-μεθυλουρικό οξύ
- 1X: 1-μεθυλοξανθίνη
- 17U: 1,7-διμεθυλουρικό οξύ

Η καφεΐνη αποβάλλεται κυρίως μέσω N3- απομεθυλίωσης προς 17X (παραξανθίνη) (84%). Η αντίδραση αυτή αποτελεί την κύρια αντίδραση του πρωτογενούς μεταβολισμού της. Δευτερεύουσες αντιδράσεις του μεταβολισμού της αποτελούν η N1- απομεθυλίωση προς 37X (θεοβρωμίνη) (11%) και η N7- απομεθυλίωση προς θεοφυλλίνη (5%) (Carrillo et al., 2000; Lelo et al., 1986; Carrillo and Benitez, 1994; Gu et al., 1992). Η ηπατική N-3 απομεθυλίωση της καφεΐνης καταλύεται ειδικά από το CYP1A2. Επιπρόσθετα, το CYP1A2 συμμετέχει επίσης στις N-1 και N-7 απομεθυλίώσεις. Αν λάβουμε υπ' όψη μόνον τις μεταβολικές οδούς της απομεθυλίωσης, τότε η N3-απομεθυλίωση ευθύνεται, κατά προσέγγιση για το 84% της πρωτογενούς απομεθυλίωσης της καφεΐνης. Ο σχηματισμός της 37X (θεοβρωμίνη) (N-1 απομεθυλίωση) και της 13X (θεοφυλλίνη) (N-7 απομεθυλίωση) ευθύνονται, κατά προσέγγιση, για το 11% και 5% αντίστοιχα, των τριών πρωτογενών απομεθυλίωσεων της καφεΐνης (Lelo et al., 1986; Gu et al., 1992). Ένα μικρό ποσοστό των N-1 και N-7 απομεθυλίωσεων δεν μπορεί να αποδοθεί στη δραστηριότητα του CYP1A2 και αποδίδεται στην καταλυτική δράση του CYP2E1, του CYP που επάγεται κυρίως από την αιθανόλη (Gu et al., 1992). Συνολικά, θεωρείται ότι το CYP1A2 ευθύνεται για το 95% του πρωτογενούς μεταβολισμού της καφεΐνης, γεγονός που καθιστά την καφεΐνη κατάλληλο υπόστρωμα για τη διερεύνηση της δραστηριότητας του CYP1A2 .

Οι διμεθυλο-ξανθίνες (17X, 13X, 37X) μπορούν να απομεθυλιωθούν περαιτέρω προς μονομεθυλο-ξανθίνες (1X, 7X, 3X) (Birkett et al., 1985; Gu et al., 1992; Lelo et al., 1989). Η 17X, ειδικότερα, υδροξυλιώνεται προς 17U και απομεθυλιώνεται προς 1X από το CYP1A2. Έτσι, η 17X είναι τόσο προϊόν όσο και υπόστρωμα για το ένζυμο. Η περαιτέρω διάσπαση της 1X περιλαμβάνει την 8-υδροξυλίωσή της προς 1U από την οξειδάση της ξανθίνης με τη συμμετοχή του CYP1A2 (Grant et al., 1986).

Η 1X θεωρητικά μπορεί να προέλθει από την 17X και την 13X. Πρακτικά, τόσο η 1X όσο και το 1U προέρχονται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από την 17X. Αν και οι δύο θεωρητικές πηγές της 7X είναι η 17X και η 37X , στην πραγματικότητα η κύρια πηγή της είναι η 37X. Αντίθετα, η 3X έχει διπλή προέλευση χωρίς διάκριση μεταξύ 37X και 13X (Kalow and Tang, 1993).



Το CYP1A2 είναι σε θέση να καταλύει πρακτικώς όλες τις οξειδωτικές αντιδράσεις της καφεΐνης και των μεταβολιτών της (Gu et al., 1992) σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα (εκτός, όπως αναφέραμε, από την N-3 απομεθυλίωση της καφεΐνης και την N-7 απομεθυλίωση της παραξανθίνης).

Το AFMU αποτελεί μεταβολικό προϊόν της καφεΐνης και συμμετέχει στο χρησιμοποιούμενο μεταβολικό λόγο. Το AFMU μπορεί αυθόρμητα να αποβάλει τη φορμυλο-ομάδα και να δώσει 5-ακετυλαμινο-6-αμινο-3-μεθυλουρακίλη (AAMU). Η μετατροπή είναι γενικώς βραδεία, αλλά επιταχύνεται σε ουδέτερο ή αλκαλικό περιβάλλον σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Tang et al., 1983). Το μόριο αυτό εμφανίζεται να είναι αρκετά σταθερό σε στερεά μορφή, σε παγωμένα και οξινισμένα ούρα (Tang et al., 1983) και σε παγωμένο υδατικό διάλυμα.

## 5. ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Στο σημείο αυτό κρίνεται απαραίτητη μια σύντομη ανάπτυξη των ηπατοπαθειών από τις οποίες έπασχαν οι ασθενείς που έλαβαν μέρος στην κλινική μελέτη και είναι:

- Αλκοολική ηπατοπάθεια (λιπώδης διήθηση ήπατος, αλκοολική ηπατίτιδα, κίρρωση αλκοολικής αιτιολογίας)
- Μη αλκοολική λιπώδη διήθηση (NAFLD) / στεατοηπατίτιδα (NASH)
- Χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες (χρόνια ηπατίτιδα Β, χρόνια ηπατίτιδα C, χρόνια ηπατίτιδα D)
- Αυτοάνοση ηπατίτιδα
- Αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα του ήπατος (πρωτοπαθής χολική κίρρωση, πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα)

## 5.1. ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΑ

Το αλκοόλ αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες που προκαλούν τελικού σταδίου ηπατοπάθεια παγκοσμίως. Η αλκοολική ηπατοπάθεια αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία που οδηγεί σε μεταμόσχευση ήπατος στις Ηνωμένες Πολιτείες. Από τη δεκαετία του '70 ήταν σαφές πως η κίρρωση αλκοολικής αιτιολογίας ήταν άμεσα συνδεδεμένη με αυξημένη θνητότητα (Mandayam S. et al, 2004).

Το αλκοόλ είναι από τα πρώτα φάρμακα με ισχυρή αγχολυτική, υπναγωγική και αναλγητική δράση που χρησιμοποίησε ο άνθρωπος. «Το άγχος διαλύεται στο κρασί, όπως η ζάχαρη στο νερό» έλεγε ο Ηρόδοτος. Η σύνδεσή του με τη χαλάρωση και τη δημιουργία ευχάριστης ατμόσφαιρας και η ελεύθερη διακίνησή του στην αγορά το καθιστούν προσιτό στην κατάχρηση (Αγγελόπουλος, 1999). Οι συνέπειες από χρόνια κατάχρηση αλκοόλ αποτελούν την τέταρτη πιο συχνη αιτία θανάτου σε παγκόσμιο επίπεδο. Ο Olaennec το 1826 παρατήρησε αυξημένη επίπτωση της κίρρωσης μεταξύ των αλκοολικών. Υπολογίζεται ότι 320.000.000 Ευρωπαίοι κάνουν κατάχρηση οινόπνευματος, εκ των οποίων τα 40.000.000 είναι εξαρτημένοι (Νταλέκος και Σταθάκης, 1999).

Το αλκοόλ μεταβολίζεται κυρίως από το ήπαρ. Μόνο ένα ποσοστό μικρότερο του 10% αποβάλλεται αναλλοίωτο από τους νεφρούς, τους πνεύμονες και τον ιδρώτα. Όση ποσότητα αιθανόλης προσφέρεται στο ηπατικό κύτταρο μεταβολίζεται εις βάρος άλλων ουσιών που φυσιολογικά μεταβολίζονται από το ήπαρ. Η ικανότητα ημερήσιου μεταβολισμού αιθυλικής αλκοόλης από το ήπαρ ανέρχεται σε 160-180gr

Η αιθανόλη μεταβολίζεται μέσω τριών ενζυμικών συστημάτων: της αλκοολικής αφυδρογονάσης (ADH), του μικροσωμιακού οξειδωτικού συστήματος της αιθανόλης (MEOS) και της καταλάσης. Ο μεταβολισμός της αιθανόλης από την αλκοολική αφυδρογονάση προκαλεί μείωση των ενεργειακών αποθεμάτων NADH στο ηπατοκύτταρο, το οποίο έχει ως συνέπεια ποικίλες μεταβολικές διαταραχές, όπως υπερπρωτεϊναιμία IV και V, υπογλυκαιμία, γαλακτική οξέωση, υπερουριχαιμία. Ο μεταβολισμός των ορμονών επίσης διαταρράσσεται. Η αλκοολική ηπατοπάθεια αποτελεί άμεση συνέπεια της αυξημένης παραγωγής NADH (Seitz H.K. and Pöschl G, 2000). Αν και ο ακριβής μηχανισμός πρόκλησης βλάβης στο ηπατοκύτταρο δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, ανοσολογικοί μηχανισμοί και τραυματισμός του ηπατοκυττάρου από ελεύθερες ρίζες φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο (Walsh K. and Alexander G., 2000).

Ο συνολικός χρόνος και η ημερήσια κατανάλωση αλκοόλ σχετίζονται άμεσα με την ηπατοτοξικότητα της αιθανόλης, χωρίς όμως να έχει καθορισθεί με ασφάλεια η μεγαλύτερη ποσότητα που άφοβα επιτρέπεται να καταναλώνουμε επί μακρόν. Αυξημένος κίνδυνος για ανάπτυξη αλκοολικής νόσου ήπατος (ANH) σε σχέση με το γενικό πληθυσμό φαίνεται ότι υπάρχει ακόμα και σε ημερήσια κατανάλωση 40-60gr για τους άντρες και 20-30gr για τις γυναίκες. Η μορφή υπό την οποία καταναλώνεται το

οινόπνευμα δεν επηρεάζει την ηπατοτοξική του δράση, η οποία εξαρτάται αποκλειστικά από την ίδια την ποσότητα του οиноπνεύματος που έχει καταναλωθεί.

Εντούτοις μόνο το 20% περίπου των αντρών που υπερβαίνουν τα παραπάνω όρια καθημερινά επί 10 χρόνια θα αναπτύξουν κίρρωση ήπατος, ενώ οι γυναίκες εμφανίζονται περισσότερο ευαίσθητες στην ηπατοτοξικότητα του οινόπνευματος.

Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη ANH είναι γενετικοί πολυμορφισμοί των μεταβολικών ενζύμων της αιθανόλης, το φύλο (πιο ευαίσθητες οι γυναίκες), συνυπάρχοντες ηπατοτοξικοί παράγοντες (ακεταμινοφαίνη), συνυπάρχουσες λοιμώξεις από ηπατοτρόπους ιούς (HBV, HCV), κατάσταση θρέψης, κοινωνικοοικονομικό επίπεδο και ανοσολογικοί παράγοντες.

Τα κλινικά σύνδρομα της αλκοολικής ηπατοπάθειας είναι η λιπώδης διήθηση του ήπατος, η αλκοολική ηπατίτιδα και η αλκοολική κίρρωση του ήπατος που είναι δυνατό να συνυπάρχει με τις δύο προηγούμενες μορφές.

### **5.1.1. ΛΙΠΩΔΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗ ΗΠΑΤΟΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Συνήθως στο ιστορικό αναφέρεται ότι έχει προηγηθεί μακροχρόνια χρήση οινόπνευματος. Η πλειοψηφία των ασθενών δεν αναφέρει συμπτώματα. Μικρό ποσοστό αναφέρει μη ειδικά συμπτώματα (ναυτία, ανορεξία, βάρος στο δεξιό υποχόνδριο). Στην αντικειμενική εξέταση το ήπαρ είναι διογκωμένο, ήπια επώδυνο, με ομαλά χείλη. Σπάνια συνδυάζεται με σύνδρομο Zieve (ίκτερος, αιμολυτική αναιμία, υπερλιπιδαιμία).

Ο βιοχημικός έλεγχος στα 2/3 περίπου των ασθενών είναι φυσιολογικός. Μπορεί να υπάρχουν ελαφρά αυξημένες αμινοτρανσφεράσες (συνήθως διπλάσιες των φυσιολογικών τιμών) με υπεροχή της AST, αύξηση της γ-GT, της ALP, του MCV, υπερουριχαιμία, ηλεκτρολυτικές διαταραχές.

Η διάγνωση τίθεται με τη βιοψία ήπατος που σπάνια όμως απαιτείται για την τεκμηρίωση της κλινικοεργαστηριακής διάγνωσης.

Η λιπώδης διήθηση ήπατος θεωρείται αναστρέψιμη κατάσταση. Μετά από διακοπή της χρήσης οινόπνευματος τα συμπτώματα υποχωρούν εντός ημερών και οι ιστολογικές βλάβες εντός 2-3 εβδομάδων.

### 5.1.2. ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ

Πρόκειται για οξεία ή χρόνια φλεγμονή του ήπατος που είναι αποτέλεσμα ηπατοκυτταρικής βλάβης και νέκρωσης από κατάχρηση οινοπνεύματος.

Από το ιστορικό αναφέρεται πως πάνω από 80% των ασθενών κάνει κατάχρηση οινοπνεύματος για περισσότερα από πέντε χρόνια, ενώ ένα μικρό ποσοστό αναφέρει συμπτώματα μόλις ένα χρόνο μετά την έναρξη κατάχρησης οινοπνεύματος.

Σε ασυμπτωματικούς αρρώστους που υποβλήθηκαν σε βιοψία ήπατος λόγω διαταραχής των ενζύμων διαπιστώθηκαν αρκετές περιπτώσεις οξείας αλκοολικής ηπατίτιδας. Συνήθως όμως οι ασθενείς έχουν ανορεξία, ναυτία, εμετούς, απώλεια βάρους, ίκτερο, πυρετό, διόγκωση ήπατος και ευαισθησία κατά την ψηλάφηση (ηπατομεγαλία ανευρίσκεται σχεδόν σε όλους τους ασθενείς -σε ορισμένες περιπτώσεις το ήπαρ υπερβαίνει τα 10cm κάτω από το δεξιό υποχόνδριο). Παρατηρείται υπερδυναμική κυκλοφορία και η αρτηριακή πίεση είναι συνήθως μειωμένη. Κατά την ακρόαση του ήπατος διαπιστώνεται φύσημα αρτηριακό σε ποσοστό 50%. Σε ποσοστό 10-70% συνυπάρχουν σημεία από ανεπάρκεια βιταμινών και ιχνοστοιχείων (σκορβούτο, ερυθρά γλώσσα, beri-beri). Ανευρίσκονται, επίσης, πολλαπλοί αγγειωματώδεις σπίλοι, διάχυτο κοιλιακό άλγος, σπληνομεγαλία, ασκίτης, σημεία ηπατικής εγκεφαλοπάθειας. Μείωση της έκκρισης χολικών αλάτων, παγκρεατική ανεπάρκεια και τοξική δράση της αιθανόλης στο βλεννογόνο του λεπτού εντέρου συμβάλλουν στην ανάπτυξη στεατόρροιας.

Στον εργαστηριακό έλεγχο ανευρίσκεται αναιμία συνήθως μακροκυτταρική πιθανόν από έλλειψη B<sub>12</sub> και φυλλικού οξέος. Λευκοκυττάρωση (συνήθως 15-20.000 κύτταρα/μl, σπάνια μέχρι 80.000-100.000/μl) με αριστερή στροφή του τύπου απαντάται στο 25-95% (σπάνια η λευκοπενία ανατάσσεται μετά τη διακοπή κατανάλωσης οινοπνεύματος). Υπάρχει ποσοτική (λόγω άμεσης τοξικής δράσης του οινοπνεύματος στην παραγωγή μεγακαρυοκυττάρων ή λόγω συνυπάρχοντος υπερσπληνισμού) και ποιοτική ανωμαλία των αιμοπεταλίων και παράταση του χρόνου προθρομβίνης.

Εργαστηριακά η AST αυξάνει (συνήθως μέχρι 300-400IU/L). Η ALT ακόμη και σε βαριά αλκοολική ηπατίτιδα είναι ελαφρά αυξημένη (σε 80% των περιπτώσεων ο λόγος AST/ALT >2). Πιο ειδική δοκιμασία αποτελεί ο προσδιορισμός της μιτοχονδριακής μορφής της AST, καθώς η αιθανόλη προκαλεί χαρακτηριστικές βλάβες στα μιτοχόνδρια. Η γ-GT είναι σημαντικά αυξημένη. Οι γ-σφαιρίνες και ιδιαίτερα η IgA ανοσοσφαιρίνη είναι αυξημένες, ακόμη και σε απουσία κίρρωσης. Αυξημένη χολερυθρίνη, μειωμένη λευκωματίνη, υπερουριχαιμία, ηλεκτρολυτικές διαταραχές είναι συχνά ευρήματα.

Για την εκτίμηση της βαρύτητας της αλκοολικής ηπατίτιδας χρησιμοποιείται ο εργαστηριακός δείκτης Maddrey (discriminant function: DF (4,6x παράταση χρόνου προθρομβίνης+ολική χολερυθρίνη σε mg/dl). Τιμές μεγαλύτερες του 32 σχετίζονται με βαριά νόσο και υψηλή θνητότητα.

Η διαφορική διάγνωση της αλκοολικής ηπατίτιδας περιλαμβάνει νοσήματα χοληφόρου (οξεία χολοκυστίτιδα, οξεία χολαγγειίτιδα), ιογενείς ηπατίτιδες (λεπτοσπείρωση, ρικετσιώσεις), νόσο Wilson, πρωτοπαθή χολική κίρρωση, ηπατοκυτταρικό καρκίνο, φαρμακευτική ηπατίτιδα (αμιοδαρόνη) και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Κλινική επιδείνωση του ασθενούς με επίταση του κοιλιακού άλγους μπορεί λανθασμένα να εκτιμηθεί ως οξεία κοιλιά.

Η διάγνωση τίθεται με βιοψία ήπατος. Στις επιπλοκές περιλαμβάνονται η κίρρωση, (η οποία υποστρέφει με τη βελτίωση της ηπατίτιδας και δεν κρίνεται απαραίτητη η χορήγηση διουρητικών), η αιμορραγία από το γαστρεντερικό σωλήνα και, σπανιότερα, η εκδήλωση ηπατικής εγκεφαλοπάθειας και ηπατονεφρικού συνδρόμου.

Η θεραπεία περιλαμβάνει κατάκλιση, πλήρη διακοπή του οινοπνεύματος, παροχή δίαιτας πλούσιας σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, πολυβιταμίνες (κυρίως Β, C και Κ) φυλλικού οξέος, ριβοφλαβίνης, νικοτινικού οξέος, πυριδοξίνης, βιταμίνης C και ιχνοστοιχεία (κυρίως κάλιο, μαγνήσιο και ψευδάργυρος). Τα κορτικοστεροειδή θεωρείται πως βοηθούν στην αντιμετώπιση της αλκοολικής ηπατίτιδας. Φαίνεται ότι βελτιώνουν σημαντικά τη βραχυχρόνια επιβίωση ασθενών με σοβαρή αλκοολική ηπατίτιδα (τιμές DF >32 και /ή ηπατική εγκεφαλοπάθεια. Εντούτοις, δε φαίνεται να προλαμβάνουν την εξέλιξη της νόσου σε ιστολογικό επίπεδο, ούτε την εναπόθεση συνδετικού ιστού στο ήπαρ.

Όταν δεν υπάρχουν διαταραχές πήξης, η ετήσια θνητότητα ανέρχεται σε 7%. Αυξάνει σε 18%, όταν κατά τη νοσηλεία εμφανίζεται προοδευτική παράταση του χρόνου προθρομβίνης ( >3 sec σε σχέση με το μάρτυρα). Όταν από την αρχή υπάρχει διαταραχή του χρόνου προθρομβίνης (σε Maddrey score τιμές >32), η ετήσια θνητότητα ανέρχεται σε 40-50%. Ανεξάρτητοι παράγοντες που επιβαρύνουν την πρόγνωση είναι σημεία ηπατικής εγκεφαλοπάθειας ή ηπατονεφρικού συνδρόμου. Η τριετής θνητότητα ασθενών που ανάρρωσαν από αλκοολική ηπατίτιδα είναι 10 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τον αντίστοιχης ηλικίας και φύλου υγιή πληθυσμό. Η ετήσια πιθανότητα ανάπτυξης κίρρωσης υπολογίζεται σε 10-20%. Συνολικά, περίπου 50-70% των ασθενών που νόσησαν από αλκοολική ηπατίτιδα αναπτύσσουν κίρρωση ήπατος εντός 5-15 ετών. Κακοί προγνωστικοί παράγοντες που σχετίζονται με μελλοντική εμφάνιση κίρρωσης είναι η άρνηση πλήρους αποχής από το οινόπνευμα, η παρουσία μετά από βιοψία σοβαρής ιστολογικής βλάβης και το φύλο (γυναίκες, ακόμη και μετά από πλήρη αποχή από αλκοόλ και ήπιου βαθμού αρχική ιστολογική βλάβη).

## 5.2. ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΣΤΕΑΤΟΗΠΑΤΙΤΙΔΑ

Πρόκειται για κλινική οντότητα που περιλαμβάνει ασθενείς με ιστολογική εικόνα αλκοολικής ηπατίτιδας, οι οποίοι όμως δεν έκαναν χρήση οινοπνεύματος. Πρωτοπεριγράφηκε από τον Ludwig το 1980.

Είναι νόσος που έχει υποεκτιμηθεί (Bedogni G. et al, 2004; Neuschwander-Tetri, 2003). Ο επιπολασμός της εκτιμάται σε 2-3%. Φαίνεται πως προσβάλλει συχνότερα γυναίκες. Μαζί με τη χρόνια ηπατίτιδα C αποτελούν τα δυο συχνότερα αίτια χρόνιας ηπατοπάθειας στη Βόρεια Αμερική (Ramesh S. and Sanyal A.J. et al, 2004). Η νόσος θεωρείται πως αυξάνει σε χώρες του Δυτικού πολιτισμού, όπου αυξάνουν αντίστοιχα τα ποσοστά παχυσαρκίας και σακχαρώδη διαβήτη, τα οποία και αποτελούν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της νόσου (Elloumi H. et al, 2004; Haynes P. et al, 2004).

Η παθογένεια της νόσου περιγράφεται με τη θεωρία «δυο χτυπημάτων». Το πρώτο χτύπημα ακολουθείται από το δεύτερο, ένα από τα οποία πιθανό να είναι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή ελεύθερων ενεργών ριζών οξυγόνου, οι οποίες συμβάλλουν στην εναπόθεση λίπους και στη δημιουργία στεάτωσης μέσω υπεροξειδωσής λιπιδίων, επαγωγής κυτταροκινών ή επαγωγής της πρωτεΐνης fas-ligand. Η Fas ligand πρωτεΐνη (FasL) είναι μια τύπου II διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία ανήκει στην υπεροικογένεια του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF) (Das K. et al., 2005).

Σύμφωνα με άλλη θεωρία, η αύξηση του οξειδωτικού στρες μέσω της παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου ως αποτέλεσμα μιτοχονδριακών ανωμαλιών και επαγωγής του κυτοχρώματος P450 θεωρείται πως θα μπορούσε να είναι ένας μηχανισμός με τον οποίο το λιπώδες ήπαρ μη αλκοολικής αιτιολογίας μετατρέπεται σε στεατοηπατίτιδα (Sanyal et al., 2005). Η κατάσταση αυτή έχει ως συνέπεια υπεροξειδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, κυτταρική νέκρωση και απόπτωση, έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, ενεργοποίηση των αστροκυττάρων του ήπατος και δημιουργία ίνωσης. Ο παθογενετικός μηχανισμός αυτός είναι κοινός για την ανάπτυξη τόσο της αλκοολικής όσο και της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας. Ο TNF-α αυξάνεται σε παχύσαρκα και διαβητικά άτομα, ενώ η απώλεια βάρους μειώνει τα επίπεδά του. Παράλληλα, η IL-6 απελευθερώνεται συστηματικά από λιπώδη ιστό και προκαλεί την ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer και ίνωση (Nagata et al, 2007).

Η επώαση καλλιέργειας ανθρώπινων ηπατοκυττάρων με ελεύθερα, μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα (ελαϊκό και παλμιτικό) σε *in vitro* μελέτη είχε ως αποτέλεσμα συσσώρευση λιπιδίων στο κυτταρόπλασμα, η οποία ήταν δοσοεξαρτώμενη, μείωση της τάξεως του 46-60% στην καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 και CYP3A4, καθώς και μείωση της τάξεως του 25-45% στα επίπεδα του mRNA των CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9,



CYP2E1, CYP2D6, και CYP3A4 σε σχέση με κύτταρα που δεν είχαν επωαστεί με λιπαρά οξέα (Donato et. al, 2006). Σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της μικροσωμιακής έκφρασης των πρωτεϊνών του ήπατος CYP1A2, CYP2E1, CYP2C11, και CYP3A σε αρουραίους με πρόωμη στεάτωση μετά από προσθήκη οροτικού οξέος στην δίαιτα. Σε πλήρη συμφωνία με την μειωμένη έκφραση του CYP1A2, παρατηρήθηκε και μειωμένη, κατά 45% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, μικροσωμιακή Ο-αποαιθυλίωση της 7-αιθοξυρεζορουφίνης, κατάλυση ειδική για το CYP1A2, στα δείγματα ήπατος με στεάτωση (Zhang et al, 2007).

Η διάγνωση της νόσου βασίζεται στα ιστολογικά ευρήματα και στην απουσία ιστορικού κατανάλωσης αλκοόλ. Για τη διάγνωση της απαιτείται λιπώδης διήθηση ήπατος (μεγαλοφουσαλιδώδης ή άλλοτε μικροφουσαλιδώδης) και η παρουσία ενδείξεων ηπατοκυτταρικής βλάβης στη ζώνη 3 του ηπατικού λοβίου, η οποία υποχρεωτικά περιλαμβάνει μία από τις παρακάτω δύο αλλοιώσεις: α) υαλίνη του Mallory και/ή περικυτταρική ίνωση ή β) κενотоπιώδη εκφύλιση (ballooning) ή απόπτωση κυττάρων (drop out) στην περικεντρική περιοχή του λοβίου (Νταλέκος και Σταθάκης, 1999).

Τα κυριότερα αίτια που προκαλούν στεατοηπατίτιδα μη αλκοολικής αιτιολογίας είναι:

- Μεταβολικά ( παχυσαρκία, σακχαρώδης διαβήτης, σύνδρομο Cushing, υπερλιπιδαιμία)
- Φαρμακευτικά (αμιοδαρόνη, νιφεδιπίνη, μεθοτρεξάτη, γλυκοκορτικοειδή, τετρακυκλίνη, τετραχλωράνθρακας )
- Χειρουργικές επεμβάσεις πεπτικού (νηστιδοειλική παράκαμψη, γαστροπλαστική, εκτεταμένη εκτομή λεπτού εντέρου)
- Διάφορα ( σ.Reye, HIV λοίμωξη, οξύ λιπώδες ήπαρ της κύησης )

Το σύνδρομο αντίστασης στην ινσουλίνη αποτελεί το μόνο μεταβολικό σύνδρομο που συνοδεύεται σταθερά από τη νόσο.

Οι περισσότεροι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί και εργαστηριακά παρουσιάζουν ήπια τρανσαμινασαιμία. Κατά την αντικειμενική εξέταση είναι δυνατό να υπάρχει ηπατομεγαλία. Ο απεικονιστικός έλεγχος συνηγορεί υπέρ λιπώδους διήθησης του ήπατος.

Η νόσος εξελίσσεται προοδευτικά στο 25% των ασθενών. Επιμόλυνση από τον ιό HCV θεωρείται ό,τι ενδεχομένως προάγει την ανάπτυξη κίρρωσης (Leone N. et al, 2004). Σύμφωνα με άλλη εκτίμηση, υπολογίζεται πως ίσως οδηγεί προοδευτικά σε κίρρωση σε 15% ως 40% των ασθενών (Neuschwander-Tetri B.A., 2002).

Η θεραπεία της νόσου περιλαμβάνει κυρίως αντιμετώπιση του αιτιολογικού παράγοντα, όπως απώλεια βάρους, καλή ρύθμιση του σακχάρου ορού και άσκηση. Φαρμακευτικά έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες ουσίες με αμφίβολα έως και ανύπαρκτα αποτελέσματα. Η χορήγηση ουρσοδεοξυχολικού οξέος

φαίνεται να σταθεροποιεί τις κυτταρικές μεμβράνες, έχει αντιφλεγμονώδη δράση, λειτουργεί κυτταροπροστατευτικά και συνήθως επαναφέρει τις τρανσαμινάσες σε φυσιολογικά επίπεδα. Η μεταμόσχευση ήπατος έχει χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία σε τελικά στάδια.

### **5.3. ΧΡΟΝΙΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΕΣ**

#### **5.3.1. ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β**

Η μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) αποτελεί σοβαρό παγκόσμιο πρόβλημα με 2 δισεκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο να έχουν έρθει σε επαφή με τον ιό, εκ των οποίων τα 350 εκατομμύρια να υποφέρουν από χρόνια ηπατίτιδα Β. Ο HBV θεωρείται η δέκατη αιτία θανάτου στον κόσμο (Lavanchy D. et al, 2004). Η μόλυνση από τον HBV θεωρείται υπεύθυνη για 500.000 ως 1,2 εκατομμύρια θανάτους ετησίως που προέρχονται από χρόνια ηπατίτιδα Β, κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Το τελευταίο υπολογίζεται πως ευθύνεται για 320.000 θανάτους ετησίως. Στη βορειοδυτική και νοτιοδυτική Ελλάδα το ποσοστό των ασυμπτωματικών φορέων σε ειδικές μειωνοτικές ομάδες φαίνεται να ανέρχεται σε 22,6% (Gogos C. et al, 2003). Φαίνεται πως η μετανάστευση ανθρώπων από την Αλβανία, όπου ο επιπολασμός της ηπατίτιδας Α, Β και D είναι υψηλός, (πιθανόν λόγω του χαμηλού κοινωνικοοικονομικού επιπέδου και των κακών συνθηκών υγιεινής των μεταναστών), πιθανό να αυξάνει τον επιπολασμό των αντίστοιχων ιών στην πόλη των Ιωαννίνων και στην ευρύτερη περιοχή της Ηπείρου (Dalekos et al, 1995). Στην Κεντρική Ελλάδα 921 φορείς HBV καταγράφηκαν κατά την περίοδο 1999-2004 (Stefos et al, 2009). Σε αιμοδοτικούς πληθυσμούς το ποσοστό των ασυμπτωματικών φορέων HBV ανέρχεται σε 0,8% (Zervou et al, 2001).

Ένας ασθενής πάσχει από χρόνια ηπατίτιδα Β, όταν το HbsAg παραμένει πάνω από 6 μήνες μετά την οξεία λοίμωξη (The EASL jury, 2003). Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα μόλις το 1% των φορέων ετησίως αποβάλλει αυτόματα το HbsAg, χωρίς καμιά θεραπευτική παρέμβαση.

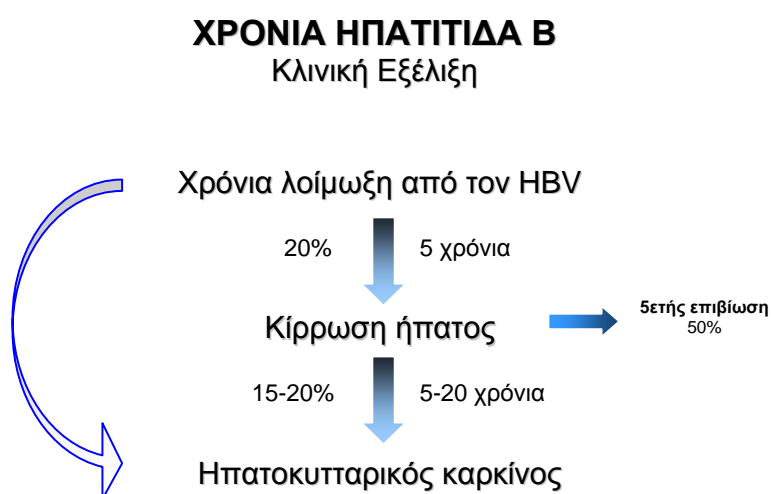
Τρόποι μετάδοσης του HBV είναι: παρεντερικά, διαδερμικά, σεξουαλικά, περιγεννητικά από τη μητέρα στο νεογνό κ.α. Υπάρχει αυξημένος κίνδυνος μετάδοσης του HBV μεταξύ των μελών της οικογένειας (Zervou et al, 2005). Τούτο συνιστά απαραίτητο τον εμβολιασμό των μελών της οικογένειας, όπου υπάρχει φορέας, και η αναζήτηση και άλλων φορέων στο στενό οικογενειακό περιβάλλον.

Οι περισσότεροι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί και η διάγνωση γίνεται τυχαία μετά από εξετάσεις ρουτίνας ή από εθελοντική αιμοδοσία. Λιγότερο συχνά αναφέρονται μη ειδικά γενικά συμπτώματα, όπως κόπωση, αδυναμία, καταβολή, αρθραλγίες, εξανθήματα. Ανορεξία, ναυτία, αίσθημα βάρους στο δεξιό υποχόνδριο και απώλεια βάρους εμφανίζεται συνήθως σε πιο προχωρημένα στάδια της ηπατικής νόσου. Συχνά οι ασθενείς διαγιγνώσκονται στο στάδιο ανάπτυξης κίρρωσης ή των επακολούθων της κίρρωσης



(σημεία πυλαίας υπέρτασης, ηπατικής εγκεφαλοπάθειας) ή μετά την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Αξίζει να αναφερθεί πως ο κίνδυνος ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου αυξάνει κατά 200 φορές σε φορείς HBsAg και κατά 800 φορές σε ασθενείς που έχουν ήδη αναπτύξει κίρρωση.

Συχνότερες εξωηπατικές εκδηλώσεις της χρόνιας ηπατίτιδας B είναι η οξώδης πολυαρθρίτιδα (40% των ασθενών είναι φορείς HBsAg) και η μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα συνήθως μέσω κρυσταλλοαίμας (Christodoulou et al, 2001). Η κλινική εξέλιξη της χρόνιας ηπατίτιδας B απεικονίζεται σχηματικά ως εξής:



Η κατανάλωση αλκοόλ επιταχύνει την εγκατάσταση και την εξέλιξη της ηπατοπάθειας (Balasubramanian S. and Kowdley KV., 2005; Stefos et al, 2009).

Εργαστηριακά, δύναται να παρουσιαστεί μικρή αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης, της LDH και της γ-GT. Όσο η νόσος επιδεινώνεται, αυξάνει η τρανσαμινασαιμία. Σε κίρρωση η AST μπορεί να παρουσιάζει αυξημένες τιμές σε σχέση με την ALT και σε πιο προχωρημένες καταστάσεις συνυπάρχει αύξηση γ-σφαιρινών, παράταση του χρόνου προθρομβίνης, μείωση λευκοματίνης. Σε ορισμένους ασθενείς ανιχνεύονται, επίσης, δείκτες αυτοάνοσης αντίδρασης, όπως: αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA), αντισώματα έναντι λείων μυικών ινών (SMA) και ρευματοειδής παράγοντας (RF) (Dalekos et al, 2009; Gatselis et al, 2005; Gatselis et al 2006, Satra et al; 2005).

Ασφαλή εμβόλια έναντι του ιού είναι διαθέσιμα από το 1982. Τα προγράμματα μαζικού εμβολιασμού, τα οποία συστήθηκαν από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας από το 1991, έχουν μειώσει σημαντικά τα ποσοστά μόλυνσης μεταξύ βρεφών, παιδιών και νηπίων σε πολλές χώρες (Lavanchy D. et al, 2004).

Σημαντικά αυξημένη παρουσιάζεται η επίπτωση της νόσου σε μέλη της ίδιας οικογένειας σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (Zervou E.K. et al, 2005). Γι' αυτό και κρίνεται απαραίτητος ο προφυλακτικός εμβολιασμός στα υγιή μέλη των οικογενειών των ασθενών.

Η θεραπεία έναντι του ιού αποτελεί το μόνο τρόπο για τη μείωση της θνητότητας από χρόνια ηπατίτιδα Β. Δυνητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν η λαμβουδίνη (σπάνια πια στις μέρες μας), η αντεφοβίρη, η εντεκαβτρη, η τελμπιβουδίνη, η τενοφοβίρη, η α-IFN.

Στο τελικό στάδιο ηπατικής ανεπάρκειας θεραπεία είναι η μεταμόσχευση ήπατος με ταυτόχρονη χορήγηση αντιικής αγωγής, ώστε να αποφευχθεί η επαναμόλυνση του μοσχεύματος.

Στους ασθενείς συνίσταται αποφυγή κατανάλωσης αιθανόλης και ηπατοτοξικών φαρμάκων. Επιπρόσθετα, συνίσταται βιοχημικός επανέλεγχος κάθε 3-6 μήνες και ορολογικός κάθε 6-12 μήνες. Επιπλέον, υπερηχογράφημα ήπατος και προσδιορισμός της α-FP κάθε 6-12 μήνες κυρίως στους κίρρωτικούς ασθενείς στην προσπάθεια έγκαιρης διάγνωσης ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου, χωρίς όμως ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

### 5.3.2. ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ D

Ο ιός της ηπατίτιδας D (HDV) είναι RNA ιός που απαιτεί την παρουσία του HBV για την αναπαραγωγή του. Επομένως, επιμολύνει μόνο ασθενείς που είναι ήδη φορείς χρόνιας ηπατίτιδας Β (80% των περιπτώσεων), οπότε και αναφερόμαστε σε οξεία επιλοίμωξη ή ασθενείς που μολύνονται ταυτόχρονα από τους δύο ιούς (οξεία συνλοίμωξη).

Στην Ελλάδα ο επιπολασμός της νόσου υπολογίζεται σε 2% στους ανενεργούς φορείς χρόνιας ηπατίτιδας Β και εκτιμάται ότι ανέρχεται σε 30% σε περιοχές ενδημικές για την ηπατίτιδα Β. Υψηλό είναι το ποσοστό της λοίμωξης σε αιμορροφιλικούς φορείς του ιού της ηπατίτιδας Β, σε μειονοτικούς πληθυσμούς και σε τοξικομανείς, όπου και προκαλεί αυξημένη νοσηρότητα (Dalekos et al, 1993). Επίσης, αυξημένος ήταν ο επιπολασμός ηπατίτιδας D σε ομάδα ελέγχου από νότια Αλβανία κατά 12,7% σε σχέση με αντίστοιχη ομάδα ελέγχου Ελλήνων (Dalekos et al 1995).

Η χρόνια ηπατίτιδα D προκαλεί σοβαρής μορφής ηπατοπάθεια, ακόμη και σε παιδιά. Η χορήγηση ιντερφερόνης-α είναι ασφαλής, αλλά σχετικά αναποτελεσματική (Dalekos et al, 2000). Μάλιστα θεωρείται πως μεταξύ αυτών των ασθενών είναι σπάνια η ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου, αφού οι ασθενείς καταλήγουν νωρίτερα από κίρρωση και τελικού σταδίου ηπατοπάθεια (ανθεκτικός ασκίτης, ηπατονεφρικό σύνδρομο, ηπατική εγκεφαλοπάθεια).

Η ανίχνευση του HDV-RNA ή του αντιγόνου HDV (HDVAg) σε συνδυασμό με αντίστοιχα ορολογικά και ιολογικά ευρήματα θέτουν τη διάγνωση. Τα επίπεδα HBsAg συσχετίζονται με HDV ιαμία

σε χρόνια ηπατίτιδα D. Οι βιοχημικοί παράμετροι δεν επιτρέπουν την εκτίμηση της βαρύτητας της ηπατικής νόσου. Η βιοψία φαίνεται να παραμένει το κύριο μέσο εκτίμησης της βαρύτητας των ασθενών με ηπατίτιδα D (Zachou et al, 2010).

Ο ιός HDV-RNA μεταδίδεται με τους ίδιους τρόπους που μεταδίδεται και ο ιός HBV-RNA (σπάνια περιγεννητικά). Επομένως, η πρόληψη από μόλυνση από τον ιό HDV-RNA περιλαμβάνει ουσιαστικά προφύλαξη από μόλυνση από τον HBV.

### 5.3.2. ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C

Υπολογίζεται πως 170.000.000 άνθρωποι στον κόσμο έχουν προσβληθεί από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) και περισσότεροι από 4 εκατομμύρια στις Ηνωμένες Πολιτείες (Levine C.D. and Ghalib R.H., 2005). Από αυτούς το 70% έχει χρόνια ηπατίτιδα C και στο 20% αυτών θα αναπτυχθεί κίρρωση (Becquemont et al., 2002). Ο επιπολασμός της λοίμωξης διακρίνεται σε υψηλό (συχνότητα αντι-HCV >5%): Αφρική, Νότια Αμερική (εκτός από Βραζιλία), ενδιάμεσα αυξημένο (συχνότητα αντι-HCV: 1,5-5%): Νότια και Ανατολική Ευρώπη, Βραζιλία, Ιαπωνία και χαμηλό (συχνότητα αντι-HCV<1,5%). Στις ΗΠΑ καταγράφονται 150.000 νέες μολύνσεις/ έτος και περίπου 10.000 θάνατοι /έτος από τα επακόλουθα της χρόνιας λοίμωξης από HCV. Στην Ελλάδα σύμφωνα με στοιχεία της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Βρυξέλλες, Νοέμβριος 1994) οι φορείς υπολογίζονται σε 200.000-250.000, εκ των οποίων οι 140.000 πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα C. Η επίπτωση υπολογίζεται σε 5 μολύνσεις/ 10.000 Έλληνες/ έτος. Περιοχές με αυξημένο επιπολασμό θεωρούνται η Κρήτη, η Θράκη, χωριά της Πελοποννήσου και της Θεσσαλίας (Gatselis et al, 2007). Στη βορειοδυτική και νοτιοδυτική Ελλάδα αντισώματα έναντι του HCV υπολογίζεται πως ανευρίσκονται σε 0,2-0,5% του πληθυσμού (Gogos C. et al, 2003; Zervou et al, 2007). Στην περιοχή της Ζακύνθου το ποσοστό των HCV οροθετικών εκτιμήθηκε σε 1,25% (Goritsas C. et al, 2000). Υπολογίζεται πως 400.000 άτομα στη Γαλλία έχουν μολυνθεί από τον ιό της ηπατίτιδας C με ρυθμό 4.000 άτομα το χρόνο (Roupon R, 2005). Μαζί με τη λιπώδη διήθηση ήπατος μη αλκοολικής αιτιολογίας αποτελούν τα δυο συχνότερα αίτια χρόνιας ηπατοπάθειας στη Βόρεια Αμερική (Ramesh S. and Sanyal A.J., 2004).

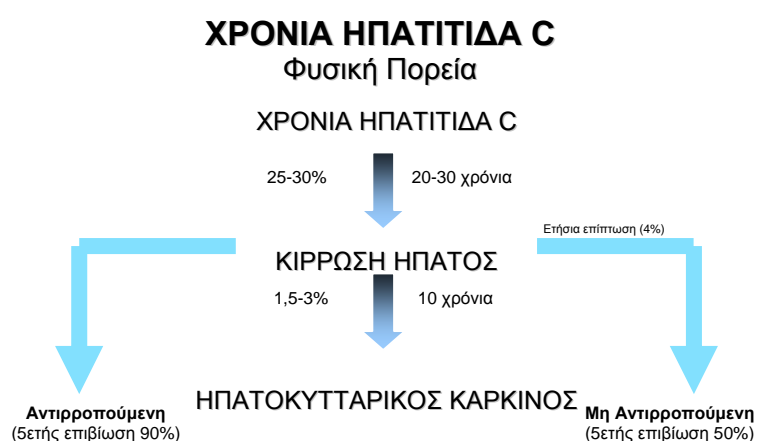
Οι ασθενείς θεωρείται ότι πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα C όταν υπάρχει ιαμία (HCV-RNA θετικό) με ή χωρίς αντι- HCV (που ανιχνεύεται με τη χρήση ανοσοενζυμικών μεθόδων) και επίμονα παθολογική αύξηση της αλανινοτρανσφεράσης διάρκειας μεγαλύτερης των 6 μηνών (Dalekos GN et al, Heart, 1998; Papamichalis et al, J Autoimmune Dis, 2007).

Αξίζει να αναφερθεί πως ειδικά η αλανινοαμινοτρανσφεράση είναι δυνατό να παρουσιάζει σταθερή αύξηση, διακυμάνσεις τύπου γιό-γιό ή τιμές φυσιολογικές για μακρύ χρονικό διάστημα. Ποσοστό μεγαλύτερο του 80% των ασθενών που μολύνονται θα μεταπέσει σε χρονιότητα. Το υπόλοιπο 10-20% των ασθενών θα αναπτύξει φυσική ανοσία (Leone N. et al, 2004).

Τρόποι μετάδοσης του HCV είναι παρεντερικά/ διαδερμικά, σεξουαλικά, περιγεννητικά από τη μητέρα στο νεογνό κ.α. Οι πιθανότητες μετάδοσης του ιού με τους προηγούμενους τρόπους είναι λιγότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες μόλυνσης από τον ιό HBV. Ξεχωριστή ομάδα κινδύνου αποτελούν οι νοσηλευόμενοι (επιπολασμός λοίμωξης: 2-20%). Εντούτοις, το 70% των ασθενών που έχουν έρθει σε επαφή με τον ιό δεν αναφέρει γνωστό τρόπο μετάδοσης. Πρόκειται για κρούσματα σποραδικά ή για μόλυνση κρυψιγενούς μετάδοσης. Στην Κεντρική Ελλάδα ως παράγοντας κινδύνου για ηπατίτιδα C θεωρήθηκε η χρήση γυάλινων βελόνων πολλαπλών χρήσεων για ιατρικούς λόγους (Gatselis et al, 2007).

Οι περισσότεροι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί και η διάγνωση γίνεται τυχαία σε εξετάσεις ρουτίνας ή σε εθελοντική αιμοδοσία. Πιο σπάνια αναφέρονται μη ειδικά συμπτώματα, όπως αδυναμία, καταβολή, κνησμός, αρθραλγίες, μυαλγίες. Συχνά οι ασθενείς διαγιγνώσκονται στο στάδιο ανάπτυξης κίρρωσης ή των επακολούθων της κίρρωσης (σημεία πυλαίας υπέρτασης, ηπατικής εγκεφαλοπάθειας).

Η κλινική εξέλιξη της χρόνιας ηπατίτιδας C απεικονίζεται σχηματικά ως εξής:



Στο 1/3 των ασθενών προκαλείται προοδευτική βλάβη στο ήπαρ, ίνωση και κίρρωση σε χρονικό διάστημα 20-30 έτη από τη μόλυνση. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη ηπατοπάθειας είναι το υπάρχον υικό φορτίο, η ύπαρξη ή μη στο ξενιστή *in vivo* ετερογενούς ομάδας στελεχών του ιού («σχεδόν είδη» ή quasi species) και ο γονότυπος του ιού. Η μόλυνση μετά την ηλικία των 40 ετών, το αντρικό φύλο, η συνύπαρξη μόλυνσης με HBV και HIV, η ύπαρξη λιπώδους διήθησης και η ανοσοκαταστολή επιβαρύνουν την πρόγνωση (Leone N. et al, 2004). Επιπλέον, η κατανάλωση αλκοόλ από τους ασθενείς επιταχύνει την εξέλιξη της ηπατοκυτταρικής βλάβης (Kulig C.C. and Beresford T.P., 2005). Η ύπαρξη στεάτωσης θεωρείται ανεξάρτητος επιβαρυντικός παράγοντας για την ανάπτυξη κίρρωσης (Leandro G. et al, 2006). Η πρόγνωση για θάνατο και ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου φαίνεται να είναι χειρότερη για ασθενείς που πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα C συγκριτικά με τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B (Kobayashi M. et al, 2006).

Εργαστηριακά, η ALT παρουσιάζει, όπως ήδη έχει αναφερθεί, σταθερή αύξηση, διακυμάνσεις τύπου γιο-γιο ή τιμές φυσιολογικές. Σε σχέση με τις υπόλοιπες χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες αυξημένη παρουσιάζεται συνήθως η γ-GT. Όσο η νόσος επιδεινώνεται, αυξάνει η τρανσαμινασαιμία. Σε κίρρωση η AST μπορεί να παρουσιάζει αυξημένες τιμές σε σχέση με την ALT και σε πιο προχωρημένες καταστάσεις συνυπάρχει αύξηση γ-σφαιρινών, παράταση του χρόνου προθρομβίνης, μείωση λευκωματίνης.

Η βιοψία ήπατος συνιστάται σε περιπτώσεις που τα αποτελέσματα αυτής μπορεί να επηρεάσουν τη θεραπεία (Roupon R., 2005).

Συνιστάται και εδώ ιδιαίτερα σε κίρρωτικούς ασθενείς προσδιορισμός α-FP και έλεγχος ήπατος με υπερηχογράφημα κάθε 6-12 μήνες, χωρίς όμως να βοηθούν σημαντικά στην ανακάλυψη ηπατοκυτταρικού καρκίνου σε αρχόμενα στάδια.

Είναι αξιοσημείωτο πως η χρόνια λοίμωξη HCV επάγει αυτοάνοσες αντιδράσεις σε γενετικά προδιαθετειμένα άτομα είτε μόνος του, είτε μετά τη θεραπευτική χορήγηση α-IFN. Χαμηλοί τίτλοι αυτοαντισωμάτων (ANA, SMA, αντισώματα κατά καρδιολιπίνης, αντιθυρεοειδικά) ανιχνεύονται στο 50-70% των ασθενών. Σε 5-10% των ασθενών ανιχνεύονται αντι-LKM-1, αυτοαντισώματα ειδικά της αυτοάνοσης ηπατίτιδας τύπου 2 (AH-2), ενώ σπάνια μπορεί να ανιχνευθούν αντι-LC1 (επίσης ειδικά AH-2) και αντισώματα κατά του CYP2A6 (Dalekos et al, Eur J Intern Med 2002; Dalekos et al, Eur J Clin Invest, 1993; Dalekos et al, Curr Rheumatol Reports 2001; Dalekos et al, Eur J Gastroenterol Hepatol. 2000; Dalekos et al, J Hepatol. 1999; Dalekos et al, J Hepatol. 2003; Rigopoulou et al, J Autoimmune Dis. 2007; Zachou et al, J Autoimmune Dis. 2004; Bogdanos and Dalekos, Curr Med Chem.2008).

Θεραπευτικά συνιστάται χορήγηση ιντερφερόνης σε συνδυασμό με ριμπαβιρίνη. Με το συνδυασμό αυτό επιτυγχάνεται ιολογική ύφεση σε ποσοστό 85% για ασθενείς που φέρουν γονότυπους 2 και 3 και σε περισσότερους από 50% των ασθενών με γονότυπο 1 (Roupon R., 2005).

Σε κάθε περίπτωση η θεραπεία θα πρέπει να εξατομικεύεται ανάλογα με τη βαρύτητα της ηπατικής βλάβης, τις αναμενόμενες παρενέργειες, τα αναμενόμενα ποσοστά επιτυχίας και τις ιδιαιτερότητες του ασθενούς (Roupon R., 2005). Η λιπώδης διήθηση μη αλκοολικής αιτιολογίας, όταν συνυπάρχει με χρόνια ηπατίτιδα C μειώνει περαιτέρω τα ποσοστά ιολογικής ανταπόκρισης της HCV-θεραπείας (Ramesh and Sanyal A.J., 2004). Επιπρόσθετα, συνιστάται ο προφυλακτικός εμβολιασμός κατά του HAV και του HBV, αφού μόλυνση από τους παραπάνω ιούς είναι δυνατό να οδηγήσει στην εκδήλωση οξείας κεραυνοβόλου ηπατίτιδας με υψηλή θνητότητα σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον HCV.

## 5.4. ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ

Χρόνια νόσος του ήπατος αγνώστου αιτιολογίας που προσβάλλει κυρίως γυναίκες (γυναίκες/ άντρες : 4/1), συχνότερα κορίτσια (5-20 ετών), αλλά και μεγαλύτερες ηλικίες (30-70 ετών).

Η αυτοάνοση ηπατίτιδα χωρίζεται σε δυο κύριους τύπους: i) την αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου I (AH-1), η οποία χαρακτηρίζεται από την ανίχνευση των αντισωμάτων: ANA, SMA, ANCA, αντι-ASGP-R και αντι-SLA/LP. ii) την αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου II (AH-2), η οποία χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη αυτοαντισωμάτων έναντι αυτοαντιγόνων που είναι ένζυμα υπεύθυνα για το μεταβολισμό φαρμάκων, όπως το anti-LKM (liver-kidney microsomal antigen)-1 έναντι του CYP2D6, anti-LKM-2 έναντι του CYP2C9, anti-LKM-3 έναντι του UGT1A, anti-APS (autoimmune polyglandular syndrome type-1) έναντι των CYP1A2, CYP2A6 κ.α.. (Mizutani T. et al, 2005) και anti-LC1 (liver cytosol antigen)-1 έναντι του FCTD (Dalekos et al, Eur J Intern Med. 2002; Zachou et al, J Autoimmune Dis. 2004; Bogdanos and Dalekos, Curr Med Chem. 2008).

Ο επιπολασμός της νόσου υπολογίζεται σε 5-10 περιπτώσεις/ 1.000.000 ανθρώπων με αυξανόμενη τάση (Νταλέκος και Σταθάκης, 1999). Η συχνότητα και τα χαρακτηριστικά της νόσου παρουσιάζουν διακυμάνσεις ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή. Η επίπτωση της AH-1 σε Καυκάσιους πληθυσμούς της Ευρώπης και της Βόρειας Αμερικής κυμαίνεται σε 0,1-1,9/ 100.000/ έτος. Η νόσος είναι λιγότερο συχνή στην Ιαπωνία. Η AH-2 είναι περισσότερο συχνή στη Νότια Ευρώπη παρά στη Βόρεια Ευρώπη, τις Ηνωμένες Πολιτείες και την Ιαπωνία (Boberg KM, 2002). Παρόλα αυτά η νόσος έχει παγκόσμια κατανομή και μπορεί να προσβάλλει κάθε ηλικία (Al-Khalidi J.A. and Czaja A.J., 2001).

Η επικρατέστερη θεωρία για την αιτιοπαθογένεια της νόσου φαίνεται σχηματικά παρακάτω:

μοριακή μίμηση μεταξύ ιών και ηπατικών αυτοαντιγόνων σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα



ρήξη ανοσολογικής ανοχής



ανοσολογική επίθεση έναντι ιδίων ηπατικών αντιγόνων



Κλινικά είναι δυνατό να εκδηλωθεί με την εμφάνιση ήπιων μη ειδικών συμπτωμάτων (60% των περιπτώσεων) (κακουχία, ανορεξία, απώλεια βάρους, αίσθημα κόπωσης, αρθραλγίες, μυαλγίες), με οξεία μορφή (30% των περιπτώσεων) που μπορεί να φτάσει σε οξεία κεραυνοβόλο ηπατική ανεπάρκεια, ειδικά σε μικρότερες ηλικίες ή τέλος να παραμένει ασυμπτωματική (10% των περιπτώσεων), οπότε και η διάγνωση της νόσου γίνεται από τυχαία κλινικοεργαστηριακά ευρήματα.

Εργαστηριακά, παρατηρείται αύξηση χολερυθρίνης και αμινοτρανσφερασών, διάχυτη υπεργαμμασφαιριναιμία και αυτοαντισώματα (ANA, SMA, p-ANCA, αντι-ASGP-R, αντι-LKM-1, αντι-LC1, κ.α.), με βάση τα οποία διακρίνονται οι δυο επιμέρους κύριοι τύποι. Αυξημένη παρουσιάστηκε επίσης και η συχνότητα αυτοαντισωμάτων έναντι της καρδιολιπίνης σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (Liaskos C. et al, 2005).

Ιστολογικά, χαρακτηριστική είναι η ύπαρξη περιτυλαίας ηπατίτιδας, στο 50% των περιπτώσεων η επέκταση σε λοβιδιακή ηπατίτιδα και σε τελικά στάδια κίρρωση.

Η διαφορική διάγνωση της νόσου πρέπει να γίνει από:

- Πρωτοπαθής χολική κίρρωση (ΠΧΚ)
- Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΚ)
- Αυτοάνοση χολαγγειοπάθεια
- Οξείες και χρόνιες ηπατίτιδες
- Αλκοολική και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα
- Φαρμακευτική ηπατίτιδα
- Έλλειψη α1-αντιθρυψίνης και νόσο Wilson

Για τη διάγνωση του νοσήματος πρόσφατα έχει δημοσιευθεί ένα απλοποιημένο αξιόπιστο score, το οποίο περιλαμβάνει αυτοαντισώματα, ανοσοσφαιρίνη γ, ιστολογικά ευρήματα και αποκλεισμό ηπατίτιδων ιογενούς αιτιολογίας. Το score παρουσιάζει 88% ευαισθησία και 97% ειδικότητα (Hennes et al, 2008).

Για τη θεραπεία της νόσου χορηγούνται κορτικοστεροειδή, (πρεδνιζόνη ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με αζαθειοπρίνη). Ανταπόκριση παρατηρείται στη μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών. Εντούτοις, επειδή η νόσος πολύ συχνά υποτροπιάζει μετά τη διακοπή της θεραπείας, συνίσταται μακροχρόνια θεραπεία συντήρησης. Το 10-20% που δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία θα οδηγηθεί τελικά σε μεταμόσχευση ήπατος με αξιοσημείωτα ποσοστά πενταετούς επιβίωσης.

## 5.5 ΧΟΛΟΣΤΑΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται η ΠΧΚ και η ΠΣΧ.

### 5.5.1. ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ

Πρόκειται για χρόνια χολοστατική νόσο του ήπατος αγνώστου αιτιολογίας που χαρακτηρίζεται από προοδευτική καταστροφή των μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων (διαμέτρου <80μ). Η σχέση της νόσου με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα και οι μεταβολές που προκαλούνται στους μηχανισμούς χυμικής και κυτταρικής ανοσίας του πάσχοντος οργανισμού συνηγορούν υπέρ της ανοσολογικής αρχής του νοσήματος. Εντούτοις, υπάρχουν ενδείξεις πως προκειμένου να εκδηλωθεί η νόσος εμπλέκονται τόσο ενδογενείς, όσο και εξωγενείς παράγοντες (Οο Υ.Η. et al, 2004).

Υπολογίζεται ότι ο επιπολασμός της νόσου ανέρχεται σε περίπου 100 περιπτώσεις /10<sup>6</sup> κατοίκους. Στις επιδημιολογικές μελέτες η συχνότητα της νόσου παρουσιάζεται συνεχώς αυξανόμενη. Όμως, δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί, εάν αυτό πρέπει να αποδοθεί στην παρουσία ενός εκλυτικού περιβαλλοντικού παράγοντα ή απλά στη βελτίωση των χρησιμοποιούμενων διαγνωστικών μέσων (Prince M. et al, 2005).

Η νόσος προσβάλλει κυρίως γυναίκες μέσης ηλικίας 40-60 ετών, (90% των περιπτώσεων). Προοδευτικά οδηγεί σε βλάβη των ηπατοκυττάρων πιθανόν από τη δράση χολικών αλάτων, διαβρωτική νέκρωση χολικού τύπου, πυλαία ίνωση και κίρρωση.

Σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο (στάδιο III και IV) η μέση επιβίωση υπολογίζεται σε 6-8 έτη χωρίς μεταμόσχευση ήπατος και σε περίπου 16 έτη για ασυμπτωματικούς ασθενείς.

Η νόσος μπορεί να παραμένει ασυμπτωματική για μεγάλο χρονικό διάστημα, οπότε και η διάγνωση τίθεται μετά από τυχαία ανακάλυψη αυξημένων τιμών αλκαλικής φωσφατάσης και/ ή γGT. Γενικευμένος κνησμός είναι δυνατό να αποτελεί το μόνο σύμπτωμα και να προηγείται ως και δύο χρόνια από την εμφάνιση ικτέρου. Ο κνησμός αρχικά αποδόθηκε σε συσσώρευση χολικών αλάτων στο διάμεσο υγρό του δέρματος (περιφερική αιτιολογία). Εντούτοις, νεότερα δεδομένα τον αποδίδουν σε ενδογενή οπιοειδή λόγω του αυξημένου τόνου που παρουσιάζουν οι υποδοχείς τους στο Κ.Ν.Σ. σε παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από χολόσταση (κεντρική αιτιολογία) και σε διαταραχή της λειτουργίας του τόνου των σεροτονινεργικών υποδοχέων στο Κ.Ν.Σ.. Στο τελευταίο αποδίδεται και το αίσθημα κόπωσης που συχνά συνοδεύει τη νόσο (Νταλέκος και Σταθάκης, 1999). Άλλα συνοδά κλινικά ευρήματα της νόσου είναι ηπατοσπληνομεγαλία, υπερχοληστεριναιμία (λόγω της χολόστασης) και συνοδά ξανθώματα και ξανθελάσματα, ίκτερος, πυλαία υπέρταση, στεατόρροια, οστεοπόρωση, οστεομαλακία και ασυμπτωματική βακτηριουρία. Αξίζει να σημειωθεί πως η νόσος είναι δυνατό να συνυπάρχει με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα ή σύνδρομα (Caramella et al, 2007; Zachou et al, Clin Immunol. 2006; Liaskos et



al, Clin Chem Acta 2010; Gatselis et al, Liver Int. 2007; Gatselis et al, Gastroenterol Res Pract. 2010), όπως είναι:

- Ρευματοειδής αρθρίτιδα
- Σύνδρομο Sjögren (ξηροφθαλμία, ξηροστομία, διόγκωση παρωτίδων)
- Αυτοάνοσα νοσήματα θυρεοειδούς
- Σύνδρομο Sicca (ξηροφθαλμία, ξηροστομία)
- Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο
- Φαινόμενο Raynaud
- Ελκώδης κολίτιδα
- Λεύκη
- Κακοήθης αναιμία Biermer
- Πορφύρα Henöch-Schonlein
- Οζώδες ερύθημα

Στον εργαστηριακό έλεγχο ανευρίσκονται αυξημένες τιμές χολοστατικών ενζύμων, χοληστερίνης και σε προχωρημένα στάδια χολερυθρίνης, κυρίως άμεσης ή συζευγμένης και υπεργαμμασφαιριναιμία, κυρίως αύξηση της IgM. Στα αρχικά στάδια υπάρχει ηωσινοφιλία (Zachou et al, Eur J Gastroenterol Hepatol. 2004). Αξίζει να σημειωθεί πως τιμές χολερυθρίνης > 10mg/dl αποτελούν απόλυτη ένδειξη για μεταμόσχευση ήπατος.

Απαραίτητη για τη διάγνωση της νόσου θεωρείται η ανεύρεση αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων (AMA), τα οποία ανιχνεύονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό στο 95% των περιπτώσεων (όταν οι τίτλοι είναι >1:160 η ειδικότητά τους αγγίζει το 100% των περιπτώσεων) (Sherlock S. et al, 2000). Τα μιτοχονδριακά αυταντιγόνα στην ΠΧΚ αποτελούν συστατικά του συμπλέγματος της 2-κετοξικής αφυδρογονάσης που αποτελεί συστατικό της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων των θηλαστικών.

Στην ΠΧΚ άλλα αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται (Rigopoulou et al, Liver 2007; Rigopoulou et al, Gut 2005; Rigopoulou et al, Clin Chem Acta 2007; Zachou et al, Clin Immunol. 2006; Rigopoulou and Dalekos, Hepatology 2008) είναι:

- Ειδικά ANA
- p-ANCA
- Αντισώματα κατά καρβονικής ανυδράσης
- Αντιαιμοπεταλιακά αντισώματα
- αντικαρδιολιπινικά

Ιστολογικά διακρίνονται τέσσερα στάδια ανάλογα με τη βαρύτητα:

- Στάδιο I: πυλαία ηπατίτιδα
- Στάδιο II: περιπυλαία ηπατίτιδα
- Στάδιο III: ινώδη διαφράγματα πέρα των πυλαίων διαστημάτων, πυλαιοπυλαίες

γεφυροποιές νεκρώσεις

- Στάδιο IV: κίρρωση

Η διαφορική διάγνωση της νόσου πρέπει να γίνει από:

- Δευτεροπαθή χολική κίρρωση (λίθος, νεόπλασμα, ατρησία χοληφόρων)
- Σαρκοείδωση
- ΠΣΧ
- Φάρμακα
- Χρόνια ηπατίτιδα (αυτοάνοση)

Ως θεραπεία για την αντιμετώπιση του κνησμού χορηγούνται ιοντοανταλλακτικές ρητίνες, όπως η χολεστυραμίνη και η κολεστιπόλη, ανταγωνιστές οπιοειδών, όπως η ναλοξόνη, ενώ ελπιδοφόρα αποτελέσματα φαίνεται να παρουσιάζει η χορήγηση 5-HT<sub>3</sub> υποδοχέων σεροτονίνης (ονδανσετρόνη). Το UDCA έχει χρησιμοποιηθεί με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Leuschner U. et al, 2005; Sherlock S. et al, 2000). Απαιτείται, επιπρόσθετα, προσθήκη ασβεστίου και βιταμίνης D για την αποφυγή οστεοπόρωσης και οστεομαλακίας. Σε τελικό στάδιο απαιτείται μεταμόσχευση ήπατος. Η μεταμόσχευση, επίσης, μπορεί να αποτελεί την τελική λύση λόγω έντονου, βασανιστικού κνησμού που δεν μπορεί να ελεγχθεί με κάποιο άλλο τρόπο. Η νόσος είναι δυνατό να υποτροπιάσει στο μόσχευμα.

### **5.5.2. ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΤΙΚΗ ΧΟΛΑΓΓΕΙΤΙΔΑ**

Πρόκειται για χρόνια χολοστατική νόσο του ήπατος αγνώστου αιτιολογίας που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή, ίνωση και προοδευτική καταστροφή του έξω- και ένδο-ηπατικού χοληφόρου δένδρου.

Ο επιπολασμός της νόσου κυμαίνεται σε 40-60 περιπτώσεις/ 1.000.000 σε παγκόσμια κλίμακα. Η συχνότητα της νόσου παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή. Αυξημένος είναι ο επιπολασμός της νόσου στη Βόρεια Ευρώπη (Schrumpf E. et al, 2001). Πρόκειται, κυρίως, για άντρες

ηλικίας 20-40 ετών (50% των περιπτώσεων), ενώ χαρακτηριστικό είναι πως στα 2/3 των ασθενών συνυπάρχει ελκώδης κολίτιδα (Νταλέκος και Σταθάκης, 1999). Υπολογίζεται ότι το ποσοστό αυτό ανέρχεται σε 80% σε Βόρεια Αμερική και Ευρώπη (Talwalkar J.R. et.al, 2005). Εντούτοις, μόνο 1-4% των ασθενών με ελκώδη κολίτιδα αναπτύσσει κλινικά σημαντική ΠΣΧ. Το κάπνισμα, όπως και στην ελκώδη κολίτιδα, σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου.

Αξίζει να σημειωθεί πως για τους ασθενείς αυξημένος είναι ο κίνδυνος ανάπτυξης χολαγγειοκαρκινώματος (10% των περιπτώσεων ανεξάρτητα από στάδιο νόσου) (Νταλέκος και Σταθάκης, 1999; Sherlock S. et.al., 2000). Άλλες επιπλοκές της νόσου αποτελούν προβλήματα από τα οστά (οστεομαλακία, οστεοπόρωση) και φυσικά, η εμφάνιση νεοπλασίας στο παχύ έντερο σε ασθενείς που πάσχουν από ελκώδη κολίτιδα (Talwakar J.R. et.al., 2005; Stiehl A. et.al., 2005).

Ο υποκείμενος μηχανισμός παθοφυσιολογίας παραμένει αδιευκρίνιστος και, έτσι, δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία που να καταστέλλει τη νόσο (Talwakar J.R. et.al., 2005).

Η πρόγνωση της νόσου είναι κακή. Οι περισσότεροι ασθενείς θα χρειαστούν μεταμόσχευση ήπατος 10 χρόνια μετά από την εμφάνιση συμπτωμάτων. Κακοί προγνωστικοί παράγοντες θεωρούνται: η μεγάλη ηλικία, η παρουσία πυλαίας υπέρτασης, υψηλές τιμές χολερυθρίνης, προχωρημένες ιστολογικές βλάβες.

Οι ασθενείς είναι δυνατό να παραμένουν ασυμπτωματικοί για μεγάλο χρονικό διάστημα και η νόσος να ανευρίσκεται μετά από τυχαία διαπίστωση αύξησης των χολοστατικών ενζύμων. Όταν εμφανίζονται συμπτώματα, αυτά είναι της χολόστασης: ίκτερος αποφρακτικός, ανορεξία, αδυναμία, άλγος δεξιού υποχονδρίου, πυρετός με ρίγος, νυχτερινοί ιδρώτες.

Η κλινικοεργαστηριακή διάγνωση επιβεβαιώνεται με μαγνητική χολαγγειοπαγκρεατογραφία (MRCP), παλίνδρομη ενδοσκοπική χολαγγειοπαγκρεατογραφία (ERCP) ή σπανιότερα με διαδερμική διηπατική χολαγγειογραφία (PTC)..

Εργαστηριακά διαπιστώνεται αύξηση της γαλακτικής αφυδρογονάσης, της αλκαλικής φωσφατάσης, της γ-γλουταμυλικής τρανσφεράσης, της 5-νουκλεοτιδάσης, της χολερυθρίνης και των αμινοτρανσφερασών (μικρή σχετικά αύξηση) και υπεργαμμασφαιριναιμία (συνήθως IgM). Και εδώ ανιχνεύονται αυτοαντισώματα: p-ANCA (ιδιαίτερα όταν συνυπάρχει ελκώδης κολίτιδα), SMA, ANA. Τακτικά πρέπει να μετράται ο νεοπλασματικός δείκτης CA 19-9 (τιμές >100 U/ml υποδηλώνει ανάπτυξη χολαγγειοκαρκινώματος).

Για τη θεραπεία χορηγούνται αντιβιοτικά και κορτικοστεροειδή για την πρόληψη εκδήλωσης βακτηριακής χολαγγειίτιδας και σηψαιμίας. Η χορήγηση μεθοτρεξάτης και D-πενικιλλαμίνης, παρά τα αρχικά ενθαρρυντικά αποτελέσματα, δε φάνηκε τελικά να βελτιώνει τη συνολική επιβίωση των ασθενών. Η χολεστυραμίνη χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του κνησμού. Διαστολές με μπαλόνι και τοποθέτηση stents διευκολύνει την παροχέτευση χολής. Σε τελικό στάδιο της νόσου θεραπεία αποτελεί η μεταμόσχευση ήπατος (Sherlock S. et al, 2000). Έχουν, μάλιστα, αναπτυχθεί μαθηματικά μοντέλα για

την εκτίμηση της πρόγνωσης και του κατάλληλου χρόνου διεξαγωγής της μεταμόσχευσης (Talwakar J.R et al, 2001).

## **5.6. ΚΙΡΡΩΣΗ ΗΠΑΤΟΣ**

Προέρχεται από την ελληνική λέξη ‘κηρός’. Πρόκειται για διάχυτη εξεργασία που χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη ινώδους ιστού και τη δημιουργία αναγεννητικών όζων. Θεωρείται κατάσταση μη αναστρέψιμη και συνοδεύεται από ηπατοκυτταρική ανεπάρκεια. Συνήθως έρχεται ως επακόλουθο μακροχρόνιας ηπατοκυτταρικής βλάβης, η οποία συνοδεύεται κατά κανόνα από ηπατοκυτταρική νέκρωση. Η απάντηση του ηπατικού ιστού στη νέκρωση είναι η σύμπτωση των ηπατικών λοβίων, ο σχηματισμός ινώδων διαφραγμάτων και η δημιουργία αναγεννητικών όζων.

### **5.6.1. ΑΙΤΙΑ ΤΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ**

- Χρόνια Ηπατίτιδα (Ιογενής B, D, C ή αυτοάνοση)
- Αλκοολική νόσος του ήπατος
- Χρόνια απόφραξη χοληφόρων (ΠΧΚ, ΠΣΧ, λίθος)
- Μειωμένη φλεβική αποχέτευση του ήπατος (καρδιακή ανεπάρκεια, συμπίεστική περικαρδίτιδα, σύνδρομο Budd-Chiari)
- Μεταβολικά νοσήματα (Νόσος Wilson, ανεπάρκεια  $\alpha_1$ -ΑΘ)
- Φάρμακα και τοξίνες (Μεθοτρεξάτη κ.α.)
- Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα

Όσον αφορά την κίρρωση HCV αιτιολογίας φαίνεται πως όσο μεγαλύτερη είναι η ηλικία επιλοίμωξης του ασθενούς, τόσο μικρότερο είναι το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την ανάπτυξη κίρρωσης, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που οι ασθενείς είναι ήδη φορείς του HBV (Dinis-Ribeiro M. et al, 2005).

Κλινικά η κίρρωση χαρακτηρίζεται από ένα παρατεταμένο προκλινικό στάδιο και από ένα βραχύτερης διάρκειας κλινικό στάδιο, όπου και παρατηρούνται μείζονα κλινικά ευρήματα.

Στη φάση της αντιρρόπησης η κίρρωση ανευρίσκεται είτε τυχαία, είτε σε ασθενείς που παρακολουθούνται για χρόνια ηπατοπάθεια. Συνήθως ο ασθενής είναι ασυμπτωματικός. Είναι δυνατό να αναφέρονται ήπια συμπτώματα εύκολης κόπωσης, αδυναμίας, απώλειας βάρους, αισθήματα βάρους στο δεξιό υποχόνδριο. Το 35% των ασθενών εμφανίζει μέτριου βαθμού πυρετική κίνηση (μέχρι 38°C).

Αναφέρονται, επίσης, γαστρεντερικές διαταραχές, όπως χολολιθίαση (30%), πεπτικό έλκος (10-20%), γαστρίτιδα κ.α.

Κατά την αντικειμενική εξέταση είναι δυνατό να υπάρχουν αραχνοειδείς τηλεαγγειεκτασίες (spiders) πρόσθιου θωρακικού τοιχώματος και μερών του σώματος που εκτίθενται στον ήλιο, ερύθημα παλαμών στην περιοχή θέναρως-υποθέναρως, γυναικομαστία, αμηνόρροια, υπογοναδισμός, ανικανότητα, σύνδρομο Dupuytren (πάχυνση παλαμιαίας περιτονίας), διόγκωση παρωτίδων (στο 50% των περιπτώσεων κίρρωσης αλκοολικής αιτιολογίας) κ.α. Σε πιο προχωρημένη νόσο οι ασθενείς παραπονούνται για αδυναμία, κακουχία, απώλεια βάρους, κοιλιακό άλγος (λόγω διάτασης της κάψας του Glisson ή λόγω ασκίτη). Κατά την φυσική εξέταση το ήπαρ είναι δυνατόν να ψηλαφάται (70%) ή και να μην ψηλαφάται (ρικνό ήπαρ) λόγω ίνωσης σε προχωρημένη νόσο.

Ως μη αντιρροπούμενη κίρρωση θεωρείται η κίρρωση, η οποία έχει επιπλακεί από μία τουλάχιστον από τις τρεις ακόλουθες καταστάσεις:

- Κιρσορραγία ή αιμορραγία λόγω πυλαίας γαστροπάθειας
- Ασκίτη
- Ηπατική εγκεφαλοπάθεια

Στην κίρρωση αναγνωρίζονται δύο μείζονα κλινικά ευρήματα: Η πυλαία υπέρταση, η οποία και θεωρείται υπεύθυνη για όλες τις επιπλοκές της κίρρωσης εκτός από τον καρκίνο, και ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος.

Επιπλοκές της πυλαίας υπέρτασης είναι η συμφορητική σπληνομεγαλία, ο σχηματισμός κιρσών του οισοφάγου και/ή του θόλου του στομάχου και η αιμορραγία αυτών, ο ασκίτης, η αυτόματη βακτηριακή περιτονίτιδα, το ηπατοπνευμονικό σύνδρομο, το ηπατονεφρικό σύνδρομο και η ηπατική εγκεφαλοπάθεια.

Το 60-80% των περιπτώσεων ηπατοκυτταρικού καρκίνου αναπτύσσεται σε έδαφος κίρρωσης. Το μεγαλύτερο κίνδυνο ενέχει η κίρρωση ιογενούς αιτιολογίας (ο HBV θεωρείται ογκογόνος ιός). Σε περιπτώσεις κίρρωσης ιογενούς αιτιολογίας ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου αυξάνει κατά 2-6 φορές για τον κάθε ιό χωριστά. Αντίστοιχα σε κίρρωση αλκοολικής αιτιολογίας η μη αποχή από αλκοόλ πολλαπλασιάζει το κίνδυνο κατά 2-6 φορές (Fattovich G. et al, 2004). Σε ασθενείς με κίρρωση HCV αιτιολογίας, η επίπτωση ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου ανέρχεται 2-5% ανά έτος. Μέχρι σήμερα η τελικού σταδίου κίρρωση HCV αιτιολογίας εξακολουθεί να αποτελεί το πρώτο αίτιο για τη μεταμόσχευση ήπατος (Leone N. et al, 2005).

την κλινική πράξη η βαρύτητα της κίρρωσης αξιολογείται με την κλίμακα Child-Pugh, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 που ακολουθεί:

**Πίνακας 1.** Σταδιοποίηση της κίρρωσης κατά Child-Pugh

	<b>ΣΤΑΔΙΟ Α</b> (Ελάχιστη- ήπια νόσος)	<b>ΣΤΑΔΙΟ Β</b> (Μέτρια νόσος)	<b>ΣΤΑΔΙΟ C</b> (Προχωρημένη νόσος)
Χολερυθρίνη ορού	<2,0 mg/dl	2,0-3,0 mg/dl	>3,0 mg/dl
Λευκωματίνη ορού	>3,5 g/dl	2,8-3,5 g/dl	<2,8 g/dl
Χρόνος προθρομβίνης (παράταση σε sec)	<4	4-6	>6
Ασκίτης	Δεν υπάρχει	Εύκολα ελεγχόμενος	Δύσκολα ελεγχόμενος
Ηπατική εγκεφαλοπάθεια	Απούσα	Στάδιο 1 ή 2	Στάδιο 3 ή 4

Από τα πιο συχνά ευρήματα μη αντιρροπούμενης κίρρωσης είναι η αναιμία. Τα λευκά μπορεί να είναι φυσιολογικά, αυξημένα ή μειωμένα αντανακλώντας αντίστοιχα λοίμωξη ή υπερσπληνισμό. Τα αιμοπετάλια συχνά είναι μειωμένα λόγω υπερσπληνισμού ή μυελοτοξικής δράσης του οινόπνευματος, έλλειψης B<sub>12</sub>, ή φυλλικού οξέος. Τελευταία έχουν βρεθεί και αντιαιμοπεταλιακά αντισώματα έναντι γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων που πιθανόν να ενοχοποιούνται για την ποσοτική μείωση τους. Διαταραχές πήξης είναι συχνές σε προχωρημένα στάδια ηπατοκυτταρικής ανεπάρκειας. Αποδίδονται σε μειωμένη παραγωγή μορίων από το ηπατικό παρέγχυμα (παράταση χρόνου προθρομβίνης), ποσοτική, άλλα και ποιοτική δυσλειτουργία αιμοπεταλίων (ελαττωματική συσσώρευση). Επίσης, αυξημένες είναι οι τρανσαμινάσες (ειδικά η AST), η ALP, η γGT και η α-FP (σε σημαντικά πιο χαμηλά επίπεδα από τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο). Συχνή είναι η υπεργαμμασφαιριναιμία (σε αλκοολικής αιτιολογίας κίρρωση είναι χαρακτηριστική η αύξηση της IgA).

Σε περιπτώσεις κίρρωσης ιογενούς αιτιολογίας ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου αυξάνει κατά 2-6 φορές για τον κάθε ιό χωριστά. Αντίστοιχα σε κίρρωση αλκοολικής αιτιολογίας η μη αποχή από αλκοόλ πολλαπλασιάζει το κίνδυνο κατά 2-6 φορές (Fattovich G. et.al, 2004). Σε ασθενείς με κίρρωση HCV αιτιολογίας, η επίπτωση ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου ανέρχεται 2-5% ανά έτος. Μέχρι σήμερα η τελικού σταδίου κίρρωση HCV αιτιολογίας εξακολουθεί να αποτελεί το πρώτο αίτιο για τη μεταμόσχευση ήπατος (Leone N. et.al 2005).

Για τη θεραπεία της κίρρωσης απαραίτητη είναι η διακοπή της λήψης αλκοόλ και η ειδική αντιμετώπιση σε ειδικού τύπου κίρρωσεις ανάλογα με την αιτιολογία τους π.χ. νόσο Wilson, ανεπάρκεια α1-αντιθρυψίνης, αυτοάνοση. Σημαντική είναι η πρόληψη των επιπλοκών της πυλαίας υπέρτασης. Στη διαίτα γίνεται προσθήκη πρωτεϊνών (εκτός από περιπτώσεις ηπατικής εγκεφαλοπάθειας), βιταμινών, φυλλικού οξέος, θεικού σιδήρου και μείωση της πρόσληψης νατρίου, όπου υπάρχει αυξημένη κατακράτηση υγρών (ασκίτης, περιφερικό οίδημα). Η χορήγηση βιταμίνης K βελτιώνει την αιμορραγική διάθεση. Αυτό αποδίδεται σε υπολειπόμενη φυσιολογική ηπατοκυτταρική λειτουργία. Όταν δεν υπάρχει βελτίωση, η ηπατοκυτταρική βλάβη είναι μεγάλη και η πρόγνωση βαριά. Σε αυτές τις περιπτώσεις χορηγείται φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα και το αποτέλεσμα είναι παροδικό.

Γενικά η πρόγνωση της κίρρωσης δεν φαίνεται να έχει αλλάξει. Παράγοντες που βελτιώνουν την πρόγνωση είναι η αποχή από το αλκοόλ και τα πρώτα στάδια της ταξινόμησης κατά Child-Pugh. Η μέση επιβίωση υπολογίζεται σε 39, 32 και 8 μήνες αντίστοιχα για τα στάδια A, B, C.



## 6. ΗΠΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Η ικανότητα του ήπατος να μεταβολίζει εξωγενείς και ενδογενείς ουσίες εξαρτάται άμεσα από παράγοντες, όπως είναι: η ροή αίματος στο ήπαρ, η μεταβολική ικανότητα/ ενεργότητα των ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό τους, η πυλαία κυκλοφορία, το ποσοστό της ουσίας που κυκλοφορεί αδέσμευτο στον ορό του αίματος.

Παράγοντες που ενοχοποιούνται για τις παρατηρούμενες μεταβολές σε ηπατική νόσο είναι η μείωση του αριθμού των ηπατοκυττάρων λόγω νέκρωσης και ανάπτυξης ινώδους συνδετικού ιστού, η ελάττωση της μεταβολικής ικανότητας των μικροσωματικών ενζύμων του ήπατος (Bass and Williams, 1988; M<sup>c</sup>Lean and Morgan, 1991; Scott et al., 1988; Howden et al., 1989) ή και η συνολική έκπτωση της ηπατικής λειτουργίας, η ανάπτυξη παράπλευρης κυκλοφορίας, αλλά και οι παρατηρούμενες μεταβολές που παρατηρούνται στην παραγωγή πρωτεϊνών του αίματος, όπως π.χ. μειωμένη παραγωγή λευκωματίνης (Tillement et al., 1978) κ.α. Άλλοι παράγοντες που επιδεινώνουν το μεταβολισμό φαρμάκων σε περίπτωση ηπατικής νόσου είναι η δυσαπορρόφηση, η φτωχή σε βιταμίνες, ηλεκτρολύτες και ιχνοστοιχεία διατροφή, καθώς και η κατανάλωση αλκοόλ. Ο μεταβολισμός φαρμάκων επιβαρύνεται επιπρόσθετα από παράγοντες που είναι δυνατό να συνυπάρχουν, όπως επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας, η ανάπτυξη ηπατονεφρικού συνδρόμου και η συγχορήγηση πολλών φαρμακευτικών παρασκευασμάτων για την πρόληψη και την αντιμετώπιση επιπλοκών της νόσου. Ο Bechtel (2000) αναφέρει και συνυπάρχουσα δυσαπορρόφηση που την αποδίδει σε παρατεταμένη πέψη (orocecal transit) και σε καθυστερημένη κένωση του στομάχου.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στη μέχρι τώρα καθημερινή κλινική πράξη για την εκτίμηση της βαρύτητας της ηπατικής νόσου συνεκτιμώνται τα ευρήματα της αντικειμενικής εξέτασης, των αιματολογικών και βιοχημικών εξετάσεων, της βιοψίας ήπατος και των απεικονιστικών μεθόδων, όπως είναι ο υπέρηχος, η υπολογιστική και η μαγνητική τομογραφία άνω κοιλίας. Εντούτοις, οι κλασικοί εργαστηριακοί δείκτες της ηπατικής λειτουργίας, όπως είναι τα αιμοπετάλια, η λευκωματίνη, η χολερυθρίνη, οι παράγοντες πήκτικότητας του αίματος, με κύριο το International Normalized Ratio-INR, είναι αδρόι και συνήθως μεταβάλλονται σε προχωρημένη νόσο. Σε αρχόμενα στάδια ηπατικής βλάβης είναι μικρής διαγνωστικής αξίας και παρέχουν ανεπαρκείς πληροφορίες σε περιπτώσεις αρχόμενης ηπατοκυτταρικής δυσλειτουργίας. Ως αποτέλεσμα, κάποιοι ασθενείς με αρχόμενη κίρρωση φαίνεται πως έχουν μικρή ή και καθόλου βλάβη με βάσει τα βιοχημικά τους ευρήματα, ενώ μπορεί να παρουσιάσουν ακόμα και ταχεία επιδείνωση της κλινικής τους εικόνας (Shrestha et al., 1997). Η βιοψία ήπατος, που θεωρείται από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της βαρύτητας της ηπατικής βλάβης, παρέχει άμεσες πληροφορίες για τη μορφολογία των ηπατοκυττάρων, εντούτοις ούτε αυτή δίνει άμεσες πληροφορίες για την εναπομείνσα λειτουργική ικανότητα του ήπατος, ενώ επιπλέον είναι επεμβατική μέθοδος που δεν μπορεί να γίνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα στη διάρκεια του follow-up.

Για το λόγο αυτό καταβάλλονται τα τελευταία χρόνια προσπάθειες για την ανάπτυξη μιας ασφαλούς, αξιόπιστης, μη επεμβατικής, απλής και σχετικά μικρού κόστους μεθόδου που θα επιτρέπει την εκτίμηση βλάβης σε επίπεδο ηπατικού κυττάρου και, επομένως, την έγκαιρη διάγνωση ηπατοκυτταρικής δυσλειτουργίας σε πρωιμότερα στάδια ηπατικής νόσου. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα ουσίες που μεταβολίζονται/ ή εκκρίνονται σχεδόν αποκλειστικά από το ήπαρ. Τέτοιες δοκιμασίες είναι η δοκιμασία αναπνοής αμινοπυρίνης, (αντανακλά την ηπατική μικροσωματική λειτουργία), η δοκιμασία αποβολής γαλακτόζης, (αντανακλά τη λειτουργία του κυτταροπλάσματος του ηπατοκυττάρου), η κάθαρση αντιπυρίνης, (αντανακλά την ενδογενή δυνατότητα κάθαρσης του ήπατος), η κάθαρση σορβιτόλης, (αντανακλά ροή πλάσματος στο ήπαρ), η κάθαρση πράσινης ινδοκυανίνης, (αντανακλά τη διάχυση στο ήπαρ). Τα μειονεκτήματα των προαναφερθέντων μεθόδων, όπως είναι η πολυπλοκότητα, το υψηλό κόστος, η επεμβατικότητα πάνω στον εξεταζόμενο, οι παρενέργειες που παρουσιάστηκαν στους συμμετέχοντες, η πολύπλοκη ανάλυση που απαιτείται, έχουν

περιορίσει τη χρήση τους στην κλινική πράξη και χρησιμοποιούνται κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς. Επιπρόσθετα, οι δοκιμασίες αυτές προσφέρουν ελάχιστες/ ή και καθόλου επιπλέον πληροφορίες σε σχέση με τις υπάρχουσες εργαστηριακές μεθόδους ως προς τη διάγνωση και την πρόγνωση των χρόνιων ηπατικών νοσημάτων.

Η βιομετατροπή της καφεΐνης από τα μικροσωματικά ένζυμα του ήπατος αποτελεί ένα εξαιρετικό μη επεμβατικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της *in vivo* λειτουργίας του κυτοχρώματος CYP1A2. Πρόσφατες μελέτες προσδιορισμού των μεταβολιτών της καφεΐνης σε βιολογικά υγρά ασθενών σε χρόνια ηπατικά νοσήματα έδειξαν ότι τα προϊόντα μεταβολισμού της καφεΐνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν εύκολα ως αξιόπιστοι δείκτες εκτίμησης της ηπατοκυτταρικής λειτουργίας. Φαίνεται ότι διαφορετικής βαρύτητας ηπατικά νοσήματα μπορούν να επηρεάσουν εκλεκτικά την μεταβολική ικανότητα του CYP1A2. Εντούτοις, ο αριθμός των ασθενών που εμπεριέχουν οι συγκεκριμένες μελέτες είναι συνήθως μικρός και δεν υπάρχει ακριβής ταξινόμηση των ασθενών ανάλογα με την κατηγορία και τη βαρύτητα της ηπατικής νόσου (Morgan and Mc Lean, 1995).

*Σκοπός της παρούσας μελέτης* είναι η ανάπτυξη μιας μη επεμβατικής, απλής, ευαίσθητης, αξιόπιστης μεθόδου, η οποία επιτρέπει την εκτίμηση ηπατοκυτταρικής δυσλειτουργίας, ακόμη και σε «πρώιμα» στάδια χρόνιας ηπατικής νόσου, με τη χρήση ενός μεμονωμένου δείγματος ούρων μετά από κατανάλωση συγκεκριμένης ποσότητας καφεΐνης από το στόμα. Για το σκοπό αυτό διερευνάται σε ένα εκτεταμένο δείγμα ασθενών με χρόνια ηπατοπάθεια, αν μπορούμε να εκτιμήσουμε μεταβολές της μικροσωματικής λειτουργικής μάζας των ηπατοκυττάρων ανάλογα με τη βαρύτητα και την αιτιολογία των ηπατικών νοσημάτων, χρησιμοποιώντας την καφεΐνη ως υπόστρωμα και μελετώντας τη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2, το οποίο είναι ένα συγκεκριμένο μικροσωματικό ένζυμο του ήπατος.

Αναμένεται ότι βραχυπρόθεσμα η εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 μέσω του προσδιορισμού των μεταβολιτών καφεΐνης στα ούρα και, επομένως, η δοκιμασία της μεταβολικής ικανότητας του ήπατος, θα αποτελέσει ένα επιπρόσθετο διαγνωστικό μέσο για τη διερεύνηση της ηπατοκυτταρικής δυσλειτουργίας και θα βοηθήσει στη διερεύνηση του βαθμού και του ρυθμού επιδείνωσης της λειτουργίας των μικροσωματικών ενζύμων του ήπατος ως αποτέλεσμα διαφορετικού βαθμού ηπατοπάθειας, ώστε μακροπρόθεσμα να μπορέσει δυνητικά να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση του σταδίου της ηπατοπάθειας, καθώς και ως δείκτης παρακολούθησης για την πρόγνωση χρόνιων ηπατικών νοσημάτων στην κλινική πράξη. Ειδικότερα, η μέθοδος θα μπορούσε να καθιερωθεί ως σημαντική μη επεμβατική μέθοδος ρουτίνας για την παρακολούθηση (monitoring) του βαθμού και του ρυθμού επιδείνωσης της ηπατικής λειτουργίας, αλλά και ως σημαντικός δείκτης για την πρόληψη σοβαρών συνεπειών που θα μπορούσαν να προκύψουν από την μη έγκαιρη προσαρμογή της φαρμακευτικής θεραπείας των ασθενών, ειδικά όσον αφορά φάρμακα με μικρό θεραπευτικό εύρος.

Άλλες εν δυνάμει χρήσεις χρησιμοποίησης της δοκιμασίας της καφεΐνης σαν μεταβολικού δείκτη για τον καθορισμό της δραστηριότητας των ενζύμων του ήπατος θα μπορούσαν να είναι η πρόβλεψη της επιβίωσης και ο υπολογισμός της σοβαρότητας της μεταβολικής βλάβης, με σκοπό όχι μόνο τη χορήγηση κατάλληλων δόσεων φαρμάκων, αλλά και την επιλογή των κατάλληλων φαρμακευτικών σκευασμάτων, την περιγραφή της προόδου της ασθένειας, την εξέταση της ανταπόκρισης στη θεραπεία και τον υπολογισμό του ιδανικού χρόνου για μεταμόσχευση ήπατος. Η αξία της κάθαρσης της καφεΐνης για αυτές τις χρήσεις πρέπει βέβαια να ελεγχθεί, αλλά η εγκυρότητα των απλοποιημένων μετρήσεων της αποβολής της καφεΐνης και η ευκολία με την οποία μπορούν να εκτελεστούν σε ασθενείς με προχωρημένη ηπατοπάθεια καθιστά την καφεΐνη μια ουσία-δείκτη της ηπατικής λειτουργίας με μεγάλο πρακτικό πλεονέκτημα.

Στη μελέτη αυτή συμπεριλαμβάνονται 340 ηπατοπαθείς με διαφορετικής βαρύτητας και αιτιολογίας χρόνια ηπατικά νοσήματα, των οποίων τα αποτελέσματα συγκρίνονται με ένα αξιοσημείωτο δείγμα υγιών (165 υγιείς). Αξίζει να σημειωθεί ότι για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία εκτιμάται η δραστηριότητα του CYP1A2 με τη βοήθεια του μεταβολισμού της καφεΐνης σε ασθενείς με ΑΗ, σε ασθενείς με ΠΣΧ και σε ασθενείς με NAFLD/NASH. Επιπρόσθετα, για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία εκτιμάται η δραστηριότητα του CYP1A2 με τη βοήθεια του μεταβολισμού της καφεΐνης συγχρόνως σε πολλά και διαφορετικής αιτιολογίας και βαρύτητας χρόνια ηπατικά νοσήματα-μια μελέτη που θα δώσει πληροφορίες για το αν επηρεάζεται η δραστηριότητα του CYP1A2 μόνο από το στάδιο της ηπατικής νόσου ή υπεισέρχεται σε αυτή και η αιτιολογία του ηπατικού νοσήματος. Επιπλέον, κατά τη μελέτη συνεκτιμώνται εξωγενείς παράγοντες, όπως είναι το κάπνισμα, το φύλο και η ηλικία, οι οποίοι, αν και είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2, σε λίγες μελέτες με ηπατοπαθείς έχουν ληφθεί υπόψη κατά τη στατιστική επεξεργασία και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Συνοψίζοντας:

- Χρησιμοποιείται ένα εκτεταμένο δείγμα ηπατοπαθών με αξιόπιστη ταξιμόνηση των ασθενών ανάλογα με την αιτιολογία και τη βαρύτητα της ηπατοπάθειας.
- Οι ασθενείς έχουν χωριστεί ανάλογα με την αιτιολογία και το βαθμό βαρύτητας της κάθε ηπατοπάθειας και ελέγχεται αν και με ποιο τρόπο επηρεάζεται η δραστηριότητα του ενζύμου συνολικά σε ηπατοπάθειες, αλλά και σε επιμέρους κατηγορίες.
- Για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία γίνεται εκτίμηση της δραστηριότητας σε ασθενείς με NAFLD/NASH.
- Για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία γίνεται εκτίμηση της δραστηριότητας σε ασθενείς με ΑΗ.

- Για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία γίνεται εκτίμηση της δραστηριότητας σε ασθενείς με ΠΣΧ.

## 2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΕΣ - ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ

Στη μελέτη έχουν συμπεριληφθεί ηπατοπαθείς, οι οποίοι έπασχαν από διαφορετικής βαρύτητας και αιτιολογίας ηπατικά νοσήματα. Οι ηπατικές νόσοι ανάλογα με τη βαρύτητα και την αιτιολογία τους ταξινομήθηκαν στις κάτωθι κατηγορίες:

- Ανενεργείς φορείς HBV (47 ασθενείς: 29 άντρες και 18 γυναίκες)
- Χρόνια ηπατίτιδα Β (27 ασθενείς: 17 άντρες και 10 γυναίκες)
- Κίρρωση HBV αιτιολογίας (50 ασθενείς: 41 άντρες και 9 γυναίκες)
- Χρόνια ηπατίτιδα C (36 ασθενείς: 22 άντρες και 14 γυναίκες)
- Κίρρωση HCV αιτιολογίας (20 ασθενείς: 12 άντρες και 8 γυναίκες)
- Αλκοολική ηπατοπάθεια χωρίς κίρρωση (26 ασθενείς: 25 άντρες και 1 γυναίκα)
- Κίρρωση αλκοολικής αιτιολογίας (22 ασθενείς: 21 άντρες και 1 γυναίκα)
- ΑΗ (30 ασθενείς: 7 άντρες και 23 γυναίκες)
- ΠΧΚ (35 ασθενείς: 4 άντρες και 31 γυναίκες)
- ΠΣΧ (14 ασθενείς: 12 άντρες και 2 γυναίκες)
- Χολοστατικό σύνδρομο υπό διερεύνηση (3 ασθενείς: όλες γυναίκες)
- NAFLD/NASH (30 ασθενείς: 14 άντρες και 16 γυναίκες)
- Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (5 ασθενείς: όλοι άντρες)
- Διάφορα (7 ασθενείς: 5 άντρες και 2 γυναίκες)

Από τους ασθενείς με ηπατίτιδα Β, 47 ταξινομήθηκαν ως ανενεργοί φορείς ηπατίτιδας Β. Αυτοί είχαν θετικό αντιγόνο επιφανείας (HBsAg; Abbott Laboratories, Wiesbaden, Γερμανία), φυσιολογικές αμινοτρανσφεράσες για τουλάχιστον 12 μήνες προ της συμμετοχής τους στη μελέτη και απουσία «ικνού φορτίου» στον ορό (επίπεδα HBV-DNA κάτω των  $10^5$  copies/ml) με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR; Cobas Amplicor HBV Monitor, Roche; cut off: 200 copies/ml).

Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (n=29) πληρούσαν τα κάτωθι κριτήρια: α) ορολογικά τεκμηριωμένη χρόνια μόλυνση από HBV με θετικό αντιγόνο επιφανείας για τουλάχιστον 6 μήνες προ της συμμετοχής τους στη μελέτη (HBsAg; Abbott Laboratories, Wiesbaden, Γερμανία). β) ενεργό «υικό φορτίο» με επίπεδα HBV-DNA άνω των  $10^5$  copies/ml με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR; Cobas Amplicor HBV Monitor, Roche; cut off: 200 copies/ml). γ) παθολογικά αυξημένα επίπεδα της αλανινοαμινοτρανσφεράσης (ALT) για τουλάχιστον 6 μήνες προ της συμμετοχής τους στη μελέτη, δ) ιστολογικά τεκμηριωμένη χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς κίρρωση.

Η διάγνωση της κίρρωσης HBV αιτιολογίας (n=50) έγινε με βάση τα κριτήρια α), β), γ) που χρησιμοποιήθηκαν παραπάνω και επιπλέον, όπου ήταν απαραίτητο, ιστολογική επιβεβαίωση της κίρρωσης. Από τους ασθενείς με κίρρωση HBV αιτιολογίας είχαν αντιρροπούμενη κίρρωση 45 ασθενείς: (36 άντρες και 9 γυναίκες) και μη αντιρροπούμενη κίρρωση 5 ασθενείς (όλοι άντρες).

Κανένας από τους ασθενείς με ηπατίτιδα Β δεν έφερε αντισώματα έναντι του ιού HCV.

Όλοι οι ασθενείς με ηπατίτιδα C πληρούσαν τα κάτωθι κριτήρια: α) ορολογικά τεκμηριωμένη χρόνια μόλυνση από HCV με ανίχνευση αντισωμάτων αντι-HCV για τουλάχιστον 6 μήνες προ της συμμετοχής τους στη μελέτη, β) ενεργό «υικό φορτίο» με ανίχνευση HCV RNA χρησιμοποιώντας PCR (HCV Monitoring Cobas Amplicor, Roche; cut off; 50 U/ml). Κανένας από τους ασθενείς με ηπατίτιδα C δεν ήταν θετικός για HBsAg. Οι ασθενείς με ηπατίτιδα C ταξινομήθηκαν ανάλογα με τα ιστολογικά τους ευρήματα και την ύπαρξη ή μη σημείων πυλαίας υπέρτασης σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (n=36) και σε ασθενείς με κίρρωση HCV αιτιολογίας (n=20). Από τους ασθενείς με κίρρωση HCV αιτιολογίας είχαν αντιρροπούμενη κίρρωση 19 ασθενείς: (12 άντρες και 7 γυναίκες) και μη αντιρροπούμενη κίρρωση 1 ασθενής: (γυναίκα).

Από τους ασθενείς με κίρρωση αλκοολικής αιτιολογίας είχαν αντιρροπούμενη κίρρωση 8 ασθενείς: (7 άντρες και μια γυναίκα) και μη αντιρροπούμενη κίρρωση 14 ασθενείς: (όλοι άντρες).

Για τη διάγνωση της ΑΗ χρησιμοποιήθηκε ένα απλοποιημένο score των Hennes et al, (2008), το οποίο περιλαμβάνει αυτοαντισώματα, ανοσοσφαιρίνη γ, ιστολογικά ευρήματα και αποκλεισμό ηπατίτιδων ιογενούς αιτιολογίας. Από τους ασθενείς με ΑΗ, 21 είχαν ΑΗ-1 και 6 ΑΗ-2. 12 από τους ασθενείς είχαν αναπτύξει κίρρωση-(μη αντιρροπούμενη: 1 γυναίκα και αντιρροπούμενη: 11 ασθενείς, εκ των οποίων 2 άντρες και 9 γυναίκες). Επιπρόσθετα, ένας άντρας έπασχε από σύνδρομο αλληλεπικάλυσης ΑΗ με ΠΧΚ και ένας άντρας έπασχε από σύνδρομο αλληλεπικάλυσης ΑΗ με ΠΣΧ.

Οι ασθενείς με ΠΧΚ πληρούσαν τα κάτωθι κριτήρια: αυξημένα επίπεδα χολοστατικών ενζύμων, θετική βιοψία ήπατος με περιοχές θετικές για AMA (θετικός τίτλος για αραίωση  $\geq 1:40$ ) με άμεση ανοσοφθορίση σε ιστοτεμάχια τρωκτικών και επιβεβαίωση με ενζυμο-ανοσοαπορρόφησης δοκιμασία (ELISA) με αντισώματα εναντίον της Ε2 υποομάδας της πυρουβικής αφυδρογονάσης. ή των διακλαδισμένων αλυσίδων της αφυδρογονάσης του κετογλουταρικού οξέως και με Western blot



χρησιμοποιώντας μιτοχονδριακά κλάσματα ήπατος αρουραίου (Tsikrikoni et al, 2005). Από τους ασθενείς με ΠΧΚ 4 είχαν αναπτύξει κίρρωση-[μη αντιρροπούμενη: 2 ασθενείς (1 άντρας και 1 γυναίκα) και αντιρροπούμενη: 2 ασθενείς: (2 γυναίκες). Επιπρόσθετα, δυο από τις ασθενείς έπασχαν από πρόιμη ΠΧΚ (έναρξη της νόσου σε νεαρή ηλικία).

Η διάγνωση των ασθενών με ΠΣΧ τέθηκε με βάση βιοχημικά ή κλινικά ευρήματα χολόστασης, συμβατή βιοψία ήπατος, επανειλημμένα αρνητικά AMA με άμεσο ανοσοφθορισμό, Western blot ή ELISA και/ή τυπικά ευρήματα σε μαγνητική χολαγγειοπαγκρεατογραφία (MRCP), παλίνδρομη ενδοσκοπική χολαγγειοπαγκρεατογραφία (ERCP) Από τους ασθενείς με ΠΣΧ μια γυναίκα είχε αναπτύξει μη αντιρροπούμενη κίρρωση.

Οι ασθενείς με ΠΧΚ, με ΠΣΧ και με υπό διερεύνηση χολοστατικό σύνδρομο προσεγγίσθηκαν κατά τη στατιστική ανάλυση συνολικά υπό τον όρο αυτοάνοσα χολοστατικά σύνδρομα.

Σε δυο ασθενείς με αντιρροπούμενη κίρρωση HBV αιτιολογίας έγινε και για δεύτερη φορά η εξέταση και ενώ είχαν μεσολαβήσει 3 χρόνια από την πρώτη.

Όλοι οι ηπατοπαθείς είναι ασθενείς που παρακολουθούνται συστηματικά από το Ηπατολογικό Ιατρείο της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, του οποίου υπεύθυνος είναι ο Διευθυντής Καθηγητής Παθολογίας κ. Γ.Ν. Νταλέκος. Οι ηπατοπαθείς που έλαβαν μέρος στην εξέταση έχουν υποβληθεί, όπου χρειαζόταν, σε βιοψία ήπατος, σε ανοσολογικό έλεγχο για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων στο ερευνητικό εργαστήριο της Παθολογικής Κλινικής, σε ποσοτικό προσδιορισμό HBV-DNA και HCV-RNA στο ερευνητικό εργαστήριο της Παθολογικής Κλινικής και γενικότερα σε κάθε εξέταση που θα μπορούσε να βοηθήσει στη σωστή κατηγοριοποίηση της ηπατοπάθειας. Η Επιτροπή Ερευνών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ήταν ενήμερη για τη μελέτη.

Η κλινική μελέτη διέπεται από τις ηθικές αρχές της διακύρξης του Ελσίνκι και από τους κανόνες «Good Clinical Practice». Όλοι οι συμμετέχοντες έλαβαν μέρος στην κλινική μελέτη με τη συγκατάθεσή τους. Όλοι οι συμμετέχοντες ήταν αρνητικοί για αντι-HIV. Οι ασθενείς που έπασχαν από ηπατοπάθεια αλκοολικής αιτιολογίας απείχαν από κατανάλωση αλκοόλ για τουλάχιστον 3 εβδομάδες.

Επειδή οι ασθενείς, που έπασχαν από ηπατοκυτταρικό καρκίνο ήταν μόνο 5, δε συμπεριλήφθηκαν τελικά στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Για τον ίδιο λόγο, επίσης, δεν τέθηκαν προς ανάλυση οι ασθενείς που τοποθετήθηκαν στην κατηγορία των διαφόρων νοσημάτων (νόσος Wilson, σύνδρομο Gilbert, αιμοχρωμάτωση).

Οι περισσότεροι ασθενείς προσεγγίσθηκαν κατά τη διάρκεια του τακτικού τους ελέγχου στα εξωτερικά ιατρεία του Ηπατολογικού Ιατρείου. Κάποιοι ασθενείς εκλήθησαν σε συνάντηση μετά από τηλεφωνική επικοινωνία.



Σε 12 περιπτώσεις που ο ασθενής δεν ήταν εύκολο να φέρει τα ούρα στο Νοσοκομείο ή στο εργαστήριο η συλλογή των ούρων έγινε από το χώρο διαμονής του.

Επιπρόσθετα, στη μελέτη έχουν συμμετάσχει 165 υγιείς σε κατά το δυνατό αντιστοιχία ηλικίας και φύλου προς τους ασθενείς. Στον αρχικό σχεδιασμό της μελέτης θα περιλαμβανόταν 30 υγιείς-δείγμα σημαντικό στατιστικά. Κατά τη διάρκεια της μελέτης έγινε σαφές ότι έπρεπε να αυξηθεί σημαντικά το δείγμα των υγιών, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση εξωγενών παραγόντων (φύλο, ηλικία, κάπνισμα). Τούτο κρίθηκε απαραίτητο, ώστε να εξασφαλιστεί η ύπαρξη ενός καλά στανταρισμένου και μελετημένου δείγματος υγιών, το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για τη στατιστική ανάλυση των ηπατοπαθών. Οι υγιείς υποβλήθηκαν σε λήψη ιστορικού, αντικειμενική εξέταση και πρόσφατο εργαστηριακό έλεγχο. Ένας αριθμός αυτών των εθελοντών προήλθε από το οικογενειακό, φιλικό και επαγγελματικό περιβάλλον των μελετητών. Μεγάλο ποσοστό των υγιών ήταν συγγενείς α' βαθμού ηπατοπαθών, οι οποίοι ενημερώθηκαν και συμφώνησαν να λάβουν μέρος στη μελέτη.

Δεν έλαβαν μέρος στη μελέτη:

- άτομα με τόπο διαμονής μακριά από το Πανεπιστήμιο, για τους οποίους θα ήταν δυσχερής η επιστροφή του δείγματος ούρων,
- άτομα με χαμηλό διανοητικό ή μορφωτικό επίπεδο, που ίσως δε θα καταλάβαιναν με ακρίβεια το πρωτόκολλο, με συνέπεια τη λανθασμένη εκτέλεση του,
- ασθενείς για τους οποίους δεν είχε γίνει ακόμη πλήρης διερεύνηση και ταξινόμηση της ηπατοπάθειας από την οποία έπασχαν,
- άτομα με επιβαρυνμένη κατάσταση υγείας, για τους οποίους θα ήταν δυσχερής η εφαρμογή του πρωτοκόλλου,
- άτομα με κινητικά προβλήματα,
- άτομα που ελάμβαναν αντιψυχωσική αγωγή,
- άτομα με πολλαπλή φαρμακευτική αγωγή, η οποία θα μπορούσε να αλληλεπιδρά στο μεταβολισμό της καφεΐνης από το ήπαρ,
- ασθενείς με πρόσφατο έμφραγμα, αρρυθμίες ή άλλα σοβαρά καρδιαγγειακά προβλήματα,
- ασθενείς, κυρίως αλκοολικοί, για τους οποίους παρά τις αντίθετες διαβεβαιώσεις, υπήρχαν ενδείξεις για τη μη αποχή τους από το αλκοόλ,
- άτομα με ιστορικό έντονων και πολλαπλών αναφυλακτικών αντιδράσεων,
- άτομα με διαταραχές συμπεριφοράς, που δε θα τους επέτρεπαν τη συμμόρφωση με το πρωτόκολλο,
- άτομα που αρνήθηκαν να υποβληθούν σε φυσική εξέταση και στον απαιτούμενο εργαστηριακό έλεγχο,
- γυναίκες που ελάμβαναν αντισυλληπτικά,

- άτομα με νεφρική ανεπάρκεια.

Δόθηκαν συνολικά 540 κάψουλες καφεΐνης, οι οποίες παρασκευάστηκαν ειδικά για τη μελέτη από ζελατίνη, η οποία δεν περιείχε λακτόζη. Οι κάψουλες περιείχαν 200mg καθαρής καφεΐνης (Fluka, Switzerland).

Όλοι οι συμμετέχοντες:

- προσεγγίσθηκαν με ανθρώπινο ενδιαφέρον (κάποιοι από αυτούς ήταν ιδιαίτερα ταλαιπωρημένοι από τη χρονιότητα, τη φύση ή τη βαρύτητα των υποκείμενων νοσημάτων τους)
- ενημερώθηκαν επαρκώς για το πρωτόκολλο συλλογής ούρων
- ενημερώθηκαν επαρκώς από ποιες τροφές και φαρμακευτικά σκευάσματα πρέπει να απέχουν,
- ενημερώθηκαν επαρκώς για πιθανές παρενέργειες, τυχόν δυσκολίες ή πιθανές επιπλοκές που ενδεχομένως να προέκυπταν,
- συναίνεσαν για τη συμμετοχή τους στη μελέτη,
- στηρίχθηκαν ψυχολογικά καθόλη τη διάρκεια της συμμετοχής τους στη μελέτη (από την αρχική προσέγγιση έως και την ενημέρωση των αποτελεσμάτων)
- είχαν δυνατότητα 24ωρης τηλεφωνικής επικοινωνίας με τον ερευνητή, ώστε να υπάρχει συνεχής συμβουλευτική υποστήριξή τους σε περίπτωση που προέκυπταν απορίες ή και παρενέργειες (επίμονη κεφαλαλγία, δυσανεξία, ταχυκαρδία, αναφυλακτική αντίδραση),
- ενημερώθηκαν για τα αποτελέσματα της μελέτης στην οποία συμμετείχαν σε εύλογο χρονικό διάστημα, όπως άλλωστε τους είχε διαβεβαιωθεί κατά την αρχική προσέγγιση.

Οι πιο συνηθισμένοι λόγοι για τους οποίους κάποιοι από τους συμμετέχοντες δε δέχθηκαν να συμμετέχουν στη μελέτη ήταν:

- γιατί θεωρούσαν πως θα ήταν δύσκολο να προσαρμοστούν στην αποχή καφεΐνης και αλκοόλ (ασθενείς),
- επειδή φοβήθηκαν μήπως παρουσιάσουν ήπιες παρενέργειες από την αποχή από την καφεΐνη, όπως κεφαλαλγία, αίσθημα αδυναμίας και υπνηλία (εθελοντές),
- επειδή φοβήθηκαν τυχόν παρενέργειες ή «δυσάρεστα» αποτελέσματα από τη λήψη κάψουλας,
- επειδή δεν πείστηκαν για τη χρησιμότητα/ ωφελιμότητα και το σκοπό της μελέτης,
- αμέλεια ή αδιαφορία, και τέλος,
- γιατί θα τους ήταν δύσκολο να προσκομίσουν τα δείγματα ούρων.

Η συμμόρφωση και η συμμετοχή στο πρωτόκολλο ήταν μεγαλύτερη σε ασθενείς, από ό,τι σε υγιείς.

Σε όλους τους συμμετέχοντες δόθηκε λίστα με τροφές/ροφήματα που περιέχουν μεθυλοξανθίνες. Μετά από ενημέρωση των ασθενών και των υγιών και έχοντας την έγγραφη συγκατάθεσή τους έγινε συλλογή δειγμάτων ούρων σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

*Ημέρα 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup>:*

- Αποχή από τροφές/ροφήματα που περιέχουν μεθυλοξανθίνες και αιθανόλη.
- Αποχή από οποιαδήποτε φαρμακευτική αγωγή, εφόσον η κατάσταση της υγείας τους το επιτρέπει.

*Ημέρα 3<sup>η</sup>:*

- Κατανάλωση από το στόμα 200mg καφεΐνης με τη μορφή κάψουλας
- Μετά την παρέλευση 6h από τη λήψη της καφεΐνης, συλλογή μεμονωμένου δείγματος ούρων σε πλαστικό ουροσυλλέκτη που τους είχε δοθεί, ο οποίος περιείχε 200μl 6N HCl (ώστε να γίνει οξίνιση του δείγματος των ούρων και να εξασφαλιστεί όσο το δυνατό περισσότερο η σταθερότητα του AFMU μέχρι να ολοκληρωθεί η μεταφορά του δείγματος και η κατάλληλη επεξεργασία των ούρων, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια).
- Άμεση μεταφορά του δείγματος των ούρων στο εργαστήριο ή όταν αυτό δεν ήταν εφικτό, τοποθέτηση των ούρων στο ψυγείο για λίγες ώρες μέχρι η μεταφορά να είναι δυνατή.

Επιπρόσθετα, για τους εξεταζόμενους συμπληρώθηκε δημογραφικό δελτίο, όπου αναγράφονταν:

- ηλικία,
- φύλο,
- βασικά χαρακτηριστικά του ηπατικού νοσήματος: κατηγορία ηπατικής νόσου, έναρξη συμπτωμάτων, λαμβάνουσα θεραπεία,
- συνήθειες και τρόποι ζωής: ενεργητικό κάπνισμα τσιγάρων (σε τι ποσότητα, αν ο εθελοντής κάπνιζε στο παρελθόν τότε έγινε η διακοπή), χρήση αλκοόλ (και σε τι ποσότητα), χρήση ναρκωτικών ουσιών, κατανάλωση κόκκινου κρέατος,
- σε γυναίκες: ηλικία εμμηναρχής και εμμηνόπαυσης,
- σωματικό βάρος,

- ύψος,
- τα αποτελέσματα φυσικής εξέτασης,
- αν ο ασθενής έχει υποβληθεί σε βιοψία και τα αποτελέσματα αυτής

Παράλληλα, οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε λεπτομερή εργαστηριακό έλεγχο που περιελάμβανε:

1. γενική αίματος
2. αμινοτρανσφεράσες
3. ALP
4. γ-GT
5. LDH
6. χολερυθρίνη ολική
7. χολερυθρίνη άμεση
8. χολερυθρίνη έμμεση
9. PT, INR, aPTT
10. ολικά λευκώματα,
11. αλβουμίνη
12. ουρία
13. κρεατινίνη
14. αντι-HIV
15. HBsAg
16. αντι-HCV

Δεκαοχτώ από τους συμμετέχοντες ανέφεραν κεφαλαλγία κατά τη 48ωρη αποχή από την καφεΐνη. Από αυτούς οι 12 ήταν εθελοντές (7,27% των εθελοντών) και 6 ασθενείς (1,75% των ασθενών). 3 από αυτούς (όλοι υγιείς) διέκοψαν τη μελέτη (1,82% των εθελοντών). Όλοι οι παραπάνω κατανάλωναν τουλάχιστον «δυο καφέδες» σε ημερήσια βάση. Τα παραπάνω συμπτώματα αποδόθηκαν σε στερητικά σωματικά συμπτώματα μετά από χρόνια κατανάλωση καφεΐνης.

Έξι από τους συμμετέχοντες ανέφεραν αίσθημα παλμών και «αίσθημα ταραχής» τις επόμενες 12 ώρες μετά τη λήψη καφεΐνης από το στόμα. Από αυτούς εθελοντές ήταν 2 (1,21% των εθελοντών) και 4 ήταν ασθενείς (1,17% των ασθενών). Όλοι οι παραπάνω κατανάλωναν «το πολύ ένα καφέ τη μέρα». Τα παραπάνω συμπτώματα αποδόθηκαν σε παρενέργειες από την καφεΐνη.

Μια συμμετέχουσα ασθενής (0.61% των ασθενών) ανέφερε ναυτία και εμέτους που την οδήγησαν να εξετασθεί στα επείγοντα περιστατικά νοσοκομείου της περιοχής. Στην ασθενή δόθηκαν πρώτες βοήθειες και οδηγίες. Τα κλινικά συμπτώματα αποδόθηκαν σε «δυσανεξία». Η ασθενής δεν ολοκλήρωσε τη μελέτη.

Δεν αναφέρθηκε επεισόδιο αύξησης της αρτηριακής πίεσης.

Στους υπόλοιπους συμμετέχοντες η κάψουλα καφεΐνης ήταν καλά ανεκτή.

Συνολικά, ανεπιθύμητες ενέργειες αναφέρθηκαν σε 14 εθελοντές (8,48%) και 11 ασθενείς (3,22%). Επί του συνόλου των συμμετεχόντων στη μελέτη ανεπιθύμητες ενέργειες παρουσιάστηκαν σε ποσοστό 4,93% (25/505). Διέκοψαν τη μελέτη λόγω των ανεπιθύμητων ενεργειών 4, ποσοστό 0,79% (4/509- 505 οι τελικοί συμμετέχοντες και 4 που διέκοψαν τη μελέτη).

Κατά τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων εξαιρέθηκαν 6 δείγματα, στα οποία οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών καφεΐνης βρέθηκαν εξαιρετικά μικρές και τέθηκε υπό αμφισβήτηση η σωστή συμμόρφωση με το πρωτόκολλο. Επιπρόσθετα, από τη στατιστική επεξεργασία και ανάλυση εξαιρέθηκαν: Ένα δείγμα γιατί ενώ, όταν προσεγγίσθηκε ο ασθενής θεωρήθηκε ότι ανήκε στην αλκοολική ηπατοπάθεια χωρίς κίρρωση, κατόπιν σταμάτησε την παρακολούθηση στα Τακτικά Εξωτερικά Ιατρεία και δεν προσκόμισε πρόσφατο εργαστηριακό έλεγχο. Ένας ασθενής με τρανσαμινασαιμία και αρχικά θεωρούμενη αλκοολική ηπατοπάθεια χωρίς κίρρωση, του οποίου όμως κατά την παρακολούθηση οι εργαστηριακές του τιμές επανήλθαν σε φυσιολογικά όρια και τελικά η τρανσαμινασαιμία αποδόθηκε σε φαρμακευτική αιτιολογία, καθώς και ένας ασθενής με ανενεργό ηπατίτιδα Β και καρκίνο στομάχου, λόγω του φόβου πως τα φάρμακα που ελάμβανε χρονίως λόγω της υποκείμενης νόσου θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα του CYP1A2.

Το δημογραφικό προφίλ των ασθενών και των υγιών που συμμετείχαν στη μελέτη φαίνονται στους πίνακες 1,2,3 που ακολουθούν:

**Πίνακας 1.** Δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των υγιών που συμμετείχαν στην κλινική μελέτη.

AH: αυτοάνοση ηπατίτιδα

AXHN: αυτοάνοσα χολοστατικά ηπατικά νοσήματα

NAFLD/ NASH: μη αλκοολική λιπώδης διήθηση ήπατος/ στεατοηπατίτιδα

	Αριθμός Ατόμων	Φύλο(Α/Γ)	Ηλικία MT±TA	BMI (kg/m <sup>2</sup> ) MT±TA	Μη καπνιστές/ καπνιστές
<b>Υγιείς</b>	165	82/83	45,5±14,6	25,8±3,8	113/52
<b>HBV κίρρωση</b>	50	41/9	59,9±9,3	26,8±4,5	42/8
<b>Χρόνια ηπατίτιδα Β</b>	27	17/10	52,6±13,9	26,6±4,6	19/8
<b>Ανενεργοί φορείς HBV</b>	47	29/18	50,8±12,1	27,3±3,2	30/17
<b>HCV κίρρωση</b>	20	12/8	57,3±14,8	25,9±4,8	14/6
<b>Χρόνια ηπατίτιδα C</b>	36	22/14	45,0±14,4	25,4±3,7	17/19
<b>Αλκοολική κίρρωση</b>	22	21/1	60,2±10,6	27,0±3,6	10/12
<b>Αλκοολική ηπατοπάθεια χωρίς κίρρωση</b>	26	25/1	49,4±11,8	27,1±3,8	11/15
<b>AXHN</b>	52	16/36	53,3±11,9	26,4±3,7	39/13
<b>AH</b>	30	7/23	56,6±14,7	26,3±3,7	27/3
<b>NAFLD/NASH</b>	30	14/16	45,9±11,6	27,8±3,7	22/8
<b>Σύνολο ασθενών</b>	<b>340</b>	<b>204/136</b>	<b>53,2±13,3</b>	<b>26,5±3,8</b>	<b>231/109</b>

**Πίνακας 2.** Δημογραφικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών που συμμετείχαν στην κλινική μελέτη.

	ΗΑΙΚΙΑ (Μέση τιμή ±SD)	ΦΥΛΟ (άντρες/γυναί κες)	Μη καπνιστές/ καπνιστές	INR	ΛΕΥΚΩ MATINH	ΟΛΙΚ Η ΧΟΛΕΡΥΘ PINH	HGB	WBC	PLT	UREA	ΟΑ ΙΚΑ ΛΕΥΚΩ ΜΑΤΑ	AS T	AL T	AL P	γ-GT
Φυσιολογικές Τιμές				0.8- 1.26	3.5-5.2 gr	≤ 1.00 mg/dl	13- 16.5gr/dl	4500- 10500/mm <sup>3</sup>	140- 450 x10 <sup>3</sup> /ml	15-50 mg/dl	6.4- 8.3 g/ml	≤37 IU/l	≤40 IU/l	35- 104 IU/l	9-35 IU/l
ΑΝΕΝΕΡΓΟΙ ΦΟΡΕΙΣ HBV (n=47)	50.8 ± 12.1	29/18	30/17	1.00 ± 0.06	4.44 ± 0.35	0.69 ± 0.40	14.3 ± 1.3	6649 ± 1625	233 ± 54	33.7 ± 11.9	7.3 ± 0.5	24 ± 6	26 ± 10	± 88	29 ± 46
ΧΡΟΝΙΑ HBV (n=27)	52,6±13,9	17/10	19/8	1.07 ± 0.15	4.46 ± 0.49	0.83 ± 0.38	13.8 ± 1.4	6023 ± 1586	197 ± 43	34.6 ± 9.1	7.5 ± 0.7	36 ± 18	45 ± 40	± 117 ± 53	20 ± 16
HBV ΚΙΡΡΩΣΗ (n=50)	59.9 ± 9.3	41/9	42/8	1.24 ± 0.24	4.02 ± 0.56	1.06 ± 0.88	13.7 ± 1.6	5170 ± 1507	159 ± 102	38.1 ± 11.1	7.5 ± 0.6	59 ± 105	68 ± 120	± 122 ± 72	40 ± 35
ΣΥΝΟΛΟ HBV (n=124)	55.2 ± 12.4	87/38	91/33	1.13 ± 0.20	4.27 ± 0.53	0.89 ± 0.67	13.9 ± 1.5	5924 ± 1690	196 ± 82	35.8 ± 11.1	7.4 ± 0.6	41 ± 68	47 ± 80	± 120 ± 74	32 ± 37
ΧΡΟΝΙΑ HCV (n=36)	45.9 ± 15.8	22/14	17/19	1.04 ± 0.09	4.40 ± 0.46	0.86 ± 0.60	13.7 ± 2.1	6192 ± 1961	225 ± 56	31.4 ± 9.3	7.6 ± 0.7	38 ± 34	49 ± 41	± 109 ± 61	36 ± 27
HCV ΚΙΡΡΩΣΗ (n=20)	57.4 ± 14.8	12/8	14/6	1.10 ± 0.07	4.03 ± 0.43	1.29 ± 0.71	12.5 ± 1.7	5840 ± 2470	188 ± 110	34.3 ± 11.2	7.6 ± 0.5	50 ± 22	58 ± 31	± 131 ± 59	74 ± 73
ΣΥΝΟΛΟ HCV (n=56)	49.4 ± 15.6	34/22	31/25	1.06 ± 0.09	4.20 ± 0.45	1.02 ± 0.64	13.3 ± 2.1	6074 ± 2069	216 ± 83	32.6 ± 9.9	7.6 ± 0.6	43 ± 30	51 ± 34	± 117 ± 55	49 ± 52
ΑΗ (n=30)	56.6 ± 14.7	7/23	27/3	1.10 ± 0.20	4.35 ± 0.70	0.89 ± 0.49	13.3 ± 1.6	6385 ± 1858	212 ± 87	33.9 ± 9.5	7.6 ± 0.7	37 ± 26	43 ± 39	± 131 ± 76	34 ± 23
ΑΗ ΧΩΡΙΣ ΚΙΡΡΩΣΗ (n=18)	52.5 ±14.7	5/13	16/2	1.10 ± 0.15	4.50 ± 0.50	0.76 ± 0.44	13.3 ± 1.7	6318 ± 1706	237 ± 78	35.8 ± 10.1	7.5 ± 0.5	32 ± 14	38 ± 27	± 106 ± 54	28 ± 13
ΠΧΚ (n=35)	57.2 ± 10.5	4/31	29/6	1.10 ± 0.20	4.30 ± 0.50	0.73 ± 0.50	13.4 ± 1.3	6264 ± 2230	238± 73	32.8 ± 7.6	7.6 ± 0.7	29 ± 15	33 ± 20	± 183 ± 88	53 ± 59
ΠΧΚ ΧΩΡΙΣ ΚΙΡΡΩΣΗ (n=31)	56.7 ± 10.6	3/28	26/5	1.05 ± 0.13	4.30 ± 0.50	0.62 ± 0.20	13.4 ± 1.4	6386 ± 2207	249 ± 67	32.0 ± 7.5	7.6 ± 0.7	27 ± 9	33 ± 20	± 180 ± 91	53 ± 58
ΠΣΧ (n=14)	43.6 ± 11.1	12/2	7/7	1.02 ± 0.06	4.50 ± 0.40	0.97± 0.30	14.5 ± 1.7	6783 ± 1919	214 ± 73	34.1 ± 7.7	7.5 ± 0.5	28 ± 12	41 ± 24	± 195 ± 155	113 ± 86
ΑΧΗΝ (n=52)	53.3 ± 11.9	16/36	39/13	1.07 ± 0.18	4.32 ± 0.50	0.81 ± 0.44	13.6 ± 1.5	6436 ± 2095	235± 77	32.4 ± 8.9	7.6 ± 0.6	29 ± 14	35 ± 21	± 183 ± 110	69 ± 71
NAFLD/ NASH (n=30)	45.9 ± 11.6	14/16	22/8	1.01 ± 0.08	4.59 ± 0.39	0.75 ± 0.38	13.8 ± 1.2	6919 ± 1700	243 ± 40	34.0 ± 9.0	7.5 ± 0.6	31 ± 12	50 ± 25	± 128 ± 59	55 ± 77
ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΑ ΧΩΡΙΣ ΚΙΡΡΩΣΗ (n =26)	49.4 ± 11.8	25/1	11/15	1.01 ± 0.10	4.53 ± 0.45	0.78 ± 0.34	14.6 ± 1.4	5965± 1149	223± 58	34.0 ± 4.7	7.4 ± 0.5	27 ± 10	40 ± 22	± 102 ± 48	36 ± 23
ΚΙΡΡΩΣΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ (n=22)	60.2 ± 10.6	21/1	10/12	1.12 ± 0.15	3.76 ± 0.91	1.69 ± 1.36	13.1 ± 1.8	5969 ± 1604	142 ± 40	38.0 ± 22.0	7.3 ± 1.4	44 ± 22	34 ± 18	± 137 ± 89	57 ± 38
ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΑΣ (n=48)	53.5 ± 12.4	46/2	21/27	1.07± 0.13	4.14 ± 0.82	1.22 ± 1.08	13.8 ± 1.8	5967 ± 1389	180 ± 64	36.0 ± 16.0	7.4 ± 1.0	35 ± 19	37 ± 20	± 119 ± 73	47 ± 33
ΚΙΡΡΩΣΗ ΑΝΤΙΡΡΟΠΟΥΜΕΝΗ (n=85)	59.3 ± 11.3	57/28	68/17	1.17 ± 0.21	4.08 ± 0.58	1.10 ± 0.80	13.4 ± 1.7	5653 ± 1970	170 ± 98	35.0 ± 11.0	7.6 ± 0.6	54 ± 82	62 ± 95	± 136 ± 74	45 ± 45
ΚΙΡΡΩΣΗ ΜΗ ΑΝΤΙΡΡΟΠΟΥΜΕΝΗ (n=24)	60.2 ± 11.5	20/4	12/12	1.24 ± 0.25	3.66 ± 0.88	1.82 ± 1.29	13.1 ± 1.6	5720 ± 1940	135 ± 63	41.0 ± 21.0	7.1 ± 1.3	46 ± 25	35 ± 15	± 155 ±135	69 ± 50
ΣΥΝΟΛΟ ΚΙΡΡΩΤΙΚΩΝ (n=109)	59.5 ± 11.3	77/32	80/29	1.19 ± 0.22	3.98 ± 0.67	1.26 ± 0.96	13.3 ± 1.7	5667 ± 1954	162± 92	37.0 ± 14.0	7.5 ± 0.8	52 ± 73	56 ± 85	± 140 ± 90	51 ± 47
ΣΥΝΟΛΟ ΜΗ ΚΙΡΡΩΤΙΚΩΝ (n=231)	50.1 ± 13.1	127/104	151/80	1.04 ± 0.11	4.44 ± 0.41	0.77 ± 0.40	13.9 ± 1.6	6401 ± 1703	230± 59	33.3 ± 9.4	7.5 ± 0.6	30 ± 17	39 ± 28	± 128 ± 74	42 ± 52
ΙΟΓΕΝΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ (n=180)	48.5 ± 13.7	121/59	122/58	1.00± 0.20	4.80 ± 0.50	0.70 ± 0.70	12.5 ± 1.7	5230 ± 1810	308 ± 83	35.0 ± 10.8	8.1 ± 0.6	26 ± 59	58 ± 69	± 148 ± 69	43 ± 43
ΜΗ ΙΟΓΕΝΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ (n=160)	52.9 ± 13.0	83/77	109/51	1.07 ± 0.16	4.33 ± 0.63	0.94 ± 0.71	13.7 ± 1.5	6388 ± 810	217 ± 74	34.0 ± 11.3	7.5 ± 0.8	33 ± 18	40 ± 26	± 144 ± 89	53 ± 58
ΜΗ ΚΙΡΡΩΤΙΚΟΙ ΜΕ «ΕΝΕΡΓΟ» ΝΟΣΟ (n=184)	50.3 ± 13.5	98/86	121/67	1.05 ± 0.12	4.44 ± 0.57	0.79 ± 0.40	13.8 ± 1.7	6336 ± 1739	230± 61	33.3 ± 8.7	7.5 ± 0.6	32 ± 19	43 ± 30	± 130 ± 70	46 ± 54
ΣΥΝΟΛΟ (n=340)	53.1 ± 13.3	204/136	231/109	1,09 ± 0,17	4,29 ± 0,57	0,93 ± 0,68	13,7 ± 1,6	6161± 1819	209 ± 79	34,4 ± 11,0	7,5 ± 0,7	37 ± 45	44 ± 54	± 131 ± 79	45 ± 51



## 2.2. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΟΥΡΩΝ-ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ (HPLC)

Ο διαχωρισμός της καφεΐνης και 14 από τους κύριους και δευτερεύοντες μεταβολίτες της έγινε με χρωματογραφία υψηλής πίεσης ανάστροφης φάσης.

Το πρωτόκολλο κατεργασίας των δειγμάτων ούρων περιελάμβανε:

- Οξίνιση δείγματος ούρων με 1N HCL, ( $\text{pH} \approx 3,5$ )
- Αποθήκευση δείγματος στους  $-20^\circ\text{C}$
- Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με 250mg θειικό αμμώνιο σε 200μl ούρων
- Προσθήκη 20μl εσωτερικού προτύπου + 200μl οξικού οξέος 0.1%
- Εκχύλιση με 6 ml χλωροφόρμιο/ ισοπροπανόλη (85/15, v/v)
- Vortex για 30 sec
- Φυγοκέντρωση σε 5000 στροφές για 2 min
- Διαχωρισμός οργανικής και υδατικής φάσης σε διαχωριστική χοάνη
- Εξάτμιση οργανικής φάσης σε ήπιο ρεύμα  $\text{N}_2$   $45^\circ\text{C}$
- Επαναδιάλυση ξηρού υπολείμματος με 200μl οξικό οξύ 0,05%

Η οξίνιση δείγματος ούρων με 1N HCL έγινε, γιατί, όπως ήδη έχει αναφερθεί, ο μεταβολίτης AFMU είναι ένα μόριο ασταθές που αποβάλλει τη φορμυλοομάδα προς AAMU. Η αποβολή επιταχύνεται σε ουδέτερο ή αλκαλικό περιβάλλον και επιβραδύνεται σε όξινο περιβάλλον, σε παγωμένα ούρα και σε στερεά μορφή.

Για τη χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν στήλη χρωματογραφίας Kromasil 100 και ανιχνευτής υπεριώδους/ορατού FASMA 500 με μήκος κύματος  $\lambda=280\text{nm}$  (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη).

Για το διαχωρισμό της καφεΐνης και των μεταβολιτών της χρησιμοποιήθηκαν 2 κινητές φάσεις.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των 4 μεταβολιτών της καφεΐνης έγινε με τη χρήση πρότυπης καμπύλης για κάθε ένα μεταβολίτη ξεχωριστά. Η πρότυπη καμπύλη συσχετίζει το λόγο του ύψους της κορυφής κάθε μεταβολίτη προς το ύψος της κορυφής του εσωτερικού προτύπου με τη συγκέντρωση.

Τα πρότυπα διαλύματα (stock solutions) συγκεντρώσεως 2mM παρασκευάστηκαν μετά από ζύγισμα των προτύπων ουσιών και διαλυτοποίησής τους (Begas et al, 2007), όπως αναφέρεται παρακάτω:

- 17U σε 2,5mM NaOH (Nyeki et al, 2001)
- 1X, 1U σε 5mM NaOH (Nyeki et al, 2001)
- AFMU σε υπερκαθαρό νερό
- 4-ακεταμιδοφαινόλη 10 mM σε υπερκαθαρό νερό, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο.

Όλα τα πρότυπα διαλύματα φυλάχθηκαν στους 4°C, εκτός από τα πρότυπα διαλύματα των AFMU και 13U, τα οποία φυλάχθηκαν στους -20°C.

Προκειμένου να γίνει ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών: AFMU, 1U, 1X και 17U της καφεΐνης στα ούρα, παρασκευάστηκαν πρότυπα μίγματα 500μM των 4 ουσιών από τα αρχικά πρότυπα (stock) διαλύματα. Τα μίγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία κατάλληλων προτύπων διαλυμάτων βαθμονόμησης (calibration) με ανάμιξη με ούρα ατόμου που απείχε από μεθυλοξανθίνες και φάρμακα για 10 ημέρες. Τα ούρα αυτά υποβλήθηκαν στο πρωτόκολλο κατεργασίας των δειγμάτων ούρων, με τη διαφορά ότι αντί για πρότυπα μίγματα των 4 μεταβολιτών προστίθενται 200 μl υπερκαθαρού ύδατος.

Η διαδικασία της υγρής εκχύλισης και ο χρωματογραφικός διαχωρισμός έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20-25°C). Η ταχύτητα ροής και η διαδοχική σειρά των κινητών φάσεων ρυθμίστηκαν χειροκίνητα. Το μήκος κύματος του ανιχνευτή τοποθετήθηκε στα 280 nm. Η πίεση κυμάνθηκε από 1200 έως 2100 psi.

Η ταυτοποίηση της σειράς έκλουσης των ουσιών μετά το χρωματογραφικό προσδιορισμό τους έγινε με καταγραφή του χρόνου κατακράτησής τους.

## 2.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρησιμοποίηση του προγράμματος SPSS program package, έκδοση 9.0. Οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης εκφράστηκαν σε μέσες τιμές και εύρος. Οι συγκρίσεις μεταξύ υγιών και των ομάδων των ηπατοπαθών έγιναν με Kruskal-Wallis test και κατόπιν οι συγκρίσεις ανά δυο με Mann-Whitney U test. Σημαντική στατιστικά διαφορά θεωρούνταν, όταν  $p$  value < 0.05.

**Πίνακας 3.** Κιρρωτικοί ασθενείς με διαφορετικής αιτιολογίας ηπατοπάθεια

	ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ				
<b>ΣΥΝΟΛΟ ΑΣΘΕΝΩΝ</b> Μη Καπνιστές/ Καπνιστές	91/33	31/25	27/3	39/13	21/27
<b>ΚΙΡΡΩΣΗ</b>	<b>HBV</b>	<b>HCV</b>	<b>ΑΗ</b>	<b>ΑΧΗΝ</b>	<b>ΑΛΚΟΟΛ</b>
<b>ΑΝΤΙΡΡΟΠΟΥΜΕΝΗ</b> Μη Καπνιστές/ Καπνιστές	45 37/8	19 13/6	11 10/1	3 2/1	8 6/2
<b>ΜΗ</b> <b>ΑΝΤΙΡΡΟΠΟΥΜΕΝΗ</b> Μη Καπνιστές/ Καπνιστές	5 5/0	1 1/0	1 1/0	2 1/1	14 4/10
<b>ΣΥΝΟΛΟ ΚΙΡΡΩΤΙΚΩΝ</b> Μη Καπνιστές/ Καπνιστές	50 42/8	20 14/6	12 11/1	5 3/2	22 10/12

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τη βιβλιογραφία είναι αποδεκτό πως η επίδραση των εξωγενών παραγόντων του φύλου, της ηλικίας και του δείκτη σωματικής μάζας στη δραστηριότητα του CYP1A2 των υγιών Καυκάσιων δεν είναι σημαντική. Για το λόγο αυτό δε θα λάβουμε υπόψη τους εξωγενείς αυτούς παράγοντες κατά τη στατιστική ανάλυση. Αντιθέτως, η επαγωγική επίδραση του καπνίσματος είναι γνωστή από τις πρώτες βιβλιογραφικές αναφορές. Φαίνεται πως το κάπνισμα και ουσίες που εμπεριέχονται στον καπνό του επάγουν σημαντικά τη δραστηριότητα του CYP1A2.

Ο μεταβολικός λόγος της καφεΐνης (caffeine metabolic ratio-CMR) ήταν σημαντικά χαμηλότερος στο σύνολο των ηπατοπαθών σε σχέση με τους υγιείς. Εντούτοις, επειδή το κάπνισμα, όπως αναφέραμε, επάγει σημαντικά τη δραστηριότητα του CYP1A2, για την περαιτέρω στατιστική ανάλυση χωρίσαμε τους συμμετέχοντες σε δυο μεγάλες κατηγορίες: **καπνιστές** και **μη καπνιστές**.

**Πίνακας 4.** Οι τιμές των μεταβολικών λόγων CMR των ασθενών με ηπατοπάθεια ιογενούς αιτιολογίας, όπου CMR: οι τιμές των μεταβολικών λόγων καφεΐνης (Caffeine Metabolic Ratio)

ΙΟΓΕΝΟΥΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΕΣ							
		Μη καπνιστές			Καπνιστές		
		Ενδιάμεσος	Εύρος	N	Ενδιάμεσος	Εύρος	N
<b>Υγιείς εθελοντές</b>		<b>3,36</b>	2,17-5,80	113	5,48	2,18-11,15	52
<b>Ιογενής ηπατίτιδα</b>	<b>Σύνολο</b>	2,67	1,20-5,13	122	5,19	2,22-12,45	58
	Μη κίρρωτικοί	2,84	1,52-5,13	66	5,52	2,59-12,45	44
	Κίρρωτικοί	2,36	1,20-4,84	56	4,71	2,22-7,70	14
<b>HBV</b>	<b>Σύνολο</b>	2,71	1,23-5,13	91	5,10	2,59-9,88	33
	Ανενεργοί φορείς	2,78	1,68-5,13	30	5,98	2,59-9,88	17
	Χρόνιοι	2,93	1,55-4,68	19	4,97	2,82-6,00	8
	Κίρρωτικοί	2,49	1,23-4,84	42	4,96	3,73-7,46	8
<b>HCV</b>	<b>Σύνολο</b>	2,23	1,20-4,81	31	5,57	2,22-12,45	25
	Χρόνιοι	2,86	1,52-4,81	17	6,01	2,61-12,45	19
	Κίρρωτικοί	1,93	1,20-3,06	14	3,60	2,22-7,70	6

Αρχικά οι ασθενείς διακρίθηκαν ανάλογα με την αιτιολογία της νόσου σε ασθενείς με **ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθειες και σε ασθενείς με **μη ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθειες.

Οι **ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθειες** διακρίθηκαν ανάλογα με τη «βαρύτητα» σε ανενεργό ηπατίτιδα Β, χρόνια ηπατίτιδα Β, κίρρωση HBV αιτιολογίας, χρόνια ηπατίτιδα C, κίρρωση HCV αιτιολογίας.

Στον Πίνακα 4 αναγράφονται οι τιμές των μεταβολικών λόγων CMR των ασθενών με ηπατοπάθεια ιογενούς αιτιολογίας.

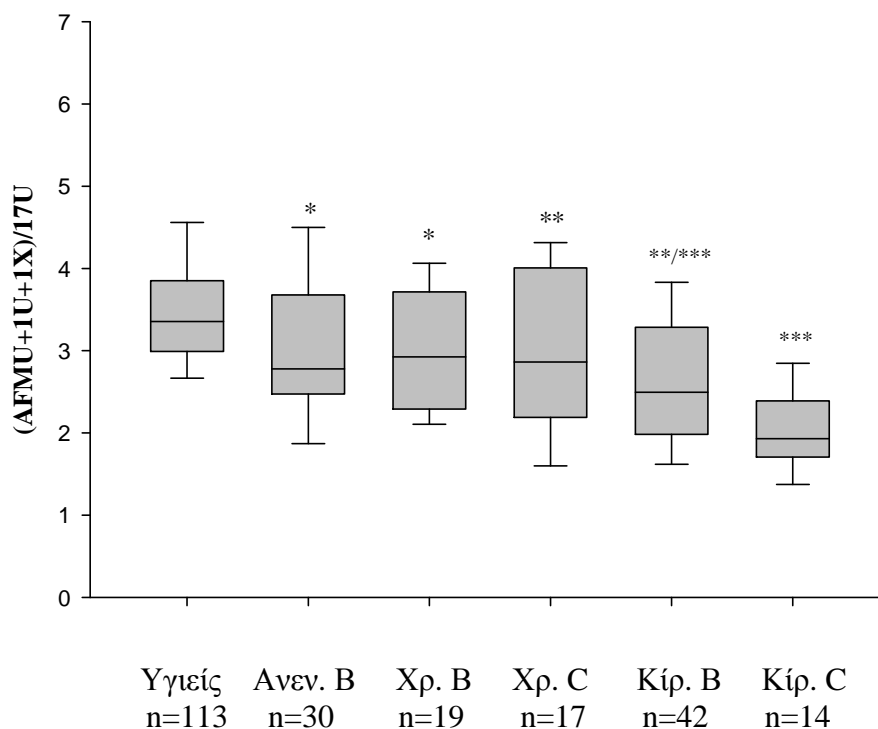
Στις **ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθειες στους **μη καπνιστές** η ανάλυση Kruskal-Wallis μεταξύ του δείγματος των υγιών, των ασθενών με ανενεργό ηπατίτιδα Β, με χρόνια ηπατίτιδα Β, με κίρρωση HBV αιτιολογίας, με χρόνια ηπατίτιδα C, με κίρρωση HCV αιτιολογίας είναι  $p \leq 0.001$  (σχήμα 1 και 2). Επομένως, υπάρχουν διαφορές και άρα έγινε περαιτέρω ανάλυση Mann-Whitney στις επιμέρους ομάδες.

Στατιστικά σημαντικές μεταβολές των μεταβολικών λόγων CMR αναδεικνύονται:

- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με ανενεργό ηπατίτιδα Β, ( $p=0.016$ )
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β, ( $p=0.020$ )
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με κίρρωση HBV αιτιολογίας, ( $p \leq 0.001$ )
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με κίρρωση HCV αιτιολογίας, ( $p \leq 0.001$ )
- μεταξύ των ασθενών με ανενεργό ηπατίτιδα Β και των ασθενών με κίρρωση HBV αιτιολογίας, ( $p=0.030$ )
- μεταξύ των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C και των ασθενών με κίρρωση HCV αιτιολογίας, ( $p=0.007$ )
- μεταξύ των ασθενών με κίρρωση HBV αιτιολογίας και των ασθενών με κίρρωση HCV αιτιολογίας ( $p=0.008$ ).

Δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές μεταβολές των μεταβολικών λόγων CMR:

- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C, ( $p=0.075$ )
- μεταξύ των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα B και των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C, ( $p=1.00$ )
- μεταξύ των ασθενών με ανενεργό ηπατίτιδα B και των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα B, ( $p=0.862$ )
- μεταξύ των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα B και των ασθενών με κίρρωση HBV αιτιολογίας, ( $p=0.110$ ).



**Σχήμα 1.** Επίδραση ηπατοπάθειας στο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U στους μη καπνιστές ιογενούς αιτιολογίας, όπου:

\*  $p<0,05$

α) μεταξύ Ανενεργών B και υγιών

β) μεταξύ Χρονίων B και υγιών

γ) μεταξύ Ανενεργών B και Κιρρωτικών B

\*\*  $p<0,01$

α) μεταξύ Χρονίων C και Κιρρωτικών C

β) μεταξύ Κιρρωτικών B και Κιρρωτικών C

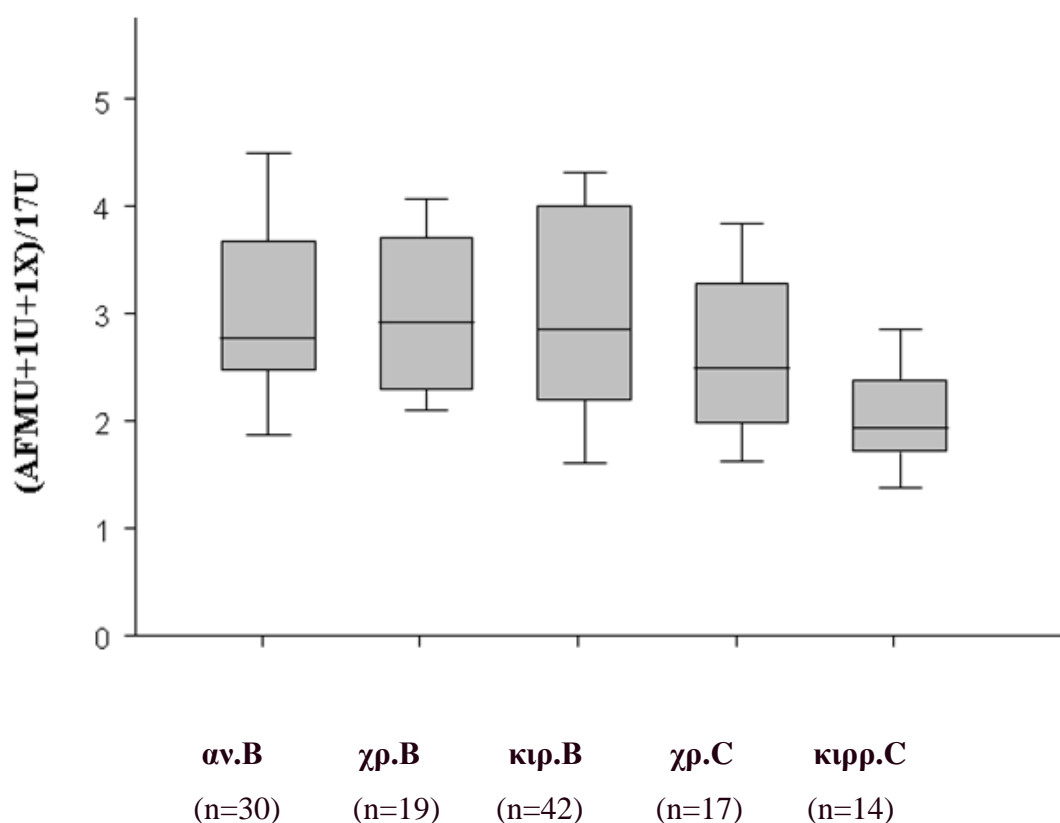
\*\*\*  $p\leq 0,001$

α) μεταξύ Κιρρωτικών B και υγιών

β) μεταξύ Κιρρωτικών C και υγιών

Στην ίδια κατηγορία (ιογενούς αιτιολογίας ηπατίτιδες-μη καπνιστές) η ανάλυση Kruskal-Wallis μεταξύ του δείγματος των υγιών, του συνόλου των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας και του συνόλου των ασθενών με ηπατοπάθεια HCV αιτιολογίας είναι  $p \leq 0.001$ . Επομένως, υπάρχουν διαφορές και έγινε περαιτέρω ανάλυση Mann-Whitney στις επιμέρους ομάδες, οπότε και αναδεικνύονται σημαντικές στατιστικά μεταβολές των μεταβολικών λόγων CMR:

- μεταξύ των υγιών και του συνόλου των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας, ( $p \leq 0.001$ )
- μεταξύ των υγιών και του συνόλου των ασθενών με ηπατοπάθεια HCV αιτιολογίας, ( $p \leq 0.001$ ).



**Σχήμα 2.** Επίδραση ηπατοπάθειας στο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U στους μη καπνιστές ιογενούς αιτιολογίας ανάλογα με αιτιολογία

\*  $p \leq 0.05$  μεταξύ αν.Β και κirr. Β



\$  $p \leq 0.05$  μεταξύ χρ. C και κίρρ. C

%  $p \leq 0.05$  μεταξύ κίρρ. B και κίρρ. C

Δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR μεταξύ του συνόλου των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας και του συνόλου των ασθενών με ηπατοπάθεια HCV αιτιολογίας, ( $p=0.054$ ).

Επιπρόσθετα, στην ίδια κατηγορία (ιογενούς αιτιολογίας ηπατίτιδες-μη καπνιστές) η ανάλυση Kruskal-Wallis μεταξύ του δείγματος των υγιών, του συνόλου των κίρρωτικών ασθενών και του συνόλου των μη κίρρωτικών ασθενών είναι  $p \leq 0.001$ . Επομένως, και εδώ υπάρχουν διαφορές και έγινε περαιτέρω ανάλυση Mann-Whitney στις επιμέρους ομάδες, οπότε και αναδεικνύονται σημαντικές στατιστικά μεταβολές των μεταβολικών λόγων CMR:

- μεταξύ των υγιών και του συνόλου των ασθενών με κίρρωση ιογενούς αιτιολογίας, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των υγιών και του συνόλου των ασθενών με ηπατοπάθεια ιογενούς αιτιολογίας χωρίς κίρρωση, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των υγιών και του συνόλου των ασθενών με ηπατοπάθεια ιογενούς αιτιολογίας, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ του συνόλου των ασθενών με κίρρωση και του συνόλου των ασθενών χωρίς κίρρωση ιογενούς αιτιολογίας, ( $p \leq 0.001$ ),

Στις **ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθειες στους **καπνιστές** η ανάλυση Kruskal-Wallis μεταξύ του δείγματος των υγιών, των ασθενών με ανενεργό ηπατίτιδα B, με χρόνια ηπατίτιδα B, με κίρρωση HBV αιτιολογίας, με χρόνια ηπατίτιδα C, με κίρρωση HCV αιτιολογίας είναι  $p=0.169$ . Επομένως, δεν υπάρχουν επιμέρους διαφορές. Επίσης, η ανάλυση Kruskal-Wallis μεταξύ του δείγματος των υγιών, του συνόλου των κίρρωτικών ασθενών και του συνόλου των μη κίρρωτικών ασθενών είναι  $p=0.338$ . Επομένως, ούτε εδώ αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR. Με ανάλυση Mann-Whitney μεταξύ του δείγματος των υγιών και του συνόλου των ασθενών με ηπατοπάθεια ιογενούς αιτιολογίας  $p=0.717$ . Επομένως, ούτε εδώ αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική διαφορά.

Μεταξύ **καπνιστών και μη καπνιστών** στις **ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθειες με ανάλυση Mann-Whitney αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλες τις επιμέρους συγκρίσεις. Πιο αναλυτικά:

- στους υγιείς, ( $p \leq 0.001$ ),
- στο σύνολο των ασθενών με ηπατοπάθεια ιογενούς αιτιολογίας χωρίς κίρρωση, ( $p \leq 0.001$ ),
- στο σύνολο των ασθενών με ηπατοπάθεια ιογενούς αιτιολογίας, ( $p \leq 0.001$ ),
- στο σύνολο των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας, ( $p \leq 0.001$ ),
- στους ασθενείς με ανενεργό ηπατίτιδα B, ( $p \leq 0.001$ ),
- στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B, ( $p = 0.002$ ),
- στους ασθενείς με κίρρωση HBV αιτιολογίας, ( $p \leq 0.001$ ),
- στο σύνολο των ασθενών με ηπατοπάθεια HCV αιτιολογίας, ( $p \leq 0.001$ ),
- στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, ( $p \leq 0.001$ ),
- στους ασθενείς με κίρρωση HCV αιτιολογίας, ( $p = 0.003$ ).

Οι μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθειες διακρίθηκαν σε ασθενείς με αλκοολική ηπατίτιδα, σε ασθενείς με ΑΗ, σε ασθενείς με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο, σε ασθενείς με στεατοηπατίτιδα μη αλκοολικής αιτιολογίας. Οι ασθενείς με αλκοολική ηπατίτιδα διακρίθηκαν περαιτέρω σε ασθενείς με αλκοολική ηπατίτιδα χωρίς κίρρωση και σε ασθενείς με κίρρωση αλκοολικής αιτιολογίας. Οι ασθενείς με ΑΗ διακρίθηκαν σε ασθενείς χωρίς κίρρωση και σε ασθενείς με κίρρωση. Υπενθυμίζεται πως στην κατηγορία των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο συμπεριλαμβάνονται οι ασθενείς με ΠΧΚ, ΠΣΧ και με υπό διερεύνηση χολοστατικό σύνδρομο. Και αυτοί διακρίθηκαν σε ασθενείς χωρίς κίρρωση και σε ασθενείς με κίρρωση.

**Πίνακας 5.** Οι τιμές των μεταβολικών λόγων CMR των ασθενών με ηπατοπάθεια μη ιογενούς αιτιολογίας.

<b>ΜΗ ΙΟΓΕΝΟΥΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΕΣ</b>							
		<b>Μη καπνιστές</b>			<b>Καπνιστές</b>		
		Ενδιάμεσος	Εύρος	N	Ενδιάμεσος	Εύρος	N
<b>Υγιείς εθελοντές</b>		<b>3,36</b>	2,17-5,80	113	5,48	2,18-11,15	52
<b>Μη ιογενής ηπατίτιδα</b>	<b>Σύνολο</b>	2,43	0,81-7,54	109	3,87	1,59-8,76	51
<b>Αλκοολική ηπατοπάθεια</b>	<b>Σύνολο</b>	2,19	1,31-4,88	21	3,68	1,59-8,32	27
	Μη κίρρωτικοί	2,98	2,11-4,88	11	3,88	1,59-8,32	15
	Κίρρωτικοί	1,91	1,31-4,55	10	3,09	2,13-7,75	12
<b>AH</b>	<b>Σύνολο</b>	2,18	0,81-4,80	27	4,14	2,43-4,83	3
	Μη κίρρωτικοί	2,45	1,69-4,80	16	4,48	4,14-4,83	2
	Κίρρωτικοί	2,05	0,81-2,97	11	2,43		1
<b>AXHN</b>	<b>Σύνολο</b>	2,37	1,23-4,76	39	3,90	1,80-8,76	13
	Μη κίρρωτικοί	2,48	1,23-4,76	36	3,92	2,65-8,76	11
	Κίρρωτικοί	1,98	1,52-2,18	3	2,83	1,80-3,85	2
<b>NAFLD/NASH</b>		2,63	1,36-7,54	22	3,69	1,74-7,26	8

Στον Πίνακα 5 αναγράφονται οι τιμές των μεταβολικών λόγων CMR των ασθενών με ηπατοπάθεια μη ιογενούς αιτιολογίας.

Στις **μη ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθειες στους **μη καπνιστές** η ανάλυση Kruskal-Wallis μεταξύ του δείγματος των υγιών, των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα χωρίς κίρρωση, των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα με κίρρωση, των ασθενών με AH χωρίς κίρρωση, των ασθενών με AH με κίρρωση, του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο χωρίς κίρρωση, του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο με κίρρωση και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας είναι  $p \leq 0.001$ . Επομένως, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές και άρα έγινε περαιτέρω ανάλυση Mann-Whitney στις επιμέρους ομάδες (σχήμα 3, 4 και Πίνακας 6).

Στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR αναδεικνύονται:

- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα με κίρρωση, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με ΑΗ χωρίς κίρρωση, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με ΑΗ με κίρρωση, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των υγιών και του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο χωρίς κίρρωση, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των υγιών και του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο με κίρρωση, ( $p = 0.003$ ),
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των υγιών και του συνόλου των ασθενών με ηπατοπάθεια μη ιογενούς αιτιολογίας, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ του συνόλου των ασθενών με ΑΗ και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p = 0.034$ ).

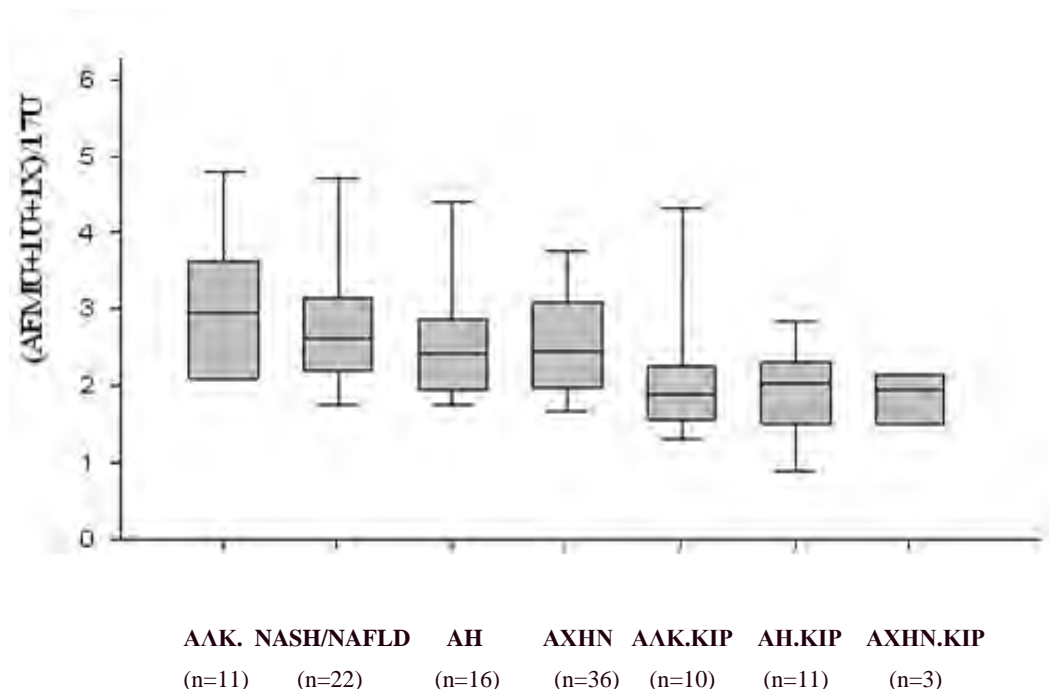
Δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR:

- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα χωρίς κίρρωση, ( $p = 0.077$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα χωρίς κίρρωση και των ασθενών με ΑΗ χωρίς κίρρωση, ( $p = 0.064$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα με κίρρωση και των ασθενών με ΑΗ με κίρρωση, ( $p = 0.972$ ),
- μεταξύ του συνόλου των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και του συνόλου των ασθενών με ΑΗ, ( $p = 0.309$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα χωρίς κίρρωση και των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο χωρίς κίρρωση, ( $p = 0.309$ ),
- μεταξύ του συνόλου των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο, ( $p = 0.926$ ),
- μεταξύ του συνόλου των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p = 0.444$ ),

- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα χωρίς κίρρωση και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p=0.276$ ),
- μεταξύ των ασθενών με ΑΗ χωρίς κίρρωση και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p=0.322$ ),
- μεταξύ του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο χωρίς κίρρωση και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p=0.391$ ),
- μεταξύ του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p=0.251$ ),
- μεταξύ του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο και του συνόλου των ασθενών με ΑΗ, ( $p=0.303$ ),
- μεταξύ του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο χωρίς κίρρωση και των ασθενών με ΑΗ χωρίς κίρρωση, ( $p=0.882$ ).

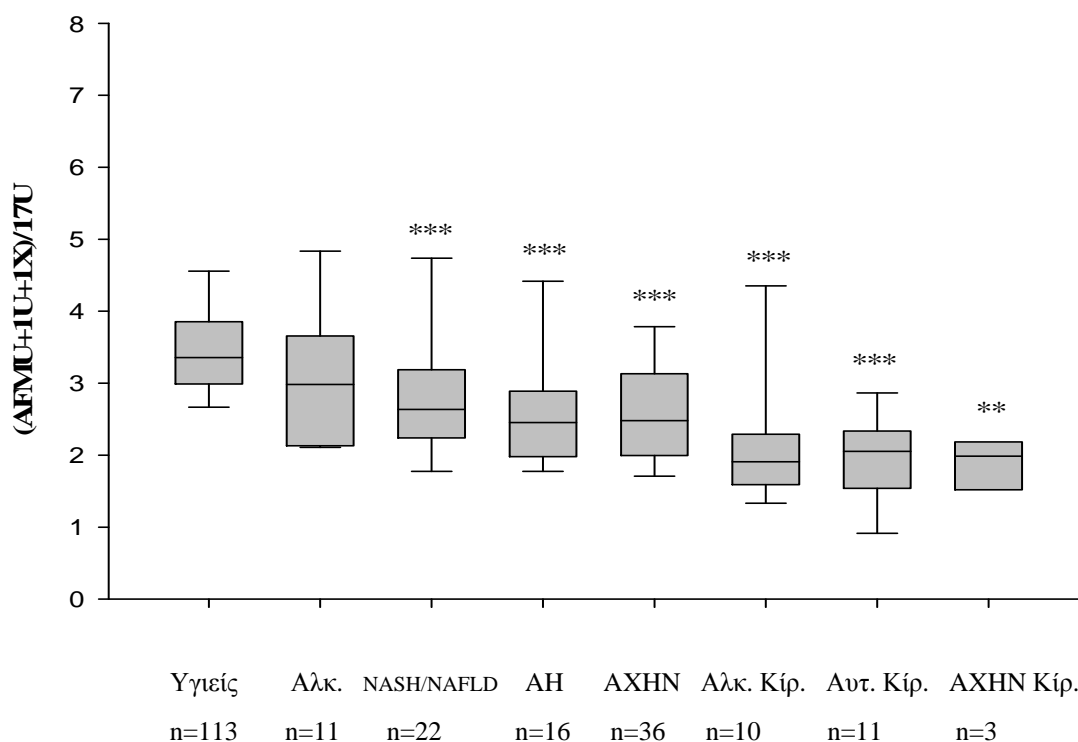
Δεν έγιναν συγκρίσεις μεταξύ των κατηγοριών των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα με κίρρωση και των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο με κίρρωση, όπως και μεταξύ των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο με κίρρωση και των ασθενών με ΑΗ με κίρρωση, λόγω του μικρού δείγματος των ασθενών αυτών των υποκατηγοριών.

Στις **μη ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθειες στους **καπνιστές** η ανάλυση Kruskal-Wallis μεταξύ του δείγματος των υγιών, των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα χωρίς κίρρωση, των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα με κίρρωση, των ασθενών με ΑΗ χωρίς κίρρωση, των ασθενών με ΑΗ με κίρρωση, του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο χωρίς κίρρωση, του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο με κίρρωση και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας είναι  $p \leq 0.001$ . Επομένως, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές και άρα έγινε περαιτέρω ανάλυση Mann-Whitney στις επιμέρους ομάδες (σχήμα 6 και Πίνακας 7).



**Σχήμα 3.** Επίδραση ηπατοπάθειας στο μεταβολικό λόγο  $(AFMU+1U+1X)/17U$  σε μη καπνιστές με μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθεια ανάλογα με αιτιολογία.

Καμιά στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιμέρους κατηγοριών. Έγιναν συγκρίσεις μεταξύ των μη κίρρωτικών με διαφορετικής αιτιολογίας ηπατικά νοσήματα και ακολούθως, μεταξύ των κίρρωτικών με διαφορετικής αιτιολογίας ηπατικά νοσήματα, όπου δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές. Δεν έγιναν οι επιμέρους συγκρίσεις μεταξύ των μη κίρρωτικών και των κίρρωτικών ασθενών.



**Σχήμα 4.** Επίδραση ηπατοπάθειας στο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U στους μη καπνιστές μη ιογενούς αιτιολογίας, όπου:

\*\*  $p < 0,01$  μεταξύ αυτοάνοσων χολοστατικών νοσημάτων και υγιών

\*\*\*  $p < 0,001$  μεταξύ της αντίστοιχης ομάδας των ασθενών και των υγιών

Στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR αναδεικνύονται:

- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα χωρίς κίρρωση, ( $p=0.015$ ),
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα με κίρρωση, ( $p=0.01$ ),
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p=0.008$ ),
- μεταξύ των υγιών και του συνόλου των ασθενών με ηπατοπάθεια μη ιογενούς αιτιολογίας, ( $p \leq 0.001$ ).



**Πίνακας 6.** Επίδραση ηπατοπάθειας στο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U στους **μη καπνιστές** ανάλογα με την αιτιολογία της ηπατικής νόσου. Το κελί-σημείο τομής των εκάστοτε δυο νόσων περιέχει το p που προκύπτει από τη μεταξύ τους σύγκριση.

	<b>HBV</b> (n=91)	<b>HCV</b> (n=31)	<b>ΑΛΚΟΟΛ.</b> (n=21)	<b>AH</b> (n=27)	<b>AXHN</b> (n=39)	<b>NASH/NAFLD</b> (n=22)
<b>HBV</b> (n=91)	-	0.054	0.177	<b>0.002</b>	<b>0.037</b>	0.819
<b>HCV</b> (n=31)	0.054	-	0.896	0.454	0.822	0.191
<b>ΑΛΚΟΟΛ.</b> (n=21)	0.177	0.896	-	0.309	0.926	0.444
<b>AH</b> (n=27)	<b>0.002</b>	0.454	0.309	-	0.303	<b>0.034</b>
<b>AXHN</b> (n=39)	<b>0.037</b>	0.822	0.926	0.303	-	0.251
<b>NASH/NAFLD</b> (n=22)	0.819	0.191	0.444	<b>0.034</b>	0.251	-

Δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR:

- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με AH χωρίς κίρρωση, (p=0.348),
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με AH με κίρρωση, (p=0.109),
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο χωρίς κίρρωση, (p=0.084),
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο με κίρρωση, (p=0.057),
- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα χωρίς κίρρωση και των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο χωρίς κίρρωση, (p=0.467),
- μεταξύ του συνόλου των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο, (p=0.507),
- μεταξύ του συνόλου των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, (p=0.922),
- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα χωρίς κίρρωση και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, (p=0.821),
- μεταξύ των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο χωρίς κίρρωση και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, (p=0.391),

➤ μεταξύ του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p=0.447$ ).

**Πίνακας 7.** Επίδραση ηπατοπάθειας στο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U στους **καπνιστές** ανάλογα με την αιτιολογία της ηπατικής νόσου. Το κελί- σημείο τομής των εκάστοτε δυο νόσων περιέχει το  $p$  που προκύπτει από τη μεταξύ τους σύγκριση.

	<b>HBV</b> (n=33)	<b>HCV</b> (n=25)	<b>ΑΛΚΟΟΛ.</b> (n=27)	<b>AH</b> (n=3)	<b>AXHN</b> (n=13)	<b>NASH/NAFLD</b> (n=8)
<b>HBV</b> (n=33)	-	0.454	0.005	0.086	0.032	0.014
<b>HCV</b> (n=25)	0.454	-	0.017	0.235	0.176	0.051
<b>ΑΛΚΟΟΛ.</b> (n=27)	0.005	0.017	-		0.507	0.922
<b>AH</b> (n=3)	0.086	0.235		-		
<b>AXHN</b> (n=13)	0.032	0.176	0.507		-	0.447
<b>NASH/NAFLD</b> (n=8)	0.014	0.051	0.922		0.447	-

Λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών δεν έγιναν συγκρίσεις μεταξύ των κάτωθι κατηγοριών των ασθενών:

- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα χωρίς κίρρωση και των ασθενών με AH χωρίς κίρρωση,
- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα με κίρρωση και των ασθενών με AH με κίρρωση,
- μεταξύ του συνόλου των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και του συνόλου των ασθενών με AH,
- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα με κίρρωση και των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο με κίρρωση,
- μεταξύ των ασθενών με AH χωρίς κίρρωση και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας,
- μεταξύ του συνόλου των ασθενών με AH και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας,

- μεταξύ των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο με κίρρωση και των ασθενών με ΑΗ με κίρρωση,
- μεταξύ του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο και του συνόλου των ασθενών ΑΗ,
- μεταξύ των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο χωρίς κίρρωση και των ασθενών με ΑΗ χωρίς κίρρωση.

Μεταξύ **καπνιστών και μη καπνιστών** στις **μη ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθειες με ανάλυση Mann-Whitney αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στις επιμέρους συγκρίσεις στα κάτωθι νοσήματα:

- στους ασθενείς με αλκοολική ηπατίτιδα με κίρρωση, ( $p=0.003$ ),
- στους ασθενείς με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο χωρίς κίρρωση, ( $p\leq 0.001$ ),
- στο σύνολο των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα, ( $p=0.003$ ),
- στο σύνολο των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο, ( $p\leq 0.001$ ),
- στο σύνολο των ασθενών με ηπατοπάθεια μη ιογενούς αιτιολογίας, ( $p\leq 0.001$ ).

Δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών στις επιμέρους συγκρίσεις στα κάτωθι νοσήματα:

- στους ασθενείς με αλκοολική ηπατίτιδα χωρίς κίρρωση, ( $p=0.119$ ),
- στους ασθενείς με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p=0.153$ ),

Στο σύνολο των ασθενών με ΑΗ είναι  $p=0.053$  και στους ασθενείς με ΑΗ χωρίς κίρρωση είναι  $p=0.058$  (οριακά). Οι τιμές αυτές ενδεχομένως υποδηλώνουν σημαντικότητα που ίσως «κρύβεται» λόγω του αριθμού των περιπτώσεων και αξίζει να ληφθεί υπόψη.

Κατόπιν, έγινε ανάλυση Kruskal-Wallis στις επιμέρους συνολικές κατηγορίες των **μη καπνιστών με μη ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθεια μεταξύ του δείγματος των υγιών, του συνόλου των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα, του συνόλου των ασθενών με ΑΗ, του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο,

και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας και βρέθηκε  $p \leq 0.001$  (Πίνακας 6). Επομένως, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές και έγινε περαιτέρω ανάλυση Mann-Whitney στις επιμέρους ομάδες.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR αναδεικνύονται:

- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με ΑΗ, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p \leq 0.001$ ), (η συγκεκριμένη σύγκριση αναφέρεται και πιο πάνω),
- μεταξύ των ασθενών με ΑΗ και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p = 0.034$ ), (η συγκεκριμένη σύγκριση αναφέρεται και πιο πάνω),

Δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR:

- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και των ασθενών με ΑΗ, ( $p = 0.309$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο, ( $p = 0.926$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p = 0.444$ ),
- μεταξύ των ασθενών με ΑΗ και των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο, ( $p = 0.303$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p = 0.251$ ).

Στη συνέχεια έγινε ανάλυση Kruskal-Wallis στις επιμέρους συνολικές κατηγορίες των **καπνιστών με μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθεια** μεταξύ του δείγματος των υγιών, του συνόλου των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα, του συνόλου των ασθενών με ΑΗ, του συνόλου των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας

και βρέθηκε  $p \leq 0.001$  (Πίνακας 7). Επομένως, υπάρχουν σημαντικές στατιστικά διαφορές και έγινε περαιτέρω ανάλυση Mann-Whitney στις επιμέρους ομάδες.

Σημαντικές στατιστικά μεταβολές των μεταβολικών λόγων CMR αναδεικνύονται:

- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα, ( $p=0.001$ ),
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο, ( $p=0.024$ ),
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p=0.008$ ), (η συγκεκριμένη σύγκριση αναφέρεται και πιο πάνω),

Δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές μεταβολές των μεταβολικών λόγων CMR:

- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με ΑΗ, ( $p=0.092$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο, ( $p=0.507$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p=0.922$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, ( $p=0.447$ ).

Λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών δεν έγιναν συγκρίσεις μεταξύ των κάτωθι κατηγοριών των ασθενών:

- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και των ασθενών με ΑΗ,
- μεταξύ των ασθενών με ΑΗ και των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο,
- μεταξύ των ασθενών με ΑΗ και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας.

Κατόπιν, έγινε ανάλυση Kruskal-Wallis στις επιμέρους συνολικές κατηγορίες των ασθενών με **μη ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθεια και των ασθενών με **ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθεια (Πίνακας 8). Πιο συγκεκριμένα στους **μη καπνιστές** η ανάλυση Kruskal-Wallis μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα, των

ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, των ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα, των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο, των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας και των ασθενών με ηπατοπάθεια HCV αιτιολογίας είναι  $p=0.025$ . Επομένως, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές και έγινε περαιτέρω ανάλυση Mann-Whitney στις επιμέρους ομάδες.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR αναδεικνύονται μόνο:

- μεταξύ των ασθενών με ΑΗ και των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας ( $p=0.002$ )
- μεταξύ των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο και των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας ( $p=0.037$ )

Δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR:

- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και των ασθενών με ηπατοπάθεια HCV αιτιολογίας, ( $p=0.896$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας, ( $p=0.177$ ),
- μεταξύ των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας και των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας, ( $p=0.819$ ),
- μεταξύ των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας και των ασθενών με ηπατοπάθεια HCV αιτιολογίας, ( $p=0.191$ ),
- μεταξύ των ασθενών με ΑΗ και των ασθενών με ηπατοπάθεια HCV αιτιολογίας ( $p=0.454$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο και των ασθενών με ηπατοπάθεια HCV αιτιολογίας ( $p=0.822$ ).

Στη συνέχεια έγινε ανάλυση Kruskal-Wallis στις επιμέρους συνολικές κατηγορίες των ασθενών με **μη ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθεια και των ασθενών με **ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθεια. Πιο συγκεκριμένα στους **καπνιστές** η ανάλυση Kruskal-Wallis μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα, των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας, των ασθενών με ΑΗ, των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο, των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV

αιτιολογίας και των ασθενών με ηπατοπάθεια HCV αιτιολογίας είναι  $p=0.025$ . Επομένως, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές και έγινε περαιτέρω ανάλυση Mann-Whitney στις επιμέρους ομάδες.

Σημαντικές στατιστικά μεταβολές των μεταβολικών λόγων CMR αναδεικνύονται:

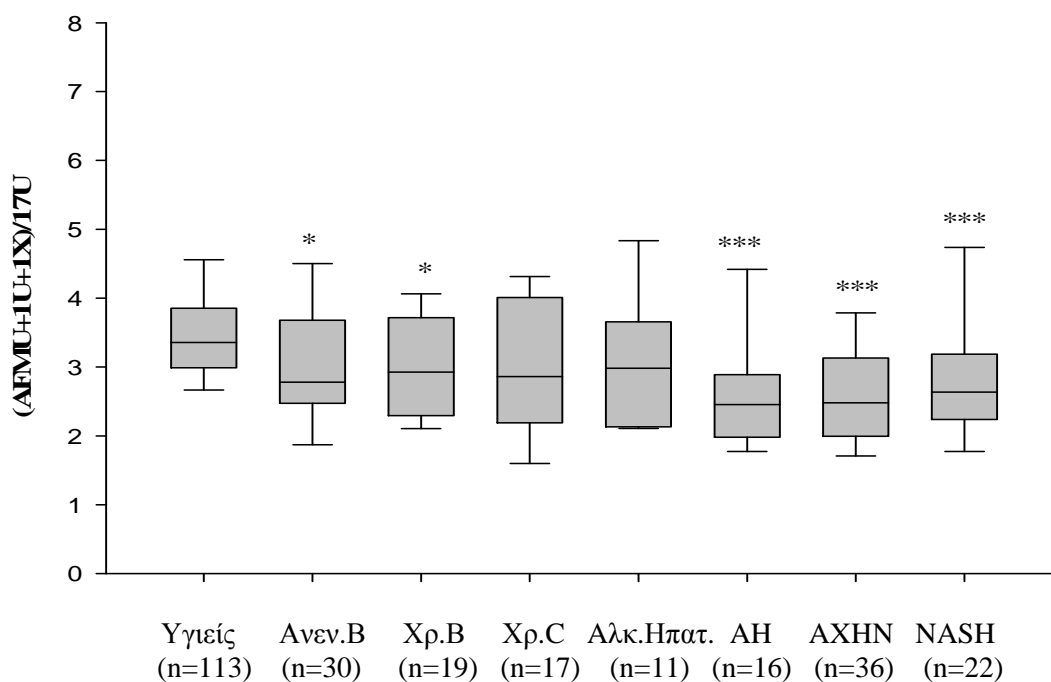
- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και των ασθενών με ηπατοπάθεια HCV αιτιολογίας, ( $p=0.017$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας, ( $p=0.005$ ),
- μεταξύ των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας και των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας, ( $p=0.014$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο και των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας ( $p=0.032$ ).

Δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές μεταβολές των μεταβολικών λόγων CMR:

- μεταξύ των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας και των ασθενών με ηπατοπάθεια HCV αιτιολογίας, ( $p=0.051$ ),
- μεταξύ των ασθενών με AH και των ασθενών με ηπατοπάθεια HCV αιτιολογίας ( $p=0.235$ ),
- μεταξύ των ασθενών με AH και των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας ( $p=0.086$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο και των ασθενών με ηπατοπάθεια HCV αιτιολογίας ( $p=0.176$ ).

Σε μια πιο συνολική προσέγγιση των παραπάνω συγκρίσεων, οι ασθενείς χωρίστηκαν ανάλογα με την ύπαρξη ή μη κίρρωσης. Στα σχήματα 5 και 6 απεικονίζονται οι τιμές του μεταβολικού λόγου  $(AFMU+1U+1X)/17U$  στους μη κίρρωτικούς μη καπνιστές και καπνιστές, αντίστοιχα. Στα σχήματα 7 και 8 απεικονίζονται οι τιμές του μεταβολικού λόγου  $(AFMU+1U+1X)/17U$  στους κίρρωτικούς μη καπνιστές και καπνιστές, αντίστοιχα.

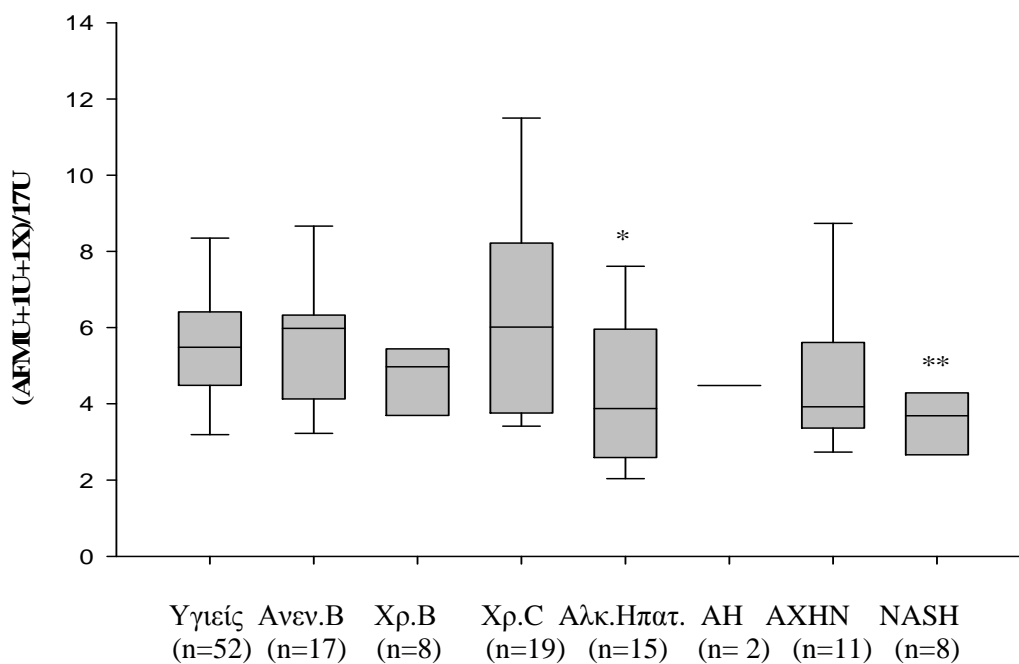




**Σχήμα 5.** Επίδραση ηπατοπάθειας στο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U στους μη καπνιστές μη κιρρωτικούς, όπου:

\*\*\* $p \leq 0.001$  σε σχέση με τους υγιείς

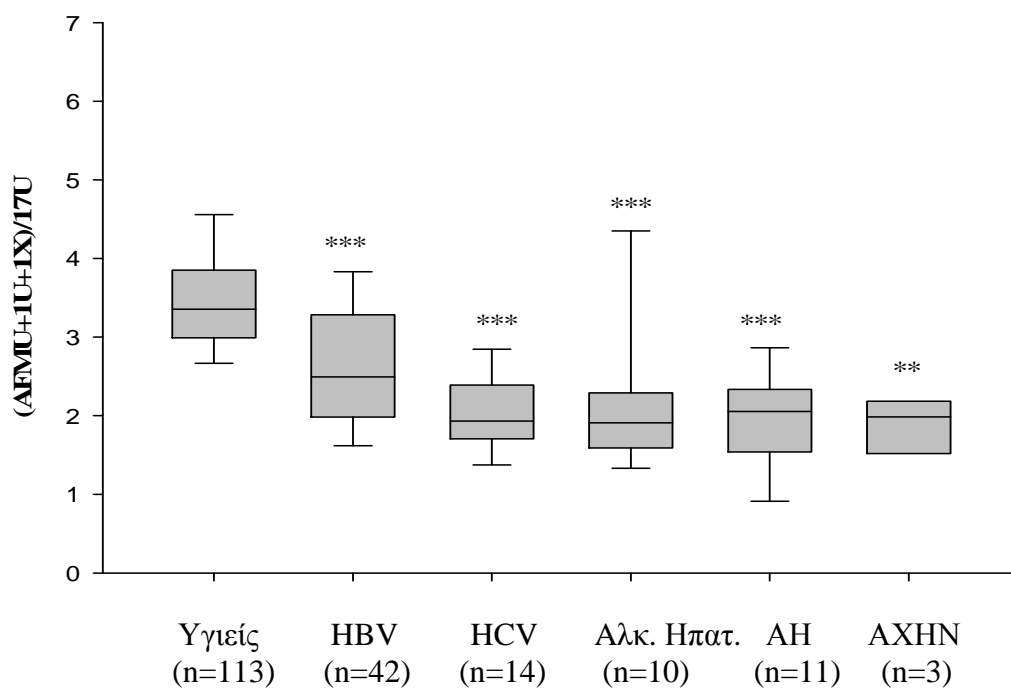
\* $p \leq 0.05$  σε σχέση με τους υγιείς.



**Σχήμα 6.** Επίδραση ηπατοπάθειας στο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U στους καπνιστές μη κιρρωτικούς, όπου:

\*\*  $p \leq 0.01$  σε σχέση με τους υγιείς,

\*  $p \leq 0.05$  σε σχέση με τους υγιείς.

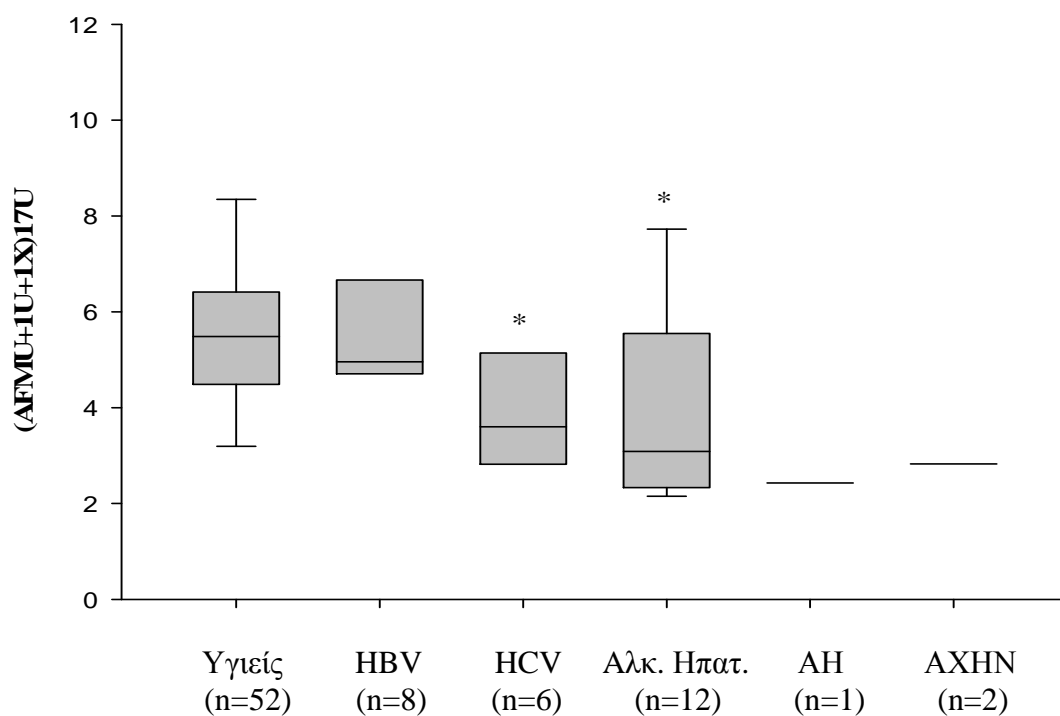


**Σχήμα 7.** Επίδραση ηπατοπάθειας στο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U

στους μη καπνιστές κίρρωτικούς ασθενείς, όπου:

\*\*\*  $p \leq 0.001$  σε σχέση με τους υγιείς

\*\*  $p \leq 0.01$  σε σχέση με τους υγιείς



**Σχήμα 8.** Επίδραση ηπατοπάθειας στο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U στους καπνιστές κίρρωτικούς ασθενείς, όπου:  
 \*  $p \leq 0,05$  σε σχέση με τους υγιείς

**Πίνακας 8.** Οι τιμές των μεταβολικών λόγων CMR των ασθενών με ηπατοπάθεια μη ιογενούς και ιογενούς αιτιολογίας ανάλογα με τη «βαρύτητα» της ηπατοπάθειας.

		Μη καπνιστές			Καπνιστές		
		Ενδιάμεσος	Εύρος	N	Ενδιάμεσος	Εύρος	N
<b>HBV</b>	<b>Σύνολο</b>	2,71	1,23-5,13	91	5,10	2,59-9,88	33
	Ανενεργοί φορείς	2,78	1,68-5,13	30	5,98	2,59-9,88	17
	Χρόνιοι	2,93	1,55-4,68	19	4,97	2,82-6,00	8
	Κιρρωτικοί	2,49	1,23-4,84	42	4,96	3,73-7,46	8
<b>HCV</b>	<b>Σύνολο</b>	2,23	1,20-4,81	31	5,57	2,22-12,46	25
	Μη κιρρωτικοί	2,86	1,52-4,81	17	6,01	2,61-12,46	19
	Κιρρωτικοί	1,93	1,20-3,06	14	3,60	2,22-7,70	6
<b>Αλκοολική ηπατοπάθεια</b>	<b>Σύνολο</b>	2,19	1,31-4,88	21	3,68	1,59-8,32	27
	Μη κιρρωτικοί	2,98	2,11-4,88	11	3,88	1,59-8,32	15
	Κιρρωτικοί	1,91	1,31-4,55	10	3,09	2,13-7,75	12
<b>AH</b>	<b>Σύνολο</b>	2,18	0,81-4,80	27	4,14	2,43-4,83	3
	Μη κιρρωτικοί	2,45	1,69-4,80	16	4,48	4,14-4,83	2
	Κιρρωτικοί	2,05	0,81-2,97	11	2,43		1
<b>AXHN</b>	<b>Σύνολο</b>	2,34	1,23-4,76	39	3,90	1,80-8,76	13
	Μη κιρρωτικοί	2,48	1,23-4,76	36	3,92	2,65-8,76	11
	Κιρρωτικοί	1,98	1,52-2,18	3	2,83	1,80-3,85	2
<b>NAFLD/NASH</b>		2,63	1,36-7,54	22	3,69	1,74-7,26	8

Σε μια πιο **συνολική προσέγγιση** οι ασθενείς ταξινομήθηκαν ανάλογα με τη «**βαρύτητα**» της ηπατικής νόσου. Πιο συγκεκριμένα, **όλοι** οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε **μη κιρρωτικούς** και **κίρρωτικούς**. Οι μη κιρρωτικοί χωρίστηκαν σε ασθενείς με «ανενεργό» νόσο, όπου συμπεριλήφθησαν οι ανενεργοί φορείς ηπατίτιδας Β και σε ασθενείς με «ενεργό» νόσο, όπου συμπεριλήφθησαν όλοι οι υπόλοιποι μη κιρρωτικοί. Οι κιρρωτικοί ασθενείς διακρίθηκαν σε ασθενείς με

αντιρροπούμενη και σε ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση. Και εδώ οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε μη καπνιστές και καπνιστές.

**Πίνακας 9.** Οι τιμές των μεταβολικών λόγων CMR των ασθενών ανάλογα με τη «βαρύτητα» της ηπατικής νόσου

<b>ΚΙΡΡΩΤΙΚΟΙ/ ΜΗ ΚΙΡΡΩΤΙΚΟΙ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΣ</b>						
	<b>Μη καπνιστές</b>		<b>n</b>	<b>Καπνιστές</b>		
	<b>Ενδιάμεσος</b>	<b>Εύρος</b>		<b>Ενδιάμεσος</b>	<b>Εύρος</b>	<b>n</b>
<b>Υγιείς εθελοντές</b>	<b>3,36</b>	<b>2,17-5,80</b>	<b>113</b>	<b>5,48</b>	<b>2,18-11,15</b>	<b>52</b>
<b>Μη κίρρωτικοί σύνολο</b>	<b>2,71</b>	<b>1,24-7,54</b>	<b>151</b>	<b>4,47</b>	<b>1,56-12,46</b>	<b>80</b>
Ανενεργός νόσος	2,78	1,68-5,13	30	5,98	2,59-9,88	17
Ενεργός νόσος χωρίς κίρρωση	2,67	1,23-7,54	121	4,21	1,58-12,46	63
<b>Κίρρωτικοί σύνολο</b>	<b>2,20</b>	<b>0,81-4,84</b>	<b>80</b>	<b>3,85</b>	<b>1,80-7,74</b>	<b>29</b>
Αντιρροπούμενη κίρρωση	2,32	1,20-4,84	68	4,70	2,22-7,74	17
Μη αντιρροπούμενη κίρρωση	1,90	0,81-3,67	12	2,56	1,80-7,68	12

Στον Πίνακα 8 αναγράφονται οι τιμές των μεταβολικών λόγων CMR των ασθενών ανάλογα με τη «βαρύτητα» της ηπατικής νόσου.

Η ανάλυση Kruskal-Wallis στους **μη καπνιστές** μεταξύ του δείγματος των υγιών, των ασθενών με ανενεργό ηπατίτιδα Β, των μη κίρρωτικών ασθενών με «ενεργό» νόσο, των κίρρωτικών ασθενών με αντιρροπούμενη κίρρωση και των κίρρωτικών ασθενών με μη αντιρροπούμενη είναι  $p \leq 0.001$ . Επομένως, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές και έγινε περαιτέρω ανάλυση Mann-Whitney στις επιμέρους ομάδες.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR αναδεικνύονται:

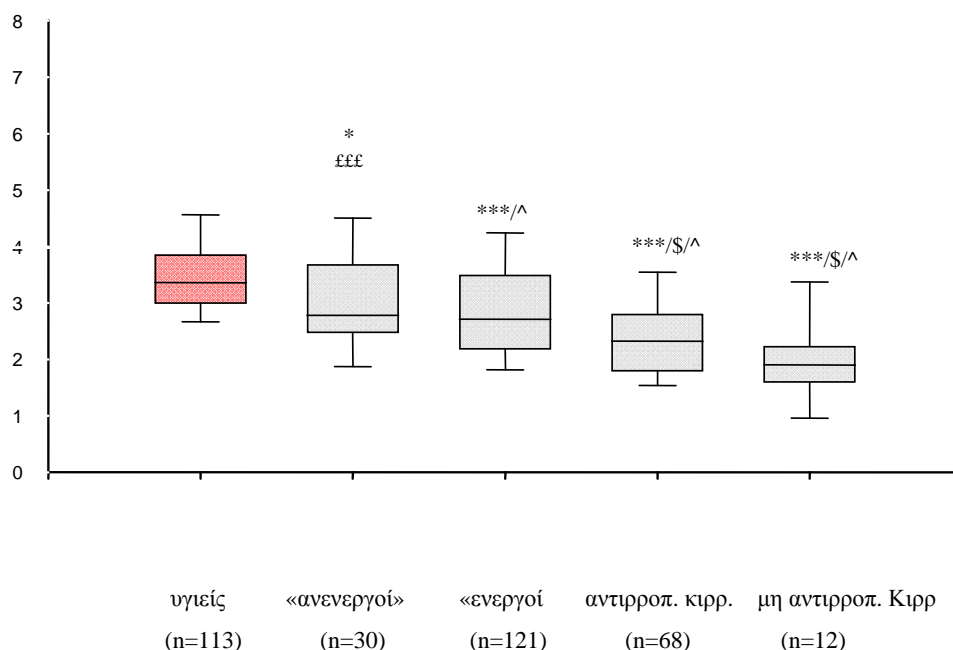
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με «ανενεργό» νόσο, ( $p=0.016$ ),
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με «ενεργή» νόσο μη κίρρωτικών, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των υγιών και των κίρρωτικών με αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p \leq 0.001$ ),

- μεταξύ των υγιών και των κίρρωτικών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των ασθενών με «ανενεργό» νόσο και των κίρρωτικών με αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των ασθενών με «ανενεργό» νόσο και των κίρρωτικών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των ασθενών με «ενεργή» νόσο μη κίρρωτικών και των ασθενών με αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p = 0.002$ ),
- μεταξύ των ασθενών με «ενεργή» νόσο μη κίρρωτικών και των ασθενών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p = 0.001$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αντιρροπούμενη κίρρωση και των ασθενών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p < 0.05$ ).

Δεν αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών με «ανενεργό» νόσο και των ασθενών με «ενεργή» νόσο μη κίρρωτικών, ( $p = 0.124$ ) (σχήμα 9).

**Πίνακας 10.** Οι τιμές των μεταβολικών λόγων CMR των ασθενών ανάλογα με την αιτιολογία και τη «βαρύτητα» της ηπατικής νόσου.

ΚΙΡΡΩΣΗ	ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ				
	HBV	HCV	ΔΗ	ΑΧΗΝ	ΑΛΚΟ ΟΛ
<b>ΑΝΤΙΡΡΟΠΟΥΜΕΝΗ</b> Μη Καπνιστές/ Καπνιστές	45 37/8	19 13/6	11 10/1	3 2/1	8 6/2
<b>ΜΗ</b> <b>ΑΝΤΙΡΡΟΠΟΥΜΕΝΗ</b> Μη Καπνιστές/ Καπνιστές	5 5/0	1 1/0	1 1/0	2 1/1	14 4/10
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b> Μη Καπνιστές/ Καπνιστές	50 42/8	20 14/6	12 11/1	5 3/2	22 10/12



**Σχήμα 9.** Επίδραση ηπατοπάθειας στο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U στους μη καπνιστές ανάλογα με τη «βαρύτητα» της ηπατικής νόσου, όπου:

- \*  $p < 0,05$  μεταξύ Ανενεργών φορέων και Υγιών(\*),
- \$  $p < 0,05$  μεταξύ Αντιρροπούμενης και Μη αντιρροπούμενης κίρρωσης (\$)
- ^^  $p < 0,01$  μεταξύ Μη κίρρωτικών ενεργών ασθενών και ασθενών με Αντιρροπούμενη και Μη αντιρροπούμενη κίρρωση
- \*\*\* $p < 0,001$
- α) μεταξύ Μη κίρρωτικών ενεργών ασθενών και Υγιών
- β) μεταξύ ασθενών με Αντιρροπούμενη κίρρωση και Υγιών
- γ) μεταξύ ασθενών με Μη αντιρροπούμενη κίρρωση και Υγιών
- ###  $p < 0,001$  μεταξύ Ανενεργών φορέων ηπατίτιδας B και ασθενών με Αντιρροπούμενη και Μη αντιρροπούμενη κίρρωση

Η ανάλυση Kruskal-Wallis στους **καπνιστές** μεταξύ του δείγματος των υγιών, των ασθενών με ανενεργό ηπατίτιδα B, των μη κίρρωτικών ασθενών με «ενεργό» νόσο, των κίρρωτικών ασθενών με αντιρροπούμενη κίρρωση και των κίρρωτικών ασθενών με μη αντιρροπούμενη είναι  $p = 0.003$  (σχήμα 4). Επομένως, υπάρχουν



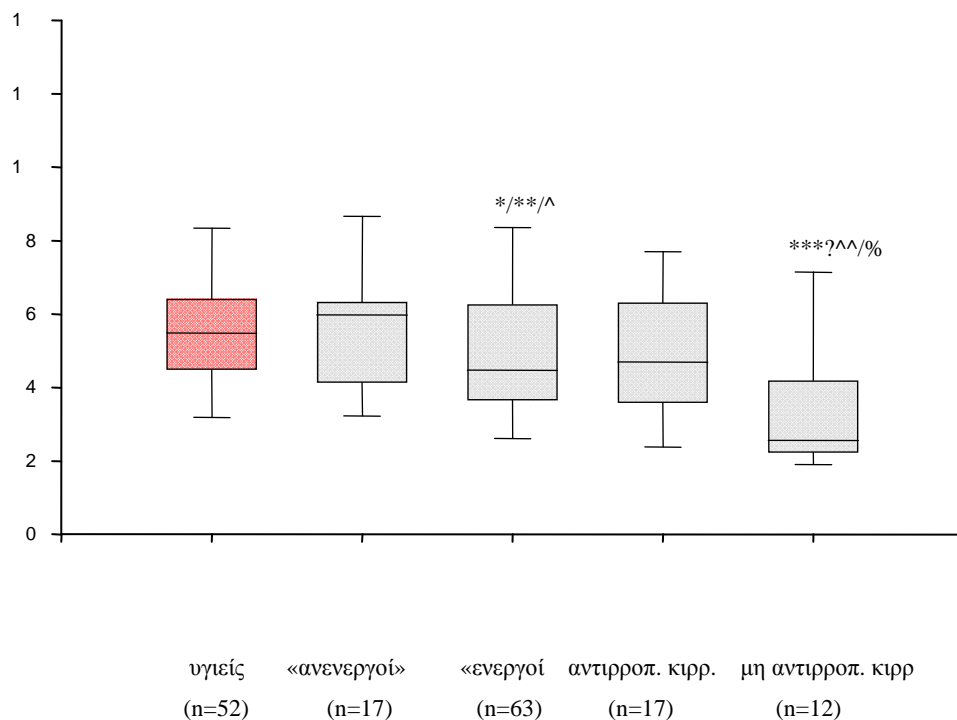
στατιστικά σημαντικές διαφορές και έγινε περαιτέρω ανάλυση Mann-Whitney στις επιμέρους ομάδες.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR αναδεικνύονται:

- μεταξύ των υγιών και των κίρρωτικών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των ασθενών με «ανενεργό» νόσο και των κίρρωτικών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p = 0.002$ ),
- μεταξύ των ασθενών με «ενεργή» νόσο μη κίρρωτικών και των ασθενών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p = 0.007$ ),
- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με «ενεργή» νόσο μη κίρρωτικών, ( $p = 0.033$ ),
- μεταξύ των ασθενών με αντιρροπούμενη κίρρωση και των ασθενών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p = 0.025$ ).

Δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR:

- μεταξύ των υγιών και των ασθενών με «ανενεργό» νόσο, ( $p = 0.939$ ),
- μεταξύ των υγιών και των κίρρωτικών με αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p = 0.138$ ),
- μεταξύ των ασθενών με «ανενεργό» νόσο και των ασθενών με «ενεργή» νόσο μη κίρρωτικών, ( $p = 0.123$ ),
- μεταξύ των ασθενών με «ανενεργό» νόσο και των κίρρωτικών με αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p = 0.256$ ),
- μεταξύ των ασθενών με «ενεργή» νόσο μη κίρρωτικών και των ασθενών με αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p = 0.897$ ).



**Σχήμα 10.** Επίδραση ηπατοπάθειας στο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U

στους καπνιστές ανάλογα με τη «βαρύτητα» της ηπατικής νόσου, όπου:

\*  $p < 0.05$  μεταξύ Μη κίρρωτικών ενεργών ασθενών και Υγιών,

\$  $p < 0.05$  μεταξύ Αντιρροπούμενης και Μη αντιρροπούμενης κίρρωσης

^  $p < 0.01$  μεταξύ Μη κίρρωτικών ενεργών ασθενών και ασθενών με Μη αντιρροπούμενη κίρρωση,

%%  $p < 0.01$  Ανενεργών φορέων ηπατίτιδας B και Μη αντιρροπούμενης κίρρωσης

\*\*\*  $p < 0.001$  μεταξύ ασθενών με Μη αντιρροπούμενη κίρρωση και Υγιών

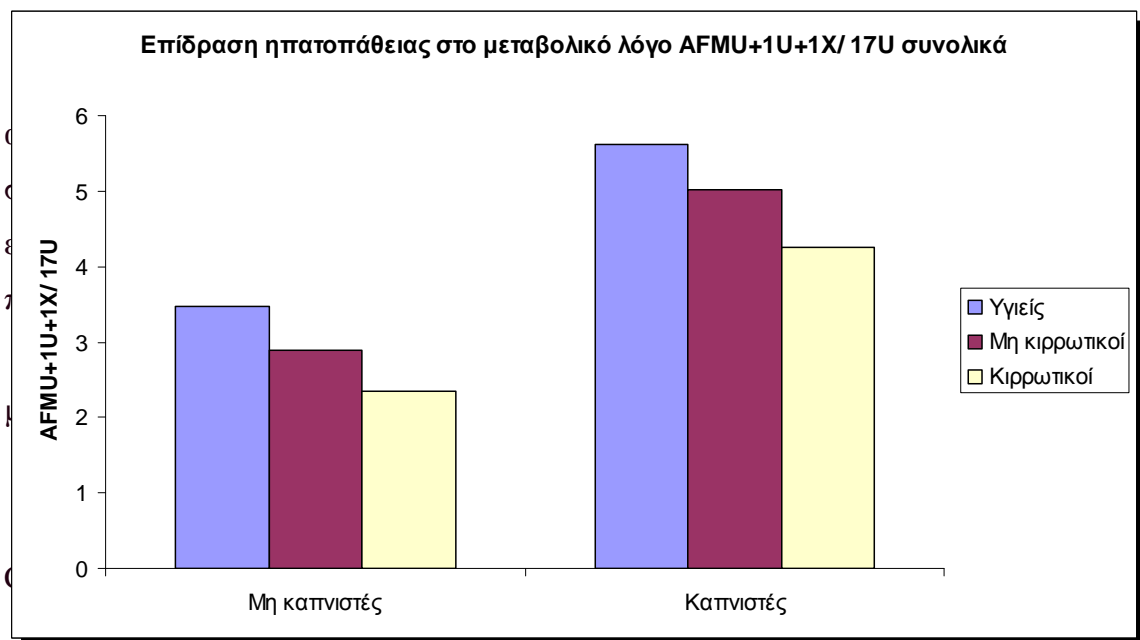
Σε μια άλλη προσέγγιση εξετάστηκε συνολικά η ομάδα των υγιών, με το σύνολο των μη κίρρωτικών και το σύνολο των κίρρωτικών ασθενών. Και εδώ έγινε διάκριση μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών.

Η ανάλυση Kruskal-Wallis στους **μη καπνιστές** μεταξύ του δείγματος των υγιών, του συνόλου των μη κίρρωτικών ασθενών και του συνόλου των κίρρωτικών ασθενών είναι  $p \leq 0.001$  (σχήμα 11). Επομένως, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές και έγινε περαιτέρω ανάλυση Mann-Whitney στις επιμέρους ομάδες.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR αναδεικνύονται σε όλες τις συγκρίσεις. Πιο συγκεκριμένα:

- μεταξύ των υγιών και του συνόλου των μη κίρρωτικών, ( $p \leq 0.001$ ),

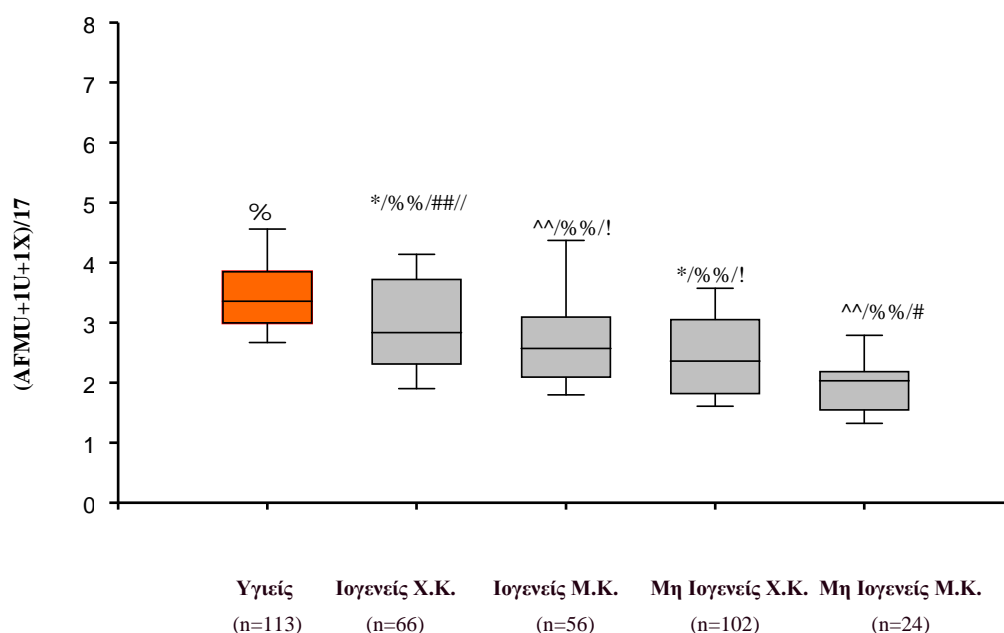
- μεταξύ των υγίων και του συνόλου των κίρρωτικών, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ του συνόλου των μη κίρρωτικών και του συνόλου των κίρρωτικών, ( $p \leq 0.001$ ).



**Σχήμα 11.** Επίδραση ηπατοπάθειας στο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U σε μη καπνιστές-καπνιστές συνολικά.

Αξίζει να σημειωθεί πως μεταξύ του συνόλου των μη κίρρωτικών και του συνόλου των κίρρωτικών δεν αναδεικνύονται σημαντικές στατιστικά μεταβολές των μεταβολικών λόγων CMR, αλλά το  $p$  είναι οριακό ( $p=0.057$ ). Τούτο ενδεχομένως υποδηλώνει σημαντικότητα που ίσως «κρύβεται» λόγω του αριθμού των περιπτώσεων.

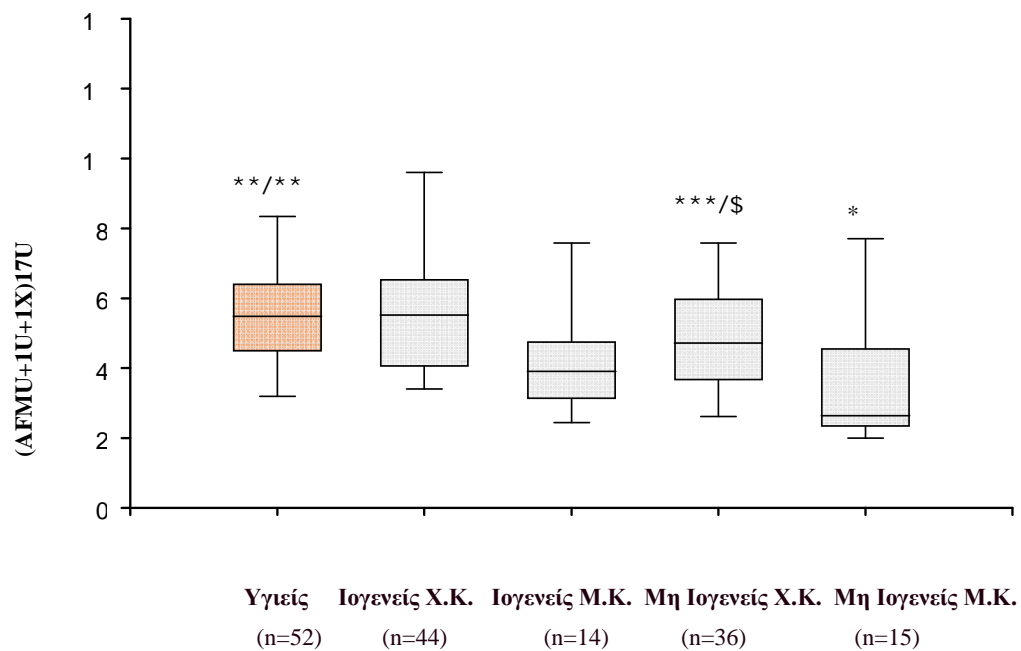
Η ανάλυση Mann-Whitney στους **μη καπνιστές** μεταξύ του συνόλου των μη κίρρωτικών ασθενών με ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθεια και του συνόλου των κίρρωτικών ασθενών με ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθεια είναι  $p \leq 0.001$ . Αντίστοιχα, η ανάλυση Mann-Whitney μεταξύ του συνόλου των μη κίρρωτικών ασθενών με μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθεια και του συνόλου των κίρρωτικών ασθενών με μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθεια είναι, επίσης,  $p \leq 0.001$  (σχήμα 12).



**Σχήμα 12.** Επίδραση των τιμών του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U στους μη καπνιστές με βάση την αιτιολογία και τη βαρύτητα της ηπατοπάθειας, όπου:

- \*  $p < 0.05$  μεταξύ Ιογενούς Χ.Κ. και Μη Ιογενούς Χ.Κ.,
- ^^  $p < 0.01$  μεταξύ Ιογενούς Μ.Κ. και Μη Ιογενούς Μ.Κ.,
- %%  $p < 0.01$  μεταξύ Υγιών και όλων των επιμέρους κατηγοριών,
- ##  $p < 0.01$  μεταξύ Ιογενούς Χ.Κ. και Μη Ιογενούς Μ.Κ.,
- !!  $p < 0.01$  μεταξύ Ιογενούς Μ.Κ. και Μη Ιογενούς Χ.Κ.

Αντίστοιχα, η ανάλυση Mann-Whitney στους **καπνιστές** μεταξύ του συνόλου των μη κίρρωτικών ασθενών με ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθεια και του συνόλου των κίρρωτικών ασθενών με ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθεια είναι  $p=0,176$ . Αντίστοιχα, η ανάλυση Mann-Whitney μεταξύ του συνόλου των μη κίρρωτικών ασθενών με μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθεια και του συνόλου των κίρρωτικών ασθενών με μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθεια είναι, επίσης,  $p=0,129$  (σχήμα 13).



**Σχήμα 13.** Επίδραση των τιμών του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U στους καπνιστές με βάση την αιτιολογία και τη βαρύτητα της ηπατοπάθειας, όπου:

Όπου: \*\*  $p < 0.01$  μεταξύ υγείων και Μη Ιογενούς M.K.,

\$\$  $p < 0.01$  μεταξύ Ιογενούς X.K. και Μη Ιογενούς X.K.,

\*\*\*  $p \leq 0.001$  μεταξύ υγείων και Μη Ιογενούς X.K.

Σε ανάλυση Mann-Whitney μεταξύ **καπνιστών και μη καπνιστών** στις συνολικές κατηγορίες αναδεικνύονται σημαντικές στατιστικά μεταβολές:

- μεταξύ των κίρρωτικών, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των μη κίρρωτικών, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των ασθενών με «ανενεργό» νόσο, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των ασθενών με «ενεργή» νόσο μη κίρρωτικών, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των κίρρωτικών με αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p \leq 0.001$ ),
- μεταξύ των κίρρωτικών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, ( $p = 0.005$ ).

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι υπάρχουσες εργαστηριακές δοκιμασίες για την εκτίμηση της ηπατικής λειτουργίας (όπως αλβουμίνη, παράγοντες πήκτικότητας, χολοστατικά ένζυμα κ.ο.κ. αποτελούν αδρούς δείκτες ηπατικής λειτουργίας. Μεταβάλλονται σε προχωρημένη ηπατική νόσο, έχουν μειωμένη ευαισθησία σε πρώιμα στάδια ηπατοπάθειας και δε μας επιτρέπουν να εκτιμήσουμε τη λειτουργικότητα σε επίπεδο ηπατοκυττάρου.

Για το λόγο αυτό καταβάλλονται τα τελευταία χρόνια προσπάθειες για την ανάπτυξη μια ασφαλούς, αξιόπιστης, μη επεμβατικής, απλής και σχετικά μικρού κόστους μεθόδου που θα επιτρέπει την εκτίμηση βλάβης σε επίπεδο ηπατικού κυττάρου και επομένως την έγκαιρη διάγνωση ηπατοκυτταρικής δυσλειτουργίας σε προωμότερα στάδια ηπατικής νόσου.

Οι δοκιμασίες που αντανακλούν την ηπατική μικροσωμιακή λειτουργία (όπως η κάθαρση αντιπυρίνης, η δοκιμασία αναπνοής αμινοπυρίνης, η δοκιμασία αποβολής γαλακτόζης) είναι μάλλον πολύπλοκες, έχουν μεγάλο κόστος και χρησιμοποιούνται κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς.

Η απουσία γενετικού πολυμορφισμού στη δραστηριότητα του CYP1A2 συμφωνεί με αρκετές μελέτες (Grant et al., 1983; Kalow and Tang, 1991; Rasmussen and Brosen, 1996; Saruwatari et al., 2002; Hong et al., 2004), όπως έχει ήδη αναφερθεί προηγούμενα.

Ο μεταβολικός λόγος  $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$  που χρησιμοποιούμε στην κλινική μελέτη είναι ίσως ο πιο χρησιμοποιούμενος από τους λόγους-δείκτες της δραστηριότητας του CYP1A2 (Campbel et al., 1987; Kalow and Tang 1991). Ο παραπάνω μεταβολικός λόγος υπολογίστηκε σε μεμονωμένο δείγμα ούρων που ελήφθει μετά την από του στόματος χορήγηση 200mg καφεΐνης, αφού αρχικά προηγήθηκε 48ωρη αποχή από μεθυλοξανθίνες και φάρμακα (όλα, εκτός από τα απαραίτητα). Η αξιοπιστία της μεθόδου υπολογισμού του παραπάνω λόγου σε μεμονωμένο δείγμα ούρων έχει ελεγχθεί κατά το παρελθόν τόσο σε ομάδες υγιών, όσο και σε ηπατοπαθείς με ικανοποιητικά αποτελέσματα (Notarianni et al., 1995; Rasmussen and Brosen 1996; Denaro et al., 1996). Εντούτοις, οι μελέτες με ηπατοπαθείς που έχουν χρησιμοποιήσει τον παραπάνω λόγο είτε χρησιμοποιούσαν ούρα 24ώρου (Bechtel et al., 2000; Lelouet et al., 2001), είτε περιελάμβαναν μικρό

δείγμα συμμετεχόντων (Denaro et al., 1996). Μελέτες του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης σε ηπατοπαθείς σε ούρα 24ώρου, όπου έλαβε μέρος αξιοσημείωτος αριθμός συμμετεχόντων έχουν γίνει για ηπατοπαθείς κίρρωτικούς αλκοολικής αιτιολογίας (Bechtel et al., 2000) και ασθενείς με ΠΧΚ (Lelouet et al., 2001). Για τη μελέτη του μεταβολικού αυτού λόγου της καφεΐνης χρησιμοποιείται ένα σημαντικό δείγμα ηπατοπαθών με αξιόπιστη ταξιμόνηση των ασθενών ανάλογα με την αιτιολογία και τη βαρύτητα της ηπατοπάθειας. Με τον τρόπο αυτό ελέγχεται αν και με ποιο τρόπο επηρεάζεται η δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2 συνολικά σε ηπατοπάθειες, αλλά και σε κάθε επιμέρους κατηγορία, ανάλογα με τη βαρύτητα και την αιτιολογία της ηπατικής νόσου. Παράλληλα, συγκεντρώθηκε ένα αξιόπιστο δείγμα υγιών σε κατά το δυνατό αντιστοιχία ηλικίας και φύλου, ώστε να συνεκτιμηθούν με αξιοπιστία εξωγενείς παράγοντες, όπως είναι το κάπνισμα, το φύλο και η ηλικία, που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2.

Αξίζει να σημειωθεί πως η ανοσολογική μέθοδος μέτρησης κάθαρσης καφεΐνης από τη σίελο απαιτεί τη λήψη δείγματος σιέλου, αλλά και αίματος δυο φορές (κατά την κατάκλιση και κατά την αφύπνιση). Έτσι, η μέθοδος καθίσταται πιο πολύπλοκη και αρκετά επεμβατική σε σχέση με τον υπολογισμό μεταβολικών λόγων καφεΐνης από τα ούρα. Επιπρόσθετα, στην κλινική πράξη υπάρχουν σημαντικοί περιορισμοί, προκειμένου να προσδιοριστεί η φαρμακοκινητική της καφεΐνης σε πλάσμα και σίελο. Η μέτρηση της κάθαρσης καφεΐνης στο πλάσμα απαιτεί συνεχείς αιμοληψίες για παρατεταμένη περίοδο μετά την αρχική χορήγηση. Επιπρόσθετα, λόγω της διασταυρούμενης αντίδρασης που υπάρχει με άλλες μεθυλοξανθίνες, το τεστ για κάθαρση καφεΐνης από τη σίελο ενδέχεται να μην είναι ολοκληρωτικά ειδικό για καφεΐνη, ενώ η βιοδιαθεσιμότητα της καφεΐνης ενδέχεται να επάγεται από παράγοντες, όπως το pH της σιέλου. Επίσης, σοβαρό μειονέκτημα της μεθόδου κάθαρσης καφεΐνης από τη σίελο είναι οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται στις συγκεντρώσεις της καφεΐνης στη σίελο. Το 30% της καφεΐνης στο πλάσμα είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η κατανομή της καφεΐνης στη σίελο. Επιπρόσθετα, η κατανομή της στη σίελο επηρεάζεται από δυσλειτουργίες των παρωτίδων, αλλά και από καταστάσεις που προκαλούν μεταβολές στη σύνδεση του μορίου της καφεΐνης με πρωτεΐνες. Έτσι, λοιπόν, σε προχωρημένη ηπατική νόσο που συνοδεύεται από υπολευκωματιναιμία η μέθοδος ίσως χάνει την αξιοπιστία της (Lewis and Rector, 1992). Αντιθέτως, ο μεταβολικός λόγος της καφεΐνης που χρησιμοποιούμε στη μελέτη δεν επηρεάζεται από τη νεφρική ροή αίματος και δεν



εξαρτάται ούτε και από τη νεφρική λειτουργία, ούτε από τη σωληναριακή απέκκριση (Campbell et al., 1999).

Ανάλογα, σημαντικό μειονέκτημα της δοκιμασίας αναπνοής της καφεΐνης είναι ότι απαιτείται ειδικός εξοπλισμός για τη ραδιοσήμανση της καφεΐνης και για τη μέτρηση του ραδιοεπισημασμένου CO<sub>2</sub> στον εκπνεόμενο αέρα και οι συμμετέχοντες πρέπει να παραμένουν κατά τη διάρκεια της εξέτασης σε ήρεμη σταθερή κατάσταση, ώστε να μην υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις στην ποσότητα εκπνεόμενου αέρα.

Επομένως, η εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 με τη βοήθεια των μεταβολικών λόγων καφεΐνης χρησιμοποιώντας ένα μεμονωμένο δείγμα ούρων είναι μια ευαίσθητη, αξιόπιστη, ποσοτική δοκιμασία της ηπατικής λειτουργίας, ιδιαίτερα για τους μη καπνιστές, η οποία θα μπορούσε να βελτιώσει θεαματικά τη διάγνωση του σταδίου και την πρόγνωση στα χρόνια ηπατικά νοσήματα. Όταν απαιτούνται ούρα 24ώρου καθίσταται πιο δύσκολη η συναίνεση, η συνεργασία και η συμμόρφωση των συμμετεχόντων.

Στις υποκατηγορίες που μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν δεν υπήρχε πάντοτε απόλυτη αντιστοιχία ηλικίας και φύλου. Εντούτοις, όπως είδαμε, οι δυο αυτοί παράγοντες δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη δραστηριότητα του CYP1A2. Πράγματι, σε προηγούμενη μελέτη οι Shimada et al. (1994), δε βρήκαν διαφορές στο περιεχόμενο και στη δραστηριότητα του κυτοχρώματος P450 συνολικά, αλλά και σε επιμέρους ισοένζυμα, μεταξύ των οποίων και του CYP1A2 σε υγιείς και ασθενείς ηπατοπαθείς ηλικίας 12-73 ετών. Επιπρόσθετα, οι Park et al. (2003) μελετώντας απέκκριση ραδιοεπισημασμένης καφεΐνης από την αναπνοή επίσης δε βρήκαν σημαντική συσχέτιση ηλικίας και δραστηριότητας του CYP1A2. Αντίθετα, οι Schnegg and Lauterburg (1986), σε μελέτη αναφέρουν πως η κάθαρση καφεΐνης και η απομεθυλίωση της 14C-αμινοπυρίνης ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε υγιείς ηλικίας άνω των 70 ετών σε σχέση με νεότερους υγιείς. Στη δική μας κλινική μελέτη συμμετείχαν 8 υγιείς (ποσοστό 4,85% επί του συνόλου των υγιών) και 30 ηπατοπαθείς (ποσοστό 8,8% επί του συνόλου των ηπατοπαθών) ηλικίας άνω των 70 ετών. Έτσι, ακόμη και αν θεωρήσουμε πως υπάρχει επίδραση αυτών των ηλικιών πάνω στη δραστηριότητα του CYP1A2, αυτή θα είχε μικρή συνολικά επίδραση στην ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης.

Η επίδραση του φύλου στη δραστηριότητα του CYP1A2 έχει μελετηθεί με αντιφατικά αποτελέσματα. Οι Vistisen et al. (1992) και οι Rasmussen and Brosen (1996) παρατήρησαν κατά 16% και 14% υψηλότερες τιμές στη δραστηριότητα του

CYP1A2 στους άντρες χρησιμοποιώντας το μεταβολικό λόγο  $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$  σε 335 και 277 υγιείς Καυκάσιους, αντίστοιχα. Επίσης, οι Tantcheva-Poór et al. (1999) παρατήρησαν 10% υψηλότερες τιμές στη δραστηριότητα του CYP1A2 στους άντρες χρησιμοποιώντας το μεταβολικό λόγο 17X/ 137X από τη σίελο σε 786 υγιείς Καυκάσιους. Αντιθέτως, σε μελέτες στις οποίες συμμετείχαν 20-245 υγιείς, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη δραστηριότητα του CYP1A2 μεταξύ αντρών και γυναικών, χρησιμοποιώντας το μεταβολικό λόγο  $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$  (Carrillo and Benitez., 1996; Kalow and Tang, 1991; Catteau et al., 1995, Kashuba et al., 1998; Sinues et al., 1994; Saruwatari et al., 2002). Λαμβάνοντας υπόψη τις προαναφερθείσες μελέτες, φαίνεται πως το φύλο παρουσιάζει ίσως μικρή επίδραση στη δραστηριότητα του CYP1A2, η οποία αναδεικνύεται, όταν μελετάται μεγάλος αριθμός υγιών.

Είναι αποδεκτό από τις πρώτες μελέτες σε υγιείς πως το κάπνισμα επάγει σημαντικά τη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2 (Carrillo and Benitez., 1996; Kalow and Tang, 1991; Catteau et al., 1995). Αρωματικές αμίνες που εμπεριέχονται στον καπνό του τσιγάρου, όπως είναι το 4-αμινοδιφαινύλιο (ABP), η 2-ναφθυλαμίνη (2-NA) και η ο-τολουϊδίνη (Butler et al, 1989) και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονανθράκες (PAHs) φαίνεται πως επάγουν τη δραστηριότητα του CYP1A2 κυρίως μέσω μιας μεταγραφικής διαδικασίας, η οποία εξαρτάται από τον Ah κυτταροπλασματικό υποδοχέα αρωματικών υδρογονανθράκων, αλλά και από άλλους άγνωστους παράγοντες (Ding et al, 2005). Εντούτοις, σε μελέτες με ηπατοπαθείς δεν έχει ληφθεί μέχρι στιγμής υπόψη ο εξωγενής αυτός παράγοντας κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων (Denaro et al., 1996; Bechtel et al., 2000; Lelouet et al., 2001). Για το λόγο αυτό χωρίσαμε τους συμμετέχοντες σε δυο μεγάλες κατηγορίες: καπνιστές και μη καπνιστές, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της ηπατικής νόσου ως ανεξάρτητου παράγοντα στη δραστηριότητα του CYP1A2.

Η ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης δεν ανέδειξε θετική επίδραση του δείκτη μάζας σώματος των υγιών εθελοντών στη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2 των υγιών εθελοντών. Οι Caraco et al., 1995 διερεύνησαν τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες της αντιτυρίνης σε παχύσαρκα άτομα και κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η παχυσαρκία έχει αμελητέα επίδραση στην οξειδωτική μεταβολική ικανότητα του ήπατος. Όσον αφορά το CYP1A2, δεν έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση

μεταξύ της δραστηριότητας του ενζύμου, όπως αυτή προσδιορίστηκε με τον μεταβολικό λόγο (17U+17X)/137X στα ούρα, και του σωματικού βάρους (Le Marchand et al, 1997). Μια στατιστικώς σημαντική αλλά σχετικώς μικρή, αρνητική επίδραση του δείκτη σωματικής μάζας στη δραστηριότητα του CYP1A2 έχει παρατηρηθεί σε μελέτη κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε, όπως και προηγουμένως, η καφεΐνη ως φάρμακο-δείκτης. Σύμφωνα με αυτήν, διαπιστώθηκε μεταβολή της βασικής κάθαρσης της καφεΐνης κατά 0,99 φορές για κάθε αύξηση του δείκτη μάζας σώματος κατά 1kg/m<sup>2</sup> (Tantcheva-Poór et al, 1999).

Στις **ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθειες στους **μη καπνιστές** αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR μεταξύ των υγιών και όλων των επιμέρους κατηγοριών των ασθενών, με εξαίρεση τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C. Αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ακόμη και μεταξύ των υγιών και των ασθενών με ανενεργό ηπατίτιδα B. Η μέθοδος επομένως καταφέρνει να «ανιχνεύσει» στους μη καπνιστές ακόμη και ήπιες «βλάβες» στην ηπατοκυτταρική λειτουργία. Η διάκριση αυτή εντοπίζεται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Επιπρόσθετα, αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR μεταξύ των μη καπνιστών μη κίρρωτικών ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπαθών και των αντίστοιχων κίρρωτικών, με εξαίρεση μεταξύ των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα B και των ασθενών με κίρρωση HBV αιτιολογίας. Τούτο ίσως υποδηλώνει την προοπτική χρησιμοποίησης της μεθόδου ως μη επεμβατικού διαγνωστικού δείκτη για το πότε η ηπατοπάθεια ιογενούς αιτιολογίας μεταπίπτει στην κίρρωση. Εντούτοις, αξίζει να επισημανθεί πως η διάκριση αυτή δεν ήταν εφικτή στην παρούσα μελέτη μεταξύ των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα B και των ασθενών με κίρρωση HBV αιτιολογίας. Το ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR κατά αντιστοιχία μεταξύ των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C και των ασθενών με κίρρωση HCV αιτιολογίας μπορεί απλά να οφείλεται στο ότι στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C συμπεριλαμβάνονται και ασθενείς με φυσιολογικές τρανσαμινάσες και επομένως ίσως ηπιότερη ηπατοκυτταρική δυσλειτουργία, σε σχέση με τους χρονίως πάσχοντες από ηπατίτιδα B. Στον ίδιο ίσως λόγο οφείλεται και το ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υγιών και των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C.

Αξίζει να σημειωθεί πως το ένζυμο CYP2A6, που αποτελεί μέλος της υπεροικογένειας CYP και συμμετέχει επίσης στο μεταβολισμό της καφεΐνης,

αναφέρεται πως δρα ως ηπατικό αυτοαντιγόνο σε ασθενείς με ιογενούς αιτιολογίας ηπατίτιδα, η οποία είχε προκληθεί από φλαβοϊούς (1 HGV/GBVC, 5 HCV) και ειδικά σε ασθενείς θετικούς σε HCV/anti-LKM-1 (Dalekos GN, Obermayer-Straub P et al, 2003). Σε κανέναν από τους ασθενείς δεν αναγνωρίστηκε CYP1A2 ως αυτοαντιγόνο. Είναι πιθανό η δράση αυτή του CYP2A6 σε ασθενείς με ηπατίτιδα C να επηρεάζει με τέτοιο τρόπο το μεταβολισμό της καφεΐνης από το ηπατοκύτταρο, ώστε να επέρχεται μικρότερη μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 σε αυτούς σε σχέση με τους ασθενείς που πάσχουν από ηπατίτιδα HBV αιτιολογίας.

Η αξιολογούμενη ευαισθησία της μεθόδου να εντοπίζει μεταβολές στη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2 φαίνεται να εξαλείφεται στους **καπνιστές** ηπατοπαθείς **ιογενούς** αιτιολογίας. Πράγματι, δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2 ούτε μεταξύ των υγιών και των κίρρωτικών ηπατοπαθών. Επιπλέον, μεταξύ **καπνιστών και μη καπνιστών** στις **ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθειες αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλες τις επιμέρους συγκρίσεις.

Έχει ήδη αναφερθεί η επαγωγική δράση του καπνίσματος στη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2. Η επίδραση αυτή φαίνεται να είναι τόσο ισχυρή, ώστε αντιρροπεί τη μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου CYP1A2 που αναμένεται λόγω της φλεγμονής και της επερχόμενης από την ηπατοπάθεια ηπατοκυτταρικής δυσλειτουργίας. Πραγματικά, από μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας προκύπτει πως υπάρχει μια αντιφλεγμονώδης δράση της νικοτίνης πάνω στα μακροφάγα. Πιο συγκεκριμένα, το νευρικό σύστημα μέσω του πνευμονογαστρικού νεύρου μπορεί να καταστείλει σημαντικά την απελευθέρωση TNF από τα μακροφάγα και να περιορίσει τη φλεγμονή. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ενός «νικοτινικού υποδοχέα άλφα7». Ο φυσιολογικός αυτός μηχανισμός είναι γνωστός ως «χολινεργική αντιφλεγμονώδης οδός» (Wang et al, 2003). Σε άλλη μελέτη εξετάζεται η επίδραση της νικοτίνης στην παραγωγή προφλεγμονώδων διαμεσολαβητικών ουσιών μέσω της ενεργοποίησης μονοκυττάρων (Yoshikawa et al, 2006). Σε ανάλογη μελέτη αναφέρεται πως θεραπεία με νικοτίνη ρυθμίζει τη «χολινεργική αντιφλεγμονώδη οδό» και μειώνει τη θνητότητα σε ήδη εγκατεστημένη σήψη (Donato et al, 2006). Ίσως λοιπόν και η νικοτίνη που χορηγείται εξωγενώς με το κάπνισμα να έχει αντιφλεγμονώδη δράση στη χρόνια ηπατίτιδα στα ηπιότερα τουλάχιστον στάδια. Η υπόθεση αυτή χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Άξιο μελέτης θα ήταν ίσως και η υπόθεση πως οι καπνιστές

παραμένουν ενδεχομένως μη κίρρωτικοί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα πριν μεταπέσουν σε κίρρωση σε σχέση με τους μη καπνιστές.

Στις **μη ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθειες στους **μη καπνιστές** αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR μεταξύ των υγιών και όλων των επιμέρους κατηγοριών των ασθενών, ακόμη και των μη κίρρωτικών, με εξαίρεση μεταξύ υγιών και μη κίρρωτικών ασθενών με ηπατοπάθεια αλκοολικής αιτιολογίας. Επομένως, και εδώ η μέθοδος καταφέρνει να ανιχνεύσει στους μη καπνιστές μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου CYP1A2, ακόμη και στους μη κίρρωτικούς. Στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR αναδεικνύονται μόνο μεταξύ του συνόλου των ασθενών με ΑΗ και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας. Τούτο ενδεχομένως να οφείλεται στο ότι στους ασθενείς με ΑΗ συμπεριλαμβάνονται και 11 ασθενείς με κίρρωση. Δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR στις επιμέρους συγκρίσεις μεταξύ των μη κίρρωτικών διαφορετικής αιτιολογίας. Αντίστοιχα, δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR στις επιμέρους συγκρίσεις μεταξύ των κίρρωτικών διαφορετικής αιτιολογίας. Δηλαδή η μέθοδος είναι ευαίσθητη στο να ανιχνεύει μεταβολές στη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2 ανάλογα με τη «βαρύτητα» (κίρρωση, μη κίρρωση) του ηπατικού νοσήματος, όχι όμως και ανάλογα με την αιτιολογία της υποκείμενης ηπατοπάθειας.

Στις **μη ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθειες στους **καπνιστές** τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά. Στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR αναδεικνύονται σε λίγες κατηγορίες. Πιο συγκεκριμένα στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR αναδεικνύονται μεταξύ των υγιών και των ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα χωρίς ή με κίρρωση, μεταξύ των υγιών και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας και μεταξύ των υγιών και του συνόλου των ασθενών με ηπατοπάθεια μη ιογενούς αιτιολογίας. Τούτο ίσως υποδηλώνει πως η αλληλεπίδραση αλκοόλ και ηπατικής νόσου στη μείωση της δραστηριότητας CYP1A2 αντιρροπεί τη θετική επίδραση του καπνίσματος. Ειδικά όσον αφορά την αλκοολική ηπατοπάθεια υπάρχει διπλός μηχανισμός με τον οποίο μειώνεται η δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2. Ο πρώτος αφορά την κατασταλτική επίδραση της αιθανόλης αυτής καθεαυτής στη δραστηριότητα του CYP1A2. Ο δεύτερος αφορά την υπέρβαση της ηπατικής νόσου και της καταστροφής

που επέρχεται στο ηπατοκύτταρο μέσω της αύξησης του οξειδωτικού στρες και της παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου.

Η ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας είναι η μόνη ηπατική νόσος, στην οποία υπήρχε στατιστικά σημαντική μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 στους μη καπνιστές, αλλά και στους καπνιστές. Υπενθυμίζεται πως στην κατηγορία αυτή όλοι οι συμμετέχοντες ασθενείς ήταν μη κίρρωτικοί. Τούτο ίσως υποδηλώνει αυξημένη ηπατοκυτταρική βλάβη στη νόσο ήδη από τα αρχόμενα στάδια αυτής. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η αύξηση του οξειδωτικού στρες μέσω της παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου ως αποτέλεσμα μιτοχονδριακών ανωμαλιών και καταστολής του κυτοχρώματος P450 θεωρείται πως θα μπορούσε να είναι ένας μηχανισμός με τον οποίο το λιπώδες ήπαρ μη αλκοολικής αιτιολογίας «οδηγείται» σε βλάβες παρόμοιες της αλκοολικής στεατοηπατίτιδας (Sanyal et al., 2005). Στην αλληλουχία των γεγονότων αυτών είναι πιθανόν να οφείλεται η μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2 κατά τη NAFLD/NASH και την αλκοολική νόσο καθώς, όπως ήδη έχει αναφερθεί στο γενικό μέρος στην ανάπτυξη της νόσου, ο παθογενετικός μηχανισμός αυτός είναι κοινός για την ανάπτυξη τόσο της αλκοολικής, όσο και της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας. Επομένως, από τη στιγμή που εδώ απουσιάζει η κατασταλτική επίδραση της αιθανόλης και παρόλα αυτά αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR μεταξύ των υγιών και των ασθενών με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας φαίνεται πως η μείωση στη δραστηριότητα του CYP1A2 και στην αλκοολικής αιτιολογίας ηπατοπάθεια προκύπτει κυρίως λόγω της κατασταλτικής επίδρασης της ηπατικής νόσου.

Μελέτες *in vivo* για τη δραστηριότητα του CYP1A2 σε ασθενείς με ηπατοπάθεια μη αλκοολικής αιτιολογίας δεν αναφέρονται. Εντούτοις, σε *in vitro* μελέτη η επώαση καλλιέργειας ανθρώπινων ηπατοκυττάρων με ελεύθερα, μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα είχε ως αποτέλεσμα συσσώρευση λιπιδίων στο κυτταρόπλασμα. Σε ηπατοκύτταρα με στεάτωση >40% παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας των ενζύμων CYP1A2 και CYP3A4, καθώς και μείωση στα επίπεδα του mRNA των CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2E1, CYP2D6, και CYP3A4, τα οποία βρέθηκαν χαμηλότερα κατά 55-75% σε σχέση με κύτταρα που δεν είχαν επωαστεί με λιπαρά οξέα (Donato et. al, 2006). Σε πλήρη συμφωνία με την μειωμένη έκφραση του CYP1A2, παρατηρήθηκε και μειωμένη σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, μικροσωμιακή Ο-αποαιθυλίωση της 7-αιθοξικουμαρίνης, κατάλυση ειδική για το CYP1A2, στα δείγματα ήπατος με στεάτωση.



Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές των CMR μεταξύ των υγιών και του συνόλου των ασθενών με ηπατοπάθεια μη ιογενούς αιτιολογίας οφείλεται ενδεχομένως στις στατιστικά σημαντικές διαφορές των CMR στις δυο προηγούμενες κατηγορίες.

Μεταξύ **καπνιστών και μη καπνιστών** στις **μη ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθειες αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές σε λίγες επιμέρους συγκρίσεις. Μεταξύ αυτών στους ασθενείς με ΑΗ. Τούτο ίσως υποδηλώνει ότι υπάρχει και ένας επιπλέον διαφορετικός αιτιοπαθογενετικός μηχανισμός στην ΑΗ. Αξίζει να σημειωθεί πως έχουν βρεθεί αντισώματα anti-CYP1A2, τα οποία θεωρούνται ότι έχουν υψηλή ειδικότητα, χαμηλή όμως ευαισθησία για την επαγόμενη από φάρμακα (tienilic acid) ηπατίτιδα και την ΑΗ ως μέλος του συνδρόμου Autoimmune Polyglandular Syndrome-type1 (Obermayer P. et al, 2001).

Στις συγκρίσεις μεταξύ ασθενών με **ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθειες και **μη ιογενούς** αιτιολογίας ηπατοπάθειες στους **μη καπνιστές** αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR μόνο μεταξύ των ασθενών με ΑΗ και των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας και μεταξύ των ασθενών με αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο και των ασθενών με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας. Τούτο ίσως οφείλεται στο ότι στους ασθενείς με ηπατοπάθεια HBV αιτιολογίας συμπεριλαμβάνονται και ασθενείς με ανενεργό ηπατίτιδα Β και επομένως, ηπιότερη ηπατοκυτταρική δυσλειτουργία, σε σχέση με τους ασθενείς με ΑΗ και αυτοάνοσο χολοστατικό σύνδρομο. Στις υπόλοιπες κατηγορίες δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR, εύρημα που συνηγορεί στο ότι η μέθοδος δεν ανιχνεύει μεταβολές στη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2 ανάλογα με την αιτιολογία της υποκείμενης ηπατοπάθειας.

Στους **καπνιστές** τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά. Δεν υπάρχει καν πλήρης αντιστοιχία με τα ευρήματα στους μη καπνιστές. Έτσι, λοιπόν, και εδώ δε φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση με την αιτιολογία της νόσου.

Στην πιο **συνολική προσέγγιση**, όπου οι ασθενείς ταξινομήθηκαν ανάλογα με τη «**βαρύτητα**» της ηπατικής νόσου, επιβεβαιώνονται όσα ήδη έχουμε αναφέρει πιο πάνω. Στους **μη καπνιστές** αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2 σε όλες τις επιμέρους συγκρίσεις. Εξάιρεση, όπως αναμένεται από όσα αναλύθηκαν παραπάνω, αποτελεί η σύγκριση μεταξύ των ασθενών με «ανενεργό» νόσο και των ασθενών με «ενεργή» νόσο μη κίρρωτικών. Και εδώ η μέθοδος στους μη καπνιστές ανιχνεύει στατιστικά σημαντικές διαφορές

στη δραστηριότητα του CYP1A2 ακόμη και σε ήπιες «βλάβες» της ηπατοκυτταρικής λειτουργίας (μεταξύ των υγιών και των ασθενών με «ανενεργό» νόσο), αλλά δεν καταφέρνει να διακρίνει στατιστικά σημαντικές διαφορές στη δραστηριότητα του CYP1A2 σε ήπιες μεταβολές στην ηπατοκυτταρική δυσλειτουργία, όταν ήδη αυτή έχει εγκατασταθεί (μεταξύ των ασθενών με «ανενεργό» νόσο και των ασθενών με «ενεργή» νόσο μη κίρρωτικών). Εντούτοις, αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2 μεταξύ των ασθενών με «ενεργή» νόσο και των κίρρωτικών με αντιρροπούμενη κίρρωση. Επομένως, και σε αυτές τις συγκρίσεις η μέθοδος είναι χρήσιμη ως δείκτης για το πότε η ηπατοπάθεια μεταπίπτει σε κίρρωση.

Παρατηρούμε πως στους **καπνιστές** για ακόμη μια φορά η μέθοδος παρουσιάζει αδυναμία στο να μας προσφέρει τις πληροφορίες που δύναται να παρέχει σχετικά με τη «βαρύτητα» της ηπατικής νόσου στους μη καπνιστές.

Στη **συνολική** ανάλυση στους **μη καπνιστές** μεταξύ των υγιών, των μη κίρρωτικών ασθενών και των κίρρωτικών ασθενών στατιστικά σημαντικές διαφορές των μεταβολικών λόγων CMR αναδεικνύονται σε όλες τις συγκρίσεις. Τούτο δεν ισχύει και στους **καπνιστές**.

Αξίζει να σημειωθεί πως στην ανάλυση μεταξύ **καπνιστών και μη καπνιστών** στις συνολικές κατηγορίες αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλες τις συγκρίσεις, εύρημα που για ακόμη μια φορά αποδεικνύει την καταλυτική επίδραση του καπνίσματος στη δραστηριότητα του CYP1A2.

Είναι αποδεκτό γενικώς πως σε ηπατική νόσο παρατηρείται μείωση του μεταβολισμού των φαρμάκων, όπως ήδη έχει αναπτυχθεί στο αντίστοιχο κεφάλαιο. Όπως είδαμε, για τη μείωση αυτή ευθύνονται μεταξύ των άλλων η μείωση του αριθμού των ηπατοκυττάρων λόγω νέκρωσης και ανάπτυξης ινώδους συνδετικού ιστού, αλλά και η ελάττωση της μεταβολικής ικανότητας των μικροσωματικών ενζύμων του ήπατος (Bass and Williams, 1988; McLean and Morgan, 1991; Scott et al., 1988; Howden et al., 1989). Έτσι, για παράδειγμα η επίδραση της ηπατικής νόσου σε ενζυμικά συστήματα του P450 προσεγγίσθηκε σε πρόσφατη μελέτη με τη χρήση ενός κοκτέιλ 4 φαρμάκων (Frye R.F. et al., 2006). Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 20 ηπατοπαθείς με ηπατικά νοσήματα διαφορετικής αιτιολογίας και βαρύτητας και 20 υγιείς κατά αντιστοιχία ηλικίας και φύλου. Παρατηρήθηκε, λοιπόν, διαφορετική επίδραση της ηπατικής νόσου στη μεταβολική δραστηριότητα των υπό μελέτη



ενζύμων του P450 και πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη επιδείνωση παρατηρήθηκε στο ένζυμο CYP2C19 και κατόπιν στα CYP1A2, CYP2D6 και CYP2E1.

Μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 σε ηπατοπάθεια έχει παρατηρηθεί από τις πρώτες προσπάθειες μελέτης της μεθόδου.

Στη διεθνή βιβλιογραφία οι Bechtel et al. (2000) παρατήρησαν σημαντική μείωση του μεταβολισμού της καφεΐνης σε 226 κίρρωτικούς αλκοολικής αιτιολογίας. Συγκεκριμένα, ανέφεραν πως ανεξάρτητα από τη σταδιοποίηση της κίρρωσης κατά Child ο μεταβολισμός της καφεΐνης μειώθηκε σχεδόν στο μισό. Η μείωση του μεταβολισμού αποδόθηκε κατά κύριο λόγο σε μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2. Παρατηρήθηκε μάλιστα διαφορετική επίδραση της κίρρωσης, λιγότερο σημαντική, στο CYP2A6. Αυτό σύμφωνα με τους μελετητές δείχνει ενδεχομένως μια υπάρχουσα μετατόπιση του μεταβολισμού από κύριες μεταβολικές οδούς (που οδηγούν στο σχηματισμό 17X) προς δευτερεύουσες (που οδηγούν στο σχηματισμό 37X). Επειδή ο μεταβολισμός της καφεΐνης μειώνεται σε μεγαλύτερη έκταση, αν η ασθένεια είναι σοβαρή και δεδομένης της ποικιλομορφίας στην εκφραστικότητα του μεταβολισμού στο ανθρώπινο είδος προτείνεται ότι η σύζευξη της δοκιμασίας της καφεΐνης με τις συνήθεις εργαστηριακές εξετάσεις θα μπορούσε να βελτιώσει την παρακολούθηση (follow up) ασθενών με αλκοολική κίρρωση.

Ανάλογες μελέτες (Ulrich et.al., 1992; Rodopoulos et.al., 1995; Denaro et.al., 1996) επισημαίνουν διαφορές στην απέκκριση καφεΐνης ανάμεσα σε υγιείς και ηπατοπαθείς ασθενείς. Εντούτοις, τα δείγματα των ασθενών ήταν μικρά και το θέμα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Συγκεκριμένα, σε μια από τις πρώτες μελέτες (Rodopoulos et.al., 1995), όπου μελετήθηκε η κάθαρση καφεΐνης στο πλάσμα και στα ούρα σε 11 υγιείς και σε 13 ασθενείς με χρόνια ηπατοπάθεια, ο χρόνος ημισείας ζωής ( $T_{1/2}$ ) της καφεΐνης ήταν περισσότερο παρατεταμένος στους κίρρωτικούς ασθενείς έναντι των υγιών και μάλιστα οι υψηλότερες τιμές παρουσιάστηκαν μεταξύ αυτών με σοβαρή νόσηση και μη αντισταθμιζόμενη ηπατική λειτουργία. Εντούτοις, όπως επισημαίνουν οι μελετητές, σε ασθενείς με βαρύτερη ηπατική νόσο είναι αναμενόμενο να υπάρχει απώλεια της μεταβολικής δραστηριότητας. Έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις τοξικότητας από καφεΐνη. Αυτή η μείωση θα μπορούσε ενδεχομένως να αποδοθεί στο μειωμένο αριθμό των λειτουργικών ηπατοκυττάρων. Σε μια τέτοια, όμως, περίπτωση θα ήταν αναμενόμενη μια παράλληλη και συμμετρική μείωση σε όλα τα στάδια της βιομετατροπής της καφεΐνης. Όμως, στους ασθενείς ο  $T_{1/2}$  ήταν μειωμένος στη N-3-απομεθυλίωση και στη N-7-απομεθυλίωση,

ενώ συνολικά η C8-οξείδωση και η N-ακετυλίωση παρέμεναν αμετάβλητες. Έτσι λοιπόν, προτείνεται πως ο παρατεταμένος  $T_{1/2}$  οφείλεται όχι μόνο σε ποσοτική μείωση του αριθμού των ηπατοκυττάρων, αλλά και σε περαιτέρω ποιοτική μείωση της λειτουργικής μάζας των ηπατοκυττάρων. Σε ασθενείς με αντιρροπούμενη κίρρωση υπήρξε κάποια αλληλεπικάλυψη με τον  $T_{1/2}$  των υγιών ατόμων, επισημαίνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τις δυσκολίες της χρησιμοποίησης της αποβολής της καφεΐνης για τη διάγνωση της ηπατικής βλάβης. Το ποσοστό των μεταβολιτών της οδού της παραξανθίνης στα ούρα ήταν χαμηλότερο στους ασθενείς σε σχέση με αυτό των υγιών. Στους ασθενείς η N-3-απομεθυλίωση και η N-7-απομεθυλίωση ήταν χαμηλότερες και η N-1-απομεθυλίωση υψηλότερη συγκριτικά με τους υγιείς.

Οι Denaro et al., (1996) χρησιμοποίησαν το λόγο  $AAMU +1X +1U /17U$  σε μεμονωμένο δείγμα ούρων από ηπατοπαθείς και συμπέραναν πως ο λόγος επηρεάζεται από την ηπατική νόσο και αντανακλά στη μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 σε ασθενείς με κίρρωση. Συγκεκριμένα χορήγησαν καφεΐνη σε ασθενείς με αλκοολική κίρρωση, ΠΧΚ και ηπατίτιδα Β και C, και διαπίστωσαν ότι η κάθαρση της καφεΐνης ήταν μειωμένη στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς. Ο μεταβολικός λόγος  $AAMU +1X +1U /17U$  βρέθηκε σημαντικά υψηλότερος στους υγιείς σε σχέση με τους ασθενείς με κίρρωση. Όμως σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα παρατηρήθηκε μεγάλη αλληλεπικάλυψη των τιμών με τις αντίστοιχες των υγιών. Δεν υπήρξε επίσης συσχέτιση του λόγου αυτού με την κατάταξη κατά Child-Pugh, όπως είχε δειχθεί σε άλλες μελέτες (Holstege et al., 1989; Scott et al., 1989). Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο ανωτέρω λόγος επηρεάζεται από την ηπατική νόσο και αντανακλά στη μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 σε άτομα με κίρρωση. Η μέτρηση αυτού του λόγου από ένα μεμονωμένο δείγμα ούρων αντανακλά την κάθαρση της καφεΐνης σε άτομα με κίρρωση, μπορεί να επαναληφθεί με ευκολία στον ίδιο ασθενή και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δοκιμασία ελέγχου του ήπατος. Εντούτοις, όπως επισημαίνουν οι ίδιοι ερευνητές (1990), χρήζει διερεύνησης και η τυχόν επίδραση της ποσότητας της δόσης καφεΐνης ή της χορήγησης πολλαπλών ροφημάτων καφέδων πάνω στο μεταβολικό λόγο.

Σε άλλη μελέτη (Ullrich et al., 1992) με μικρό αριθμό κίρρωτικών ασθενών (Child A=5, Child C=2), όπου εξετάστηκε το προφίλ της απέκκρισης της καφεΐνης και 14 από τους μεταβολίτες της με HPLC, βρέθηκε ότι υπήρχε σημαντική διαφορά ανάμεσα στους υγιείς και στους κίρρωτικούς.

Ανάλογα είναι και τα συμπεράσματα που προκύπτουν από άλλες δοκιμασίες που χρησιμοποιούν επίσης την καφεΐνη ως υπόστρωμα: τη μέτρηση της κάθαρσης καφεΐνης στη σίελο, τη μέτρηση της κάθαρσης της καφεΐνης στο πλάσμα και τη δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης.

Με τη μέτρηση της κάθαρσης καφεΐνης στη σίελο κατά τη διάρκεια της νύχτας σε νοσηλευόμενους ασθενείς με ηπατική νόσο η κάθαρση της καφεΐνης ήταν μειωμένη ακόμη και σε ηπατοπαθείς χωρίς κίρρωση (Jost et al, 1987). Σε παλιότερη εργασία (Renner et al, 1983) προτείνεται ότι και η δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης μπορεί να αποτελεί μια ποσοτική μέτρηση της δραστηριότητας του μικροσωμιακού συστήματος του ήπατος.

Αξίζει να σημειωθεί ότι από μελέτες φαίνεται πως ακόμη και η κάθαρση της καφεΐνης στο πλάσμα είναι σημαντικά μειωμένη σε κιρρωτικούς ασθενείς και ο χρόνος ημίσειας ζωής και νεφρικής απέκκρισης παρατείνεται σημαντικά (Desmond et al., 1980; Wietholz et al., 1981; Renner et al., 1984).

Σε άλλη δοκιμασία η κάθαρση της καφεΐνης στο πλάσμα είναι σημαντικά μειωμένη όχι μόνο σε κιρρωτικούς, αλλά και σε μη κιρρωτικούς ασθενείς (Wang et al., 1985). Η κάθαρση της καφεΐνης στο πλάσμα βρέθηκε σημαντικά μειωμένη όχι μόνο σε κιρρωτικούς, αλλά και σε μη κιρρωτικούς ασθενείς (Holstege A. et al, 1989).

Οι Scott et al. (1988 και 1989) επισήμαναν πως η κάθαρση καφεΐνης στο πλάσμα και η απέκκριση από τη σίελο σε ασθενείς με αντιρροπούμενη κίρρωση δεν παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους υγιείς. Σε μη αντιρροπούμενη κίρρωση παρατηρήθηκαν μεταβολές στο μεταβολισμό της καφεΐνης, αλλά και μια αξιοσημείωτη καθυστέρηση στην απέκκριση των μεταβολιτών που αποδόθηκαν σε μείωση της ηπατικής λειτουργικής μάζας και όχι σε εκσεσημασμένη μείωση του αριθμού των ηπατοκυττάρων, αφού όλοι οι ασθενείς σε βιοψία ήταν ανενεργοί. Εντούτοις, επισήμαναν πως οι μέσες τιμές των μεταβολικών λόγων ήταν υψηλότερες στους καπνιστές και αυτό ίσως επηρέασε τα αποτελέσματα, όσον αφορά τους ασθενείς με αντιρροπούμενη κίρρωση. Το δείγμα ήταν εξαιρετικά μικρό (16 και 19 κιρρωτικοί και 8 και 10 υγιείς, αντίστοιχα).

Η κάθαρση καφεΐνης στο πλάσμα μελετήθηκε επίσης σε 419 κιρρωτικούς και μη κιρρωτικούς ασθενείς διαφόρων αιτιολογιών (συγκεκριμένα ασθενείς με ιογενή ηπατίτιδα Β n = 79, με ιογενή ηπατίτιδα NANB n = 74, με ηπατοπάθεια αλκοολικής αιτιολογίας n = 143, με ΠΧΚ σταδίου I-IV n = 63 και με κρυπτιγενή κίρρωση n = 60) μετά από του στόματος χορήγηση 366 mg καφεΐνης (Joeres et al., 1993). Η κάθαρση

καφεΐνης ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε κίρρωτικούς αλκοολικής και κρυπτογενούς αιτιολογίας σε σχέση με τους υγιείς. Δε βρέθηκε σημαντική μείωση σε ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β και κίρρωση HBV αιτιολογίας. Αντίθετα με τα αναμενόμενα, σε ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β, με λιπώδη διήθηση ήπατος αλκοολικής αιτιολογίας και με ΠΧΚ είχαν σημαντικά υψηλότερη κάθαρση καφεΐνης σε σχέση με τους υγιείς. Επιπρόσθετα, παραδόξως, οι μελετητές δεν επιβεβαίωσαν την επαγωγή της δραστηριότητας του CYP1A2 από το κάπνισμα στους συμμετέχοντες. Οι μελετητές απέδωσαν την παρατηρούμενη υψηλότερη κάθαρση καφεΐνης στη λιπώδη διήθηση αλκοολικής αιτιολογίας και στην ενεργό ηπατίτιδα Β σε επαγωγή που προκαλείται στη δραστηριότητα του CYP1A2. Εντούτοις, είναι γνωστό πως το ένζυμο του P450 που επάγεται από το αλκοόλ είναι το CYP2E1. Από την άλλη, σε οξεία και χρόνια ηπατίτιδα ιογενούς αιτιολογίας αυξάνει η συγκέντρωση κυτταροκινών, όπως IL-1β, IL-6, TNF-α, INF-γ, TGF-β. Αυτές οι κυτταροκίνες με τη σειρά τους καταστέλλουν τη δραστηριότητα αρκετών ισοενζύμων, όπως CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP3A6 (Bleau M. et al., 2003). Επομένως, σε περιπτώσεις ιογενούς ηπατίτιδας μάλλον μείωση της κάθαρσης καφεΐνης θα αναμενόταν.

Με τη μέθοδο υπολογισμού του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης στο πλάσμα 17X/137X (με την οποία απαιτούνται λιγότερες αιμοληψίες από την κάθαρση καφεΐνης στο πλάσμα και άρα είναι λιγότερο επεμβατική μέθοδος) παρατηρήθηκε μείωση του μεταβολικού λόγου σε κίρρωτικούς, όχι όμως και σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα μετά από του στόματος χορήγηση 300 mg καφεΐνης (Jodynys-Liebert J. et al. 2004).

Με τη δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης οι Park et al. (2003) μελέτησαν 20 μη κίρρωτικούς ασθενείς που έπασχαν από χρόνια ηπατίτιδα Β και χρόνια ηπατίτιδα C και 20 ασθενείς με κίρρωση της ίδιας αιτιολογίας. Παρατήρησαν πως (α) η απέκκριση της καφεΐνης από την αναπνοή ήταν σημαντικά μειωμένη στους κίρρωτικούς συγκρινόμενη με τους υγιείς, αλλά και με τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα, (β) στους καπνιστές παρουσιάζεται λιγότερη μείωση της απέκκρισης καφεΐνης, αλλά και εδώ η μείωση της απέκκρισης της καφεΐνης είναι αξιοσημείωτη.

Στην ΠΧΚ οι Lelouet et al (2001) μετρώντας μεταβολίτες της καφεΐνης στα ούρα μελέτησαν 67 ασθενείς ταξινομημένους ιστολογικά κατά Scheuer. Κι εδώ παρατηρήθηκε μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2 τόσο περισσότερο, όσο οι ασθενείς ήταν ταξινομημένοι σε υψηλότερο ιστολογικά στάδιο. Επιπρόσθετα,

παρατηρήθηκε ότι ο μεταβολισμός της καφεΐνης κατά την ΠΧΚ επιδεινώθηκε κατά τρόπο διαφορετικό από αυτόν της αλκοολικής κίρρωσης.

Βιβλιογραφικές αναφορές δεν υπάρχουν σε σχέση με την επίδραση της ΠΣΧ στη δραστηριότητα του CYP1A2.

Τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα των περισσότερων από τις προαναφερθείσες μελέτες. Αυτή η διαπίστωση συνηγορεί υπέρ του ότι η εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 με τη χρήση μεμονωμένου δείγματος ούρων μετά από χορήγηση καφεΐνης από το στόμα αποτελεί αξιόπιστο δείκτη λειτουργίας σε επίπεδο ηπατοκυττάρου.

Σε μελέτη στην Ταϊλάνδη (Kukongvirirajapan V. et al, 2004), όπου μελετήθηκαν 13 υγιείς, 7 αλκοολικοί με ήπια βιοχημική δραστηριότητα και 10 αλκοολικοί με σημαντική παθολογική ηπατική βιοχημεία αναφέρεται πως ο λόγος παραξανθίνη/καφεΐνη στη σίελο μετά από έγχυση καφεΐνης στον ορό αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο εκτίμησης της δραστηριότητας του CYP1A2 και της ηπατικής λειτουργίας καθώς φάνηκε να διαχωρίζει τους ασθενείς με ήπια βιοχημική δραστηριότητα από τους υγιείς, αν και το δείγμα των υπό μελέτη ομάδων ήταν μικρό.

Η κάθαρση της καφεΐνης από τη σίελο και τα ούρα μελετήθηκε επίσης σε παιδιά με ηπατική νόσο (El-Yazigi et al., 1999; Balistreri et al., 1990). Οι μεταβολίτες της καφεΐνης στα ούρα μετρήθηκαν με HPLC με προσδιορισμό του λόγου  $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$ . Βρέθηκε ότι η ηπατική νόσος μειώνει σημαντικά την κάθαρση από τη σίελο και τη δραστηριότητα του CYP1A2, αλλά δε φαίνεται να επηρεάζει τη δραστηριότητα του NAT και της XO.

Αν και από πολύ νωρίς ήταν γνωστό πως το κάπνισμα ως εξωγενής παράγοντας επάγει ισχυρά τη δραστηριότητα του CYP1A2, όπως φαίνεται από τη σύντομη βιβλιογραφική ανασκόπηση, σε λίγες μελέτες έχει ληφθεί υπόψη κατά την επεξεργασία των δεδομένων. Το κάπνισμα επάγει ισχυρά τη δραστηριότητα του CYP1A2. Αυτό φαίνεται να «προστατεύει» τη «λειτουργική ηπατοκυτταρική μάζα». Να «συσκοτίζει» και να μην επιτρέπει τη διεξαγωγή «αξιόπιστων» αποτελεσμάτων στους καπνιστές. Στις μελέτες που προαναφέρθηκαν, δε γινόταν διαχωρισμός των καπνιστών από τους μη καπνιστές. Έτσι λοιπόν, όταν καπνιστές και μη καπνιστές εξεταζόταν μαζί, οι περισσότεροι μειωμένες τιμές των μη καπνιστών επικαλύπτονταν από τις λιγότερο μειωμένες τιμές των καπνιστών, με αποτέλεσμα να μην προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη δραστηριότητα του CYP1A2 σε πρώιμα στάδια

ηπατοπάθειας, παρά μόνο σε προχωρημένα, όπου υπήρχε εκσεσημασμένη βλάβη του ηπατοκυττάρου.

Σχετικά με την αλληλεπίδραση καπνίσματος και ηπατικής νόσου, όπως ήδη έχει αναφερθεί, οι Park et al. (2003) παρατήρησαν πως οι κίρρωτικοί μη καπνιστές ασθενείς είχαν σημαντικά μειωμένες τιμές της απέκκρισης ραδιοσημασμένης καφεΐνης από την αναπνοή και επιβεβαίωσαν την επαγωγική επίδραση του καπνίσματος πάνω στη δραστηριότητα του CYP1A2 στην ηπατική νόσο.

Η συγκέντρωση των ενζύμων του συστήματος P-450 στο ηπατοκύτταρο μειώνεται μόνο σε σοβαρή ηπατοκυτταρική νέκρωση (Farell et al., 1979). Επομένως, δε θεωρείται πιθανό πως η μείωση στη δραστηριότητα του CYP1A2 που παρατηρείται σε ασθενείς με αρχόμενη κίρρωση οφείλεται σε ποσοτική μείωση του περιεχομένου του ηπατοκυττάρου σε λειτουργικά οξειδωτικά ένζυμα (mixed function oxidase enzyme system). Άλλωστε ελάττωση της δραστηριότητας του CYP1A2 παρατηρείται και σε μη κίρρωτικούς ασθενείς. Επομένως, η μείωση του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης θα πρέπει να θεωρηθεί πως αντικατοπτρίζει μείωση στη «λειτουργική μάζα ηπατοκυττάρων».

Η απέκκριση καφεΐνης από τη σίελο έγινε προσπάθεια να χρησιμοποιηθεί και ως προγνωστικός δείκτης για την πρόβλεψη της περαιτέρω πορείας ασθενών με αρχόμενη κίρρωση χωρίς επιτυχία. Ο Shrestha (1997) μελέτησε 10 ασθενείς με αρχόμενη κίρρωση (Child Score 5-7). Προσπάθησε να διαπιστώσει το βαθμό επιδείνωσης της ηπατοκυτταρικής λειτουργίας και αν η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τη μετάπτωση της κίρρωσης σε μη αντιρροπούμενη. Μετρήθηκε η κάθαρση καφεΐνης και αντιπυρίνης στη σίελο. Παρατηρήθηκε μείωση στην κάθαρση καφεΐνης σε κίρρωτικούς, αλλά υπήρχε σημαντική αλληλοεπικάλυψη με τιμές υγιών και έτσι η μέθοδος δε βοήθησε τελικά στην πρόβλεψη της ηπατικής βλάβης.

Η κάθαρση της καφεΐνης από τη σίελο αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας και των Lewis and Rector (1992), οι οποίοι μέτρησαν την κάθαρση της καφεΐνης στη σίελο ασθενών με κίρρωση σε δείγματα νηστείας, χωρίς να προηγηθεί χορήγηση καφεΐνης, με συλλογή δύο μόνο δειγμάτων και μέτρηση των συγκεντρώσεων της καφεΐνης με HPLC. Ο μεταβολισμός της καφεΐνης βρέθηκε σημαντικά μειωμένος σε νοσοκομειακούς ασθενείς με επιπλοκές ηπατικής νόσου. Εντούτοις, αν και παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην κάθαρση της καφεΐνης και σε κλινικούς δείκτες της βαρύτητας της ηπατικής νόσου, από μόνη της η εξέταση δεν



μπορούσε να προβλέψει τη θνησιμότητα και βέβαια να αντικαταστήσει ως προς την πρόγνωση την κλίμακα Child-Pugh.

Σε προηγούμενη μελέτη οι Denaro et al. (1996) παρατήρησαν αρνητική γραμμική συνάρτηση μεταξύ της κάθαρσης καφεΐνης και του μεταβολικού λόγου AAMU+1X+1U/ 17U ως προς το χρόνο προθρομβίνης στους κιρρωτικούς. Σε άλλη μελέτη (Holstege A. et al, 1989) η κάθαρση καφεΐνης των υγιών, των ασθενών με διαφόρων αιτιολογιών ηπατικά νοσήματα χωρίς κίρρωση και των ασθενών με ηπατική κίρρωση βρέθηκαν να συσχετίζονται με την αλβουμίνη ορού, το χρόνο προθρομβίνης και τη χολερυθρίνη ορού. Δεν αναδείχθηκε σχέση της κάθαρσης καφεΐνης με την ασπαρτική αμινοτρανσφεράση του ορού.

Οι Park et.al. (2003) μετρώντας απέκκριση ραδιοσημασμένης καφεΐνης από την αναπνοή αναφέρει στους μη καπνιστές στατιστικά σημαντικές διαφορές της δραστηριότητας του CYP1A2 με αλβουμίνη ορού, αιμοπετάλια και δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης.

Σε αρκετά παλαιότερη μελέτη επιχειρήθηκε προσπάθεια, για να βρεθεί η ευαισθησία της κάθαρσης σιέλου κατά τη διάρκεια της νύχτας, προκειμένου να διερευνηθεί η καταλληλότητα της δοκιμασίας ως διαγνωστικής μεθόδου για την ηπατική λειτουργία (Jost et al., 1987). Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε σε 79%. Στη μελέτη συμμετείχαν 56 ηπατοπαθείς (29 κιρρωτικοί και 27 μη κιρρωτικοί) και 26 υγιείς. Άλλη μελέτη χρησιμοποιώντας την παραπάνω μέθοδο σε 41 ηπατοπαθείς (28 κιρρωτικοί και 13 μη κιρρωτικοί) και 14 υγιείς υπολόγισε την ευαισθησία της μεθόδου σε 89% (McDonagh J.E. et al., 1991). Σε καμιά από τις προηγούμενες δυο μελέτες δεν έγινε διάκριση μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών.

Όσον αφορά τη πρόγνωση, οι Jover et.al., (1997) προτείνουν πως η μείωση της κάθαρσης καφεΐνης στη σίελο μπορεί να αποτελέσει ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα θνησιμότητας σε έναν ετερογενή πληθυσμό κιρρωτικών ασθενών και μάλιστα θεωρήθηκε πως η μέθοδος ίσως υπερτερεί της ταξινόμησης κατά Child-Pugh.

Η εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 στην ηπατοπάθεια έχει χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη άλλων ανάλογων καταστάσεων. Ενδεικτικά αναφέρουμε πως: η μέτρηση μεταβολικού λόγου καφεΐνης έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της ηπατοκυτταρικής λειτουργίας πριν και μετά τη χορήγηση θεραπείας, αλλά και για την εκτίμηση της ανάρρωσης ασθενών που νόσησαν από οξεία ηπατίτιδα ιογενούς και φαρμακευτικής αιτιολογίας.

Πιο συγκεκριμένα, οι Becquemont et.al. (2002) αναφέρουν πως σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C το διπλό σχήμα θεραπείας IFN-a και ριμπαβιρίνης δεν προκαλεί μεταβολή στη δραστηριότητα του CYP1A2 μετά από ένα μήνα θεραπεία, ενώ σε προηγούμενη μελέτη είχε αναφερθεί μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 που έφτανε σε 50% μετά από μονοθεραπεία με IFN-a. Σε ανάλογη μελέτη μετρήθηκε η κάθαρση καφεΐνης στο πλάσμα σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B και C πριν και μετά από θεραπεία με IFN-a (Wittayalertranya et al., 2001). Παρατηρήθηκε ότι η κάθαρση καφεΐνης, άρα και η μεταβολική χωρητικότητα-ικανότητα του ήπατος δε βελτιώθηκαν μετά τη θεραπεία, παρά τη βελτίωση που παρατηρήθηκε στις βιοχημικές και ιολογικές εξετάσεις.

Η κάθαρση της καφεΐνης στα ούρα χρησιμοποιήθηκε από τους Bechtel et.al. (2000) και για την εκτίμηση της ανάρρωσης ασθενών που νόσησαν από οξεία ηπατίτιδα ιογενούς και φαρμακευτικής αιτιολογίας. Κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης η κάθαρση της καφεΐνης στα ούρα παρουσιαζόταν σημαντικά μειωμένη και η μείωση αυτή συμβάδιζε με τις μεταβολές στα βιοχημικά ευρήματα. Κατά την περίοδο ανάρρωσης στη οξεία ηπατίτιδα ιογενούς αιτιολογίας η κάθαρση καφεΐνης επανήλθε σε φυσιολογικές τιμές συμβαδίζοντας με τα βιοχημικά ευρήματα. Στη φαρμακευτικής αιτιολογίας ηπατίτιδα η κάθαρση καφεΐνης παρέμεινε σημαντικά μειωμένη τη στιγμή που οι βιοχημικές εξετάσεις είχαν επανέλθει σε φυσιολογικές τιμές. Το εύρημα, ίσως, θα μπορούσε να αποδοθεί σε ιστολογικές ή μοριακές αλλοιώσεις των ηπατοκυττάρων ή και σε κυτταρόλυση που προκλήθηκαν από τα φάρμακα.

Σε άλλη δημοσίευση εκτιμήθηκε ο βαθμός επαγωγής που προκαλείται σε κίρρωτικούς ασθενείς μετά από χορήγηση φαινοβαρβιτάλης, ουσίας που επάγει ισχυρά το P450 (Herold et al., 2003).

Η εξέταση προσφέρει από μόνη της σημαντικές επιπλέον πληροφορίες σε σχέση με τις ήδη υπάρχουσες μη επεμβατικές δοκιμασίες για την ηπατική λειτουργία. Η μέθοδος δύναται να καθιερωθεί ως σημαντική απλή, μη επεμβατική μέθοδος ρουτίνας για την παρακολούθηση (monitoring) του βαθμού και του ρυθμού επιδείνωσης της ηπατικής λειτουργίας. Η μέθοδος καταφέρνει να «ανιχνεύσει» στους μη καπνιστές ακόμη και ήπιες «βλάβες» στην ηπατοκυτταρική λειτουργία. Επιπρόσθετα, η μέθοδος αναδεικνύει στατιστικά σημαντικές διαφορές του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης (CMR) στους μη καπνιστές μεταξύ μη κίρρωτικών ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπαθών και των αντίστοιχων κίρρωτικών, αλλά και μεταξύ των ασθενών με «ενεργή» νόσο και των κίρρωτικών με αντιρροπούμενη κίρρωση. Τούτο ίσως υποδηλώνει την



προοπτική χρησιμοποίησης της μεθόδου ως μη επεμβατικού διαγνωστικού δείκτη για το πότε η ηπατοπάθεια μεταπίπτει στην κίρρωση.

Άλλες σημαντικές εν δυνάμει κλινικές εφαρμογές της μεθόδου ως προς τις ηπατοπάθειες είναι: οξεία ηπατική ανεπάρκεια, εξέταση της ανταπόκρισης στη θεραπεία και υπολογισμός του ιδανικού χρόνου για μεταμόσχευση ήπατος, ηπατοπάθειες κατά την εγκυμοσύνη και κατά την παιδική ηλικία, σε περιπτώσεις φαρμακευτικής ηπατίτιδας ως δείκτης της πλήρους ανάρρωσης ή ως εργαλείο χρήσιμο για τον καθορισμό της δοσολογίας της χορηγούμενης δόσης για θεραπεία, στη μελέτη της επίδρασης της γήρανσης στο ήπαρ, αλλά και ως σημαντικός δείκτης για την πρόληψη σοβαρών συνεπειών που θα μπορούσαν να προκύψουν από την μη έγκαιρη προσαρμογή της φαρμακευτικής θεραπείας των ασθενών, ειδικά όσον αφορά φάρμακα με μικρό θεραπευτικό εύρος.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα κλινική μελέτη αποδεικνύει πως η εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 με τη βοήθεια του χρωματογραφικού προσδιορισμού μεταβολιτών καφεΐνης από ούρα χρησιμοποιώντας ένα μεμονωμένο δείγμα ούρων μπορεί να αποκαλύψει δυσλειτουργία του ηπατοκυττάρου ακόμη και σε πρώιμα στάδια χρόνιας ηπατικής νόσου και να δώσει πληροφορίες σχετικά με το πότε η χρόνια ηπατοπάθεια μεταπίπτει σε κίρρωση στους μη καπνιστές. Η εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 με τη βοήθεια του χρωματογραφικού προσδιορισμού μεταβολιτών καφεΐνης από ούρα είναι μια απλή, ευαίσθητη, αξιόπιστη, μη επεμβατική, ποσοτική δοκιμασία της ηπατικής λειτουργίας, ιδιαίτερα για τους μη καπνιστές, ακόμη και για αρχόμενη λειτουργική βλάβη του ήπατος. Αν και κρίνεται απαραίτητο να γίνεται διαχωρισμός μεταξύ των καπνιστών και των μη καπνιστών, οι πληροφορίες που δίνει η μέθοδος θα μπορούσαν να βοηθήσουν τον κλινικό ιατρό να εκτιμήσει την επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας και τη βαρύτητα της ηπατικής νόσου, προκειμένου να βελτιώσει την πρόγνωση, τη θεραπεία και την παρακολούθηση (follow up) του ασθενούς, αλλά και την έγκαιρη προσαρμογή της φαρμακευτικής θεραπείας των ασθενών, ειδικά όσον αφορά σε φάρμακα με μικρό θεραπευτικό εύρος (Rodighiero, 1999). Επιπρόσθετα, η ιστολογική προσέγγιση ίσως να μην αποτελεί τον πιο αξιόπιστο και καθοριστικό παράγοντα πρόγνωσης σε διάφορα ηπατικά νοσήματα, αφού η συγκεκριμένη μέθοδος ανιχνεύει μόνο μορφολογικές μεταβολές, οι οποίες σχετίζονται με το ήπαρ που νοσεί, αλλά δε μας προσφέρει πληροφορίες για το αν και κατά πόσο έχει επηρεαστεί η «λειτουργική» μάζα των ηπατοκυττάρων, η οποία τελικά και καθορίζει το θεμελιώδη ρόλο του ήπατος στη διατήρηση της ανθρώπινης ύπαρξης.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aldridge A., Bailey J., and Neims A.H. The disposition of caffeine during and after pregnancy. *Semin. Perinatol.* 5(4):310-314, 1981.
2. Al-Khalidi JA, Czaja A Current concepts in the diagnosis, pathogenesis, and treatment of autoimmune hepatitis J . *Mayo Clin Proc.* 2001 Dec;76(12):1237-52.
3. Asproдини E.K., Zifa E., Papageorgiou I., and Benakis A. Determination of N-acetylation phenotyping in a Greek population using caffeine as a metabolic probe. *J. Drug Metab. Pharmacok.* 23: 501-506, 1998.
4. Balasubramanian S., Kowdley KV. Effect of alcohol on viral hepatitis and other forms of liver dysfunction. *Clin Liver Dis.* 2005 Feb;9(1):83-101.
5. Balisteri W., A-Kader H., Setchell K., Gremse D., Ryckman F., and Schroeder T. New methods for assessing liver function in infants and children. *Annals of clinical and laboratory science*, 22 (3): 162-174, 1992.
6. Barnett C.R., Wilson J., Wolf CR, Flatt PR, IOannides C: Hyperinsulinemia causes a preferential increase in hepatic P450 1A2 activity. *Biochem Pharmacol* 1992, 43: 1255-1261.
7. Bass NM, Williams RL. Guide to drug dosage in hepatic disease. *Clin Pharmacokinetic* 15 : 396-420, 1998.
8. Baud-Camus F, Marquet P, Soursac M, Davrinche C, Farinotti R. Determination of N-acetylation phenotype using caffeine as a metabolic probe and high-performance liquid chromatography with either ultraviolet detection or electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 760:55-63, 2001. ultraviolet detection or electrospray mass spectrometry.
9. Bechtel Y.C., Haffen E., Lelouet H., Brientini M.P., Paintaud G., Miguet J.P., and Bechtel P.R. Relationship between the severity of alcoholic liver cirrhosis and the metabolism of caffeine in 226 patients. *Int. J. Clin. Pharmacol. Therap.* 38(10):467-475, 2000.

10. Bechtel Y.C., Lelouet H., Brientini M.P., David-Laroche M., Miguet J.P., Paintaud G., Bechtel P.R. Caffeine metabolism differences in acute hepatitis of viral and drug origin. *J. Therapie*; 55 (5): 619-627, 2000.
11. Becquemont L., Chazouilleres O., Serfaty L., Poirier J.M., Broly F., Jaillon P., Poupon R. and Funck-Brentano C. J. Effect of interferon alpha-ribavirin bitherapy on cytochrome P450 1A2 and 2D6 and N-acetyltransferase-2 activities in patients with chronic active hepatitis C. *Jun*;71(6):488-95, 2002..
12. Bedogni G, Bellentani S. Fatty liver: how frequent is it and why? *J Ann Hepatol. Apr-Jun*;3(2):63-5, 2004.
13. Begas E, Kouvaras E, Tsakalof A, Papakosta S, Asproдини EK. *In vivo* evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthine oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios. *Biomed Chromatogr* 21: 190-200, 2007..
14. Bendriss E., Markoglou N., and Wainer I.W. Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of caffeine and fourteen caffeine metabolites in urine. *J. Chromatogr. B* 746:331-338, 2000.
15. Benowitz N.L. Clinical pharmacology of caffeine. *Annu. Rev. Med.* 41:277-288, 1990.
16. Benowitz NL, Peng M, Jacob P 3rd., Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on chlorzoxazone and caffeine metabolism, *Clin Pharmacol Ther.* Nov;74(5):468-74, 2003.
17. Bergk A, Berg T, Neumann UP. Risk factors for the acquisition of hepatitis C. *J Minerva Gastroenterol Dietol.* Mar;51(1):7-14, 2005.
18. Berthou F., Flinois J.-P., Ratanasavanh D., Beaune P., Riche C., and Guillouzo A. Evidence for the involvement of several cytochromes P-450 in the first steps of caffeine metabolism by human liver microsomes. *Drug Metab. Disp.* 19(3):561-567, 1991.

19. Birkett D.J., and Miners J.O. Caffeine renal clearance and urine caffeine concentrations during steady-state dosing. Implications for monitoring caffeine intake during sports events. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 31:405-408, 1991.
20. Blanchard J., and Sawers S.J.A. The Absolute Bioavailability of Caffeine in Man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24:93-98, 1983.
21. Bleau A.M., Maurel P., Pichette V., Leblond F., du Souich P., Interleukin-1beta, interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma released by a viral infection and an aseptic inflammation reduce CYP1A1, 1A2 and 3A6 expression in rabbit hepatocytes., *Jul 25;473(2-3):197-206*, 2003.
22. Boberg KM. Prevalence and epidemiology of autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis.* Aug;6(3):635-47, 2002.
23. Bogdanos DP, Dalekos GN. Enzymes as target antigens of liver-specific autoimmunity: the case of cytochromes P450s. *Curr Med Chem.* 15(22):2285-92. Review, 2008.
24. Bonati M., Latini R., Galletti F., Young J.F., Tognoni G., and Garattini S. Caffeine disposition after oral doses. *Clin. Pharmacol. Ther.* 32(1):98-106, 1982.
25. Campbell M.E., Grant D.M., Inaba T., and Kalow W. Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theophylline, and theobromine by polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible cytochrome(s) P-450 in human liver microsomes. *Drug Metabol. Disp.* 15(2):237-249, 1987.
26. Campbell M.E., Spielberg S.P., and Kalow W. A urinary metabolite ratio that reflects systemic caffeine clearance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 42(2):157-165, 1987.
27. Caraco Y, Zylber-Katz E, Berry EM, Levy M. Antipyrine disposition in obesity: evidence for negligible effect of obesity on hepatic oxidative metabolism. *Eur J Clin Pharmacol* , 47:525-530, 1995.
28. Caramella C, Avouac J, Sogni P, Puéchal X, Kahan A, Allanore Y. Association between rheumatoid arthritis and primary biliary cirrhosis. *Joint Bone Spine.* May;74(3):279-81. Epub 2007 Feb 20, 2007.

29. Carrillo J.A and Benitez J. CYP1A2 activity, gender and smoking, as variables influencing the toxicity of caffeine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 41:605-608, 1996.
30. Carrillo J.A., and Benitez J. Clinically Significant Pharmacokinetic Interactions Between Dietary Caffeine and Medications. *Clin. Pharmacokinet.* 39(2):127-153, 2000.
31. Carrillo J.A., Christensen M., Ramos S.I., Alm C., Dahl M.-L., Benitez J., and Bertilsson L. Evaluation of Caffeine as an *In Vivo* Probe for CYP1A2 Using Measurements in Plasma, Saliva, and Urine. *Therap. Drug Monitor.* 22:409-417, 2000.
32. Catteau A, Bechtel YC, Poisson N, Bechtel PR, Bonaïti-Pellie C., A population and family study of CYP1A2 using caffeine urinary metabolites, *..*, 47(5):423-30, 1995.
33. Caubet M.-S., Elbast W., Dubuc M.-C., and Brazier J.-L. Analysis of urinary caffeine metabolites by HPLC-DAD: the use of metabolic ratios to assess CYP1A2 enzyme activity. *J. Pharmac. Biomed. Anal.* 27:261-270, 2002.
34. Christodoulou DK, Dalekos GN, Merkouropoulos MH, Kistis KG, Georgitsi G, Zervou E, Zachou K, Tsianos EV. Cryoglobulinemia due to chronic viral hepatitis infections is not a major problem in clinical practice. *Eur J Intern Med.* Sep;12(5):435-441, 2001.
35. Dalekos GN, Achenbach K, Christodoulou D, Liapi GK, Zervou EK, Sideris DA, Tsianos EV. Idiopathic dilated cardiomyopathy: lack of association with hepatitis C virus infection. *Heart* 80:270-275, 1998.
36. Dalekos GN, Christodoulou D, Kistis KG, Zervou EK, Hatzis J, Tsianos EV. A prospective evaluation of dermatologic side effects during alpha-interferon therapy for chronic viral hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 10:933-939, 1998.
37. Dalekos GN, Galanakis E, Zervou E, Tzoufi M, Lapatsanis PD, Tsianos EV Interferon-alpha treatment of children with chronic hepatitis D virus infection: the Greek experience. *Hepatogastroenterology.* Jul-Aug;47(34):1072-6, 2000.

38. Dalekos GN, Kistis KG, Boumba DS, Voulgari P, Zervou EK, Drosos AA, Tsianos EV. Increased incidence of anti-cardiolipin antibodies in patients with hepatitis C is not associated with aetiopathogenetic link to anti-phospholipid syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. Jan;12(1):67-74, 2000.
39. Dalekos GN, Manoussakis MN, Zervou E, Tsianos EV, Moutsopoulos HM. Immunologic and viral markers in the circulation of anti-HIV negative heroin addicts. *Eur J Clin Invest*. Apr;23(4):219-25, 1993.
40. Dalekos GN, Obermayer-Straub P, Bartels M, Maeda T, Kayser A, Braun S, Loges S, Schmidt E, Gershwin ME, Manns MP. Cytochrome P450 2A6: a new hepatic autoantigen in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. Nov;39(5):800-6, 2003.
41. Dalekos GN, Wedemeyer H, Obermayer-Straub P, Kayser A, Barut A, Frank H, Manns MP. Epitope mapping of cytochrome P4502D6 autoantigen in patients with chronic hepatitis C during alpha-interferon treatment. *J Hepatol*. Mar;30(3):366-75, 1999.
42. Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C The antiphospholipid syndrome and infection *Curr Rheumatol Rep*. Aug;3(4):277-85, 2001.
43. Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C, Gatselis N. Autoantibodies and defined target autoantigens in autoimmune hepatitis: an overview. *Eur J Intern Med*. Aug;13(5):293-303, 2002.
44. Dalekos GN, Zervou E, Karabini F, Tsianos EV. Prevalence of viral markers among refugees from southern Albania: increased incidence of infection with hepatitis A, B and D viruses. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. Jun;7(6):553-8, 1995.
45. Dalekos GN, Obermayer-Straub P, Bartels M, Maeda T, Kayser A, Braun S, Loges S, Schmidt E, Gershwin ME, Manns MP. Cytochrome P450 2A6: a new hepatic autoantigen in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. Nov;39(5):800-6, 2003.
46. Daly AK, Cholerton S., Gregory w., Idle JR. Metabolic polymorphisms. *Pharmacol Ther*. feb-mar: 57 (2-3) : 129-160, 1993.

47. Das K, Kar P., Non-alcoholic steatohepatitis., J Assoc Physicians India., Mar;53:195-9, 2005.
48. Denaro C.P., Brown C.R., Wilson M., Jacob P., and Benowitz N.L. Dose-dependency of caffeine metabolism with repeated dosing. Clin. Pharmacol. Ther. 48(3):277-285, 1990.
49. Denaro C.P., Wilson M., Jacob P., and Benowitz N.L. The effect of liver disease on urine caffeine metabolite ratios. Clin. Pharmacol. Therap. 59(6):624-635, 1996.
50. Ding YS, Trommel JS, Yan XJ, Ashley D, Watson CH. Determination of 14 polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream smoke from domestic cigarettes. Environ Sci Technol 39:471-478, 2005.
51. Dinis-Ribeiro M, Ramalho F, Gloria H, Marinho R, Raimundo M, Serejo F, Velosa J, Carneiro-de-Moura M. Factors associated with the development of cirrhosis in patients with HCV chronic infection. Hepatogastroenterology. Jan-Feb;52(61):176-9, 2005.
52. Dobrocky P., Bennett P.N., and Notarianni L.J. Rapid method for routine determination of caffeine and its metabolites by high-pressure liquid chromatography. J. Chromatogr. B 652:104-108, 1994.
53. Donato MT, Lahoz A, Jimenez N, Perez G, Serralta A, Mir J, et al. Potential impact of steatosis on cytochrome P450 enzymes of human hepatocytes isolated from fatty liver grafts. Drug Metab Dispos, 34:1556-1562, 2006.
54. Durnas C., Loi CM., Cusack BJ. Hepatic drug metabolism and aging. J. Clin Pharmacokinet. Nov 19: 359-389, 1990.
55. Elloumi H, Arfaoui D, Joudene M, Sriha B, Korbi M, Ajmi S. Non alcoholic steatohepatitis: an emergent and potentially serious pathology. J Tunis Med. Jun;82(6):484-91, 2004.
56. El-Yazigi A., Shabib S., Al-Rawithi S., Yusuf A., Legayada E., and Al-Humidan A. Salivary clearance and urinary metabolic pattern of caffeine in healthy



children and in pediatric patients with hepatocellular diseases. *J. Clin Pharmacol.* 39: 366-372, 1999.

57. El-Yazigi A., Shabib S., Al-Rawithi S., Yusuf A., Legayada E.S., and Al-Humidan A. Salivary Clearance and Urinary Metabolic Pattern of Caffeine in Healthy Children and in Pediatric Patients with Hepatocellular Diseases. *J. Clin. Pharmacol.* 39:366-372, 1999.

58. Evans D.A.P., Manley K.A., and McKusick V.A. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br. Med J.* 2:485-491, 1960.

59. Fanlo A, Sinues B, Mayayo E, Bernal L, Soriano A, Martinez-Jarreta B, Martinez-Ballarín E. Urinary mutagenicity, CYP1A2 and NAT2 activity in textile industry workers. *J Occup Health* Nov;46(6):440-7, 2004.

60. Farrell GC, Cooksley WG, Powell LW., Drug metabolism in liver disease: activity of hepatic microsomal metabolizing enzymes., *Oct*;26(4):483-92, 1979.

61. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology.* Nov;127, 2004.

62. Feld JJ, Heathcot EJ. Epidemiology of autoimmune liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* Oct;18(10):1118-28, 2003.

63. Frye RF, Zgheib NK, Matzke GR, Chaves-Gnecco D, Rabinovitz M, Shaikh OS, Branch RA., Liver disease selectively modulates cytochrome P450-mediated metabolism, *Clin Pharmacol Ther.* Sep;80(3):235-45, 2006.

64. Fuhr U, Anders EM, Mahr G, Sörgel F, Staib AH. Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P450IA2 activity in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 36:942-948, 1992.

65. Fuhr U, Kummert AL. The fate of maringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions. *Clin Pharmacol Ther.* 58:365-373, 1995.

66. Fuhr U, Woodcock BG, Siewert M. Verapamil and drug metabolism by the cytochrome P450 isoform CYP1A2. *Eur J Clin Pharmacol* , 42:463-464, 1992.

67. Fuhr U., Doehmer J., Battula N. Wolfel C., Flick I., Kudla C., Keita Y., and Staib A.H.. Biotransformation of methylxanthines in mammalian cell lines genetically engineered for expression of single cytochrome P450 isophorms. Allocation of metabolic pathways to isoformes and inhibitory effects of quinolones. *Toxicology* 82(1-3):169-189, 1993.
68. Gatselis NK, Georgiadou SP, Koukoulis GK, Tassopoulos N, Zachou K, Liaskos C, Hatzakis A, Dalekos GN. Clinical significance of organ- and non-organ-specific autoantibodies on the response to anti-viral treatment of patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006 Dec;24(11-12):1563-73. Nov 10,2006.
69. Gatselis NK, Georgiadou SP, Tassopoulos N, Zachou K, Liaskos C, Hatzakis A, Dalekos GN. Impact of parietal cell autoantibodies and non-organ-specific autoantibodies on the treatment outcome of patients with hepatitis C virus infection: a pilot study. *World J Gastroenterol.* Jan 28;11(4):482-7, 2005.
70. Gatselis NK, Rigopoulou E, Stefos A, Kardasi M, Dalekos GN. Risk factors associated with HCV infection in semi-rural areas of central Greece. *Eur J Intern Med.* Jan;18(1):48-55, 2007.
71. Gatselis NK, Stefos A, Gioti C, Rigopoulou EI, Dalekos GN. Primary biliary cirrhosis and Henoch-Schonlein purpura: report of two cases and review of the literature. *Liver Int.* Mar;27(2):280-3. Review, 2007.
72. Gatselis NK, Zachou K, Dalekos GN. Early primary biliary cirrhosis: a new association with erythema nodosum of unknown origin. *Gastroenterol Res Pract.* 2010;2010. pii: 121620. Epub 2010 Jul 25.PMID: 20706542 [PubMed - in process]
73. Gatselis NK, Zachou K, Papamichalis P, Koukoulis GK, Gabeta S, Dalekos GN, Rigopoulou EI. Comparison of simplified score with the revised original score for the diagnosis of autoimmune hepatitis: A new or a complementary diagnostic score?
74. Gogos CA, Fouka KP, Nikiforidis G, Avgeridis K, Sakellaropoulos G, Bassaris H, Maniatis A, Skoutelis A. Prevalence of hepatitis B and C virus infection

in the general population and selected groups in South-Western Greece. *Eur J Epidemiol.* 18(6):551-7, 2003.

75. Goritsas C, Plerou I, Agaliotis S, Spinthaki R, Mimidis K, Velissaris D, Lazarou N, Labropoulou-Karatza C. HCV infection in the general population of a Greek island: prevalence and risk factors. *Hepatogastroenterology.* May-Jun;47(33):782-5, 2000.

76. Grant D.M., Campbell M.E., Tang B.K., and Kalow W. Biotransformation of caffeine by microsomes from human liver. *Biochem. Pharmacol.* 36(8):1251-1260, 1987.

77. Grant D.M., Tang B.K., and Kalow W. Variability in caffeine metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 33(5):591-602, 1983.

78. Grant D.M., Tang B.K., Campbell M.E., and Kalow W. Effect of allopurinol on caffeine disposition in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 21:454-458, 1986.

79. Gu L., Gonzalez F.J., Kalow W., and Tang B.K. Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline by c-DNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics* 2:73-77, 1992..

80. Haynes P, Liangpunsakul S, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease in individuals with severe obesity. *J Clin Liver Dis.* Aug;8(3):535-47, viii, 2004.

81. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, Bittencourt PL, Porta G, Boberg KM, Hofer H, Bianchi FB, Shibata M, Schramm C, Eisenmann de Torres B, Galle PR, McFarlane I, Dienes HP, Lohse AW; International Autoimmune Hepatitis Group. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology.* Jul;48(1):169-76, 2008.

82. Herold C., Ganslmayer M., Ocker M., Zorf S., Gailer B., Hahn E. and Schuppan D. Cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J.Gastroenterology and Hepatology* 18: 445-449, 2003.

83. Holstege A., Staiger M., Haag K., and Gerok W. Correlation of caffeine elimination and Child's classification in liver cirrhosis. *Klin. Wochenschr.* 67(1):6-15, 1989.
84. Hong Chi-Chen, Tang B., Hammond G., Trtchler D., Yaffe M. and Boyd N. Cytochrome P4501A activity and risk factors for breast cancer: a cross-sectional study. *Breast cancer research Vol 6 No 4:* 352-365, 2004.
85. Hong Chi-Chen, Tang B., Rao V., Argawal S., Martin L., Tritchler D., Yaffe M., and Boyd N. Cytochrome P4501A activity, mammographic Density, and oxidative stress: a cross-sectional study. *Breast cancer research Vol6 No 4:* 38-351, 2004
86. Howden C.W., Birnie G.G., and Brodie M.J. Drug metabolism in liver disease. *Pharmacol. Ther.* 40:439-474, 1989.
87. Huang J.-D., Guo W.-C., Lai M.-D., Guo Y.L., and Lambert G.H. Detection of a novel cytochrome P-450 1A2 polymorphism (F21L) in Chinese. *Drug Metabol. Disp.* 27(1):98-101, 1999.
88. Hunt CM, Westerkam WR, Stave GM. Effect of age and gender on the activity of humam hepatic. *J. Biochem Pharmacol.* Jul 22; 44(2): 275-283, 1992.
89. Ikeya K., Jaiswal A.K., Owens R.A., Jones J.E., Nebert D.W., and Kimura S. Human CYP1A2: sequence, gene structure, comparison with the mouse and rat homologous gene, and differences in liver m- RNA expression. *Mol. Endocrin.* 3:1399-1408, 1989.
90. Jennings T.S., Nafziger A.N., Davidson L., Bertino J.S., J. *Lab. Clin Med*, 122 (2): 208-216, 1993.
91. Jodynys-Liebert J, Flieger J, Matuszewska A, Juszczuk J., Serum metabolite/caffeine ratios as a test for liver function., *J Clin Pharmacol.*, Apr;44(4):338-47, 2004.

92. Joeres R, Brachtel D, Gallenkamp H, Hofstetter G, Klinker H, Zilly W, Richter E., Caffeine elimination in cirrhotic and non-cirrhotic liver disease of different etiology., *Z Gastroenterol*, Feb;31 Suppl 2:56-61, 1993.
93. Joint Bone Spine. May;74(3):279-81. Epub 2007 Feb 20, 2007.
94. Jost G., Wahllander A., Mandach U., Preisig R. Overnight salivary caffeine clearance: a liver function suitable for roytine use, *Hepatology* Vol 2, No 7: 338-344,1987.
95. Jover R., Carnicer F., Sanchez-Paya J., Climent E., Sirvent M., and Marco J.L., Salivary caffeine clearance predicts survival in patients with liver cirrhosis. *The American J. of Gastroenterology*. 92 (10): 1905-1908, 1997.
96. Kahle W., Leonhardt H., Platzer W., *Εγχειρίδιο Ανατομικής του ανθρώπου*, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, τόμος 2, 226, 1985.
97. Kalow W. and Tang B.-K. Caffeine as a metabolic probe: Exploration of the enzyme-inducing effect of cigarette smoking. *Clin. Pharmacol. Ther.* 49(1):44-48, 1991.
98. Kalow W. Variability of Caffeine Metabolism in Humans. *Arzneimittel Forschung* 35(I):319-324, 1985.
99. Kalow W., and Tang B.-K. The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal. *Clin. Pharmacol. Ther.* 53(5):503-514, 1993.
100. Kalow W., and Tang B.-K. Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. *Clin. Pharmacol. Ther.* 50(5):508-519, 1991.
101. Kashuba A., Bertino J., Kearns G., Leeder S., James A., Gotschall R., Nafziger A. Quantitation of three-month intraindividual variability and influence of sex and menstrual cycle phase on CYP1A2, N-acetyltransferase=2, and xanthine oxidase activity determined with caffeine phenotyping. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, May; 540-551, 1998.

102. Keiding S, Sorensen M. Hepatic removal kinetics: importance for quantitative measurements of liver function. In: Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice, 3<sup>rd</sup> Edition, Edited by Juan Rodes et al, Blackwell Publishing Ltd, p.468-488, 2007.
103. Kobayashi M, Ikeda K, Hosaka T, Sezaki H, Someya T, Akuta N, Suzuki F, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Miyakawa Y, Kumada H. Natural history of compensated cirrhosis in the Child-Pugh class A compared between 490 patients with hepatitis C and 167 with B virus infections. *J Med Virol.* Apr;78(4):459-65, 2006.
104. Kotake A.N., Schoeller D.A., Lambert G.H., Baker A.L., Schaffer D.D., and Josephs H. The caffeine CO<sub>2</sub> breath test: Dose response and route of N-demethylation in smokers and nonsmokers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 32(2):261-269, 1982.
105. Kroon LA, Drug interactions and smoking: raising awareness for acute and critical care providers. *Crit Care Nurs Clin North Am.* Mar;18(1):53-62, 2006.
106. Krul C., and Hageman G. Analysis of caffeine metabolites to assess biotransformation enzyme activities by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 709:27-34, 1998.
107. Kukongviriyapan V, Senggunprai L, Prawan A, Gaysornsiri D, Kukongviriyapan U, Aiemsa-Ard J. Salivary caffeine metabolic ratio in alcohol-dependent subjects. *J Eur J Clin Pharmacol.*, Apr;60(2):103-7, 2004.
108. Lambert G.H., Schoeller D.A., Humphrey H.E.B., Kotake A.N., Lietz H., Campbell M., Kalow W., Spielberg S.P., and Budd M. The Caffeine Breath Test and Caffeine Urinary Metabolite Ratios in the Michigan Cohort Exposed to Polybrominated Biphenyls: A Preliminary Study. *Envir. Health Persp.* 89:175-181, 1990.
109. Lambert G.H., Schoeller D.A., Kotake A.N., Flores C., and Hay D. The effect of age, gender, and sexual maturation on the caffeine breath test. *Dev. Pharmacol. Ther.* 9:375-388, 1986.

110. Landi M.T., Sinha R., Lang N.P., Kadlubar F.F., Human cytochrome P4501A2, IARC Sci Publ 148: 173-195, 1999.
111. Lane J.D., Steege J.F., Rupp S.L., and Kuhn C.M. Menstrual cycle effects on caffeine elimination in the human female. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43(5):543-546, 1992.
112. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat.* Mar;11(2):97-107, 2004.
113. Le Marchand L, Donlon T, Kolonel LN, Henderson BE, Wilkens LR. Estrogen metabolism-related genes and breast cancer risk: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Aug;14(8):1998-2003, 2005.
114. Le Marchand L, Franke AA, Custer L, Wilkens LR, Cooney RV. Lifestyle and nutritional correlates of cytochrome CYP1A2 activity: inverse associations with plasma lutein and alpha-tocopherol. *Pharmacogenetics* , 7:11-19,1997.
115. Leandro G, Mangia A, Hui J, Fabris P, Rubbia-Brandt L, Colloredo G, Adinolfi LE, Asselah T, Jonsson JR, Smedile A, Terrault N, Pazienza V, Giordani MT, Giostra E, Sonzogni A, Ruggiero G, Marcellin P, Powell EE, George J, Negro F; HCV Meta-Analysis (on) Individual Patients' Data Study Group. Relationship between steatosis, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. *Gastroenterology.* May;130(6):1636-42, 2006.
116. Lelo A., Kjellen G., Birkett D.J., and Miners J.O., Paraxanthine metabolism in humans: determination of metabolic partial clearances and effects of allopurinol and cimetidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248:315-319, 1989.
117. Lelo A., Miners J.O., Robson A., and Birkett D.J. Quantitative assessment of caffeine partial clearances in man. *Br. J. Pharmac.* 22:183-186, 1986.
118. Lelouet H., Bechtel Y.C., Paitaud G., Brientini M.P., Miguet J.P., and Bechtel P.R. Caffeine metabolism in a group of 67 patients with primary biliary cirrhosis. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 39(1):25-32, 2001.

119. Leone N, Rizzetto M. Natural history of hepatitis C virus infection: from chronic hepatitis to cirrhosis, to hepatocellular carcinoma. *Minerva Gastroenterol Dietol.* Mar;51(1):31-46, 2005
120. Leuschner U, Manns MP, Eisebitt R. Ursodeoxycholic Acid in the therapy for primary biliary cirrhosis: effects on progression and prognosis. *Z Gastroenterol.* Sep;43(9):1051-9, 2005.
121. Levine CD, Ghalib RH, Assessment of the patient who failed treatment for chronic hepatitis C, *Gastroenterol Nurs.* May-Jun;28(3 Suppl):S24-30, 2005.
122. Lewis F.W., and Rector W.G. Caffeine clearance in cirrhosis: The value of simplified determinations of liver metabolic capacity. *J. Hepatol.* 14:157-162, 1992.
123. Liaskos C, Norman GL, Moulas A, Garagounis A, Goulis I, Rigopoulou EI, Dalekos GN. Prevalence of gastric parietal cell antibodies and intrinsic factor antibodies in primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta.* 2010 Mar;411(5-6):411-5. Epub 2009 Dec 16.
124. Liaskos C, Rigopoulou E., Zachou K., Georgiadou S., Gatselis N., Papamichali R., Dalekos GN. Prevalence and clinical significance of anticardiolipin antibodies in patients with type 1 autoimmune hepatitis *J Autoimmun.* May;24(3):251-60, 2005..
125. Loi C-M, Parker BM, Cusack BJ, Vestal RE. Individual and combined effects of cimetidine and ciprofloxacin on the theophylline metabolism in male nonsmokers. *Br J Clin Pharmacol*, 36:195-200, 1993.
126. Mahgoub A., Idle J.R., Dring L.G., Lancaster R., and Smith R.L. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 2(8038):584-586, 1977.
127. Mandayam S, Jamal MM, Morgan TR. Epidemiology of alcoholic liver disease. *J Semin Liver Dis.* Aug;24(3):217-32, 2004.
128. Mc Lean A.J., Morgan DJ. Clinical pharmacokinetics in patients with liver disease. *Clin. Pharmacokinet* 21:42-69, 1991.



129. McDonagh JE, Nathan VV, Bonavia IC, Moyle GR, Tanner AR., Caffeine clearance by enzyme multiplied immunoassay technique: a simple, inexpensive, and useful indicator of liver function., *Gut*, Jun;32(6):681-4, 1991.
130. Meyer V. Pitfalls and Errors of HPLC in Pictures. pp 50-51, 76-77, 108-109. Huthig Verlag, Heidelberg, 1997.
131. Meyer V.R. Practical High-Performance Liquid Chromatography. pp 24-27, 148-149, 253. John Wiley & Sons, Chichester, 1996.
132. Moonen H, Engels L, Kleinjans J, Kok T. The CYP1A2-164A-->C polymorphism (CYP1A2\*1F) is associated with the risk for colorectal adenomas in humans, *Cancer Lett.* Nov 8;229(1):25-31, 2005.
133. Morgan DJ, Mc Lean AJ. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic. *Clin. Pharmacokinet* 29:370-391, 1995. Neuschwander-Tetri B.A., Evolving pathophysiologic concepts in nonalcoholic steatohepatitis, *Feb;4(1):31-6*, 2002.
134. Nagata K, Suzuki H, Sakaguchi S. Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *J Toxicol Sci* , 32:453-468, 2007.
135. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 37:1202-1219, 2003.
136. Nitkiewicz J. Molecular epidemiology of chronic hepatitis C (HCV) virus. *J. Przegl Epidemiol.* 58(3):413-21, 2004.
137. Nordmark A., Lundgren S., Cnattingius S., and Rane A. Dietary caffeine as a probe agent for assessment of cytochrome P4501A2 activity in random urine samples. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 47:397-402, 1999.
138. Notarianni L.J., Oliver S.E., Dobrocky P., Bennett P.N., and Silverman B.W. Caffeine as a metabolic probe: a comparison of the metabolic ratios used to assess CYP1A2 activity. *Br. J. Clin. Pharmac.* 39:65-69, 1995.
139. Nyeki A., Biollaz J., Kesslerling U.W., and Decosterd L.A. Extractionless method for the simultaneous high-performance liquid chromatographic determination

of urinary caffeine metabolites for N-acetyltransferase 2, cytochrome P4501A2 and xanthine oxidase activity assessment. *J. Chromatogr. B* 755:73-84, 2001.

140. Obermayer-Straub P, Perheentupa J, Braun S, Kayser A, Barut A, Loges S, Harms A, Dalekos G, Strassburg CP, Manns MP. Hepatic autoantigens in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *Gastroenterology*. Sep;121(3):668-77, 2001.

141. Okano J, Nagahara T, Matsumoto K, Murawaki Y. Caffeine inhibits the proliferation of liver cancer cells and activates the MEK/ERK/EGFR signalling pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008 Jun;102(6):543-51. Epub 2008 Mar 16.

142. Oo YH, Neuberger J. Options for treatment of primary biliary cirrhosis. *Drugs*. 64(20):2261-71, 2004.

143. Papatheodoridis GV, Cholongitas E, Dimitriadou E, Touloumi G, Sevastianos V, Archimandritis AJ. MELD vs Child-Pugh and creatinine-modified Child-Pugh score for predicting survival in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol* 11:3099-104, 2005.

144. Patwardhan R.V., Desmond P.V., Johnson R.F., and Schenker S. Impaired elimination of caffeine by oral contraceptive steroids. *J. Lab. Clin. Med.* 95(4):603-608, 1980.

145. Pollock B., Wylie M., Stack J., Sorisio D., Thompson D., Kirshner M., Folan M., Condifer K. Inhibition of caffeine metabolism by estrogen replacement therapy in postmenopausal women., 39: 936-940, 1999.

146. Pollock BG, Wylie M, Stack JA, Sorisio DA, Thompson DS, Kirshner MA, et al. Inhibition of caffeine metabolism by estrogen replacement therapy in postmenopausal women. *J Clin Pharmacol*, 39:936-940, 1999.

147. Poupon R., Hepatitis C: epidemiology, management and treatment, *Bull Acad Natl Med*. 189 (2): 375-384, 2005.

148. Prince MI, James OF. The epidemiology of primary biliary cirrhosis. *J. Clin Liver Dis*. Nov;7(4):795-819, 2003.

149. Ramesh S., Sanyal AJ. Hepatitis C and nonalcoholic fatty liver disease. *J Semin Liver Dis.* Nov;24(4):399-413, 2004.
150. Rasmussen B., Brix T., Kyvik K., Brosen K.: The interindividual differences in the 3-demethylation of caffeine alias CYP1A2 is determined by both genetic and environmental factors. *Pharmacogenetics* 12; 473-478, 2002..
151. Rasmussen B.B., and Brosen K. Determination of Urinary Metabolites of Caffeine for the Assessment of Cytochrome P4501A2, Xanthine Oxidase, and N-Acetyltransferase Activity in Humans. *Therap. Drug. Monit.* 18:254-262, 1996.
152. Relling M.V., Lin J.S., Ayers G.D., and Evans W.E. Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities. *Clin. Pharmacol. Ther.* 52(6):643-658, 1992.
153. Renner E., Wietholtz H., Huguenin P., Arnaud M.J., and Preisig R. Caffeine: A Model Compound for Measuring Liver Function. *Hepatology* 4(1):38-46, 1984.
154. Rigopoulou EI, Bogdanos DP, Liaskos C, Koutsoumpas A, Baum H, Vergani D, Dalekos GN. Anti-mitochondrial antibody immunofluorescent titres correlate with the number and intensity of immunoblot-detected mitochondrial bands in patients with primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta.* 2007 May 1;380(1-2):118-21. Epub 2007 Feb 1.
155. Rigopoulou EI, Dalekos GN. Autoimmune hepatitis: of host and pathogen. *Hepatology.* Jun;47(6):2147-8, 2008.
156. Rigopoulou EI, Davies ET, Bogdanos DP, Liaskos C, Mytilinaiou M, Koukoulis GK, Dalekos GN, Vergani D. Antimitochondrial antibodies of immunoglobulin G3 subclass are associated with a more severe disease course in primary biliary cirrhosis. *Liver Int.* 2007 Nov;27(9):1226-31.
157. Rigopoulou EI, Davies ET, Pares A, Zachou K, Liaskos C, Bogdanos DP, Rodes J, Dalekos GN, Vergani D. Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gut.* Apr;54(4):528-32, 2005.

158. Rigopoulou EI, Mytilinaiou M, Romanidou O, Liaskos C, Dalekos GN. Autoimmune hepatitis-specific antibodies against soluble liver antigen and liver cytosol type 1 in patients with chronic viral hepatitis. *J Autoimmune Dis.* Feb 4;4:2, 2007.
159. Rizzo N, Hispard E, Dolbeault S, Dally S, Leverge R, Girre C. Impact of long-term ethanol consumption on CYP1A2 activity. *Clin Pharmacol Ther.* 62:505-509, 1997.
160. Rodopoulos N., Wisen O., and Norman A. Caffeine metabolism in patients with chronic liver disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 55:229-242, 1995.
161. Rost K.L., and Roots I. Accelerated caffeine metabolism after omeprazole treatment is indicated by urinary metabolite ratios: coincidence with plasma clearance and breath test. *Clin. Pharmacol. Ther.* 55(4):402-411, 1994. Rostami-Hodjegan A., Nurminen S., Jackson P.R., and Tucker G.T. Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment. *Pharmacogenetics* 6:121-149, 1996.
162. Rostami-Hodjegan A, Nurminen S, Jackson PR, Tucker GT. Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment. *Pharmacogenetics* 6:121-149, 1996.
163. Sanyal A.J., Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease., *Jan;2(1):46-53*, 2005.
164. Saruwatari J, Nakagawa K, Shindo J, Tajiri T, Fujieda M, Yamazaki H, Kamataki T, Ishizaki T., A population phenotyping study of three drug-metabolizing enzymes in Kyushu, Japan, with use of the caffeine test, *Aug;72(2):200-8*, 2002.
165. Satra M, Dalekos GN, Kollia P, Vamvakopoulos N, Tsezou A. Telomerase reverse transcriptase mRNA expression in peripheral lymphocytes of patients with chronic HBV and HCV infections. *J Viral Hepat* 12:488-493, 2005.
166. Schmucker D.L., Woodhouse K.W., Wang R.K., Wynne H., James O.F., McManus M., Kremers P., Section of cell biology, aging, and molecular medicine, *J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 48 (4): 365-374, 1990.

167. Schrenk D., Brockmeier D., Morike K., Bock K.W., Eichelbaum M.: A distribution study of CYP1A2 phenotypes among smokers and non-smokers in a cohort of healthy Caucasian volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 53:361-367, 1998.
168. Schrumpf E., Boberg KM. Epidemiology of primary sclerosing cholangitis. *J Best Pract Res Clin Gastroenterol*. Aug;15(4):553-62, 2001.
169. Scott N.R., Stambuk D., Chakraborty J., Marks V., and Morgan M.Y. The pharmacokinetics of caffeine and its dimethylxanthine metabolites in patients with chronic liver disease. *Br. J. Pharmac.* 27:205-213, 1989..
170. Seitz HK, Pöschl G., Alcohol and the liver, *Ther Umsch*. Apr;57(4):227-31, 2000.
171. Sesardic D, Boobis AR, Murray BP, Murray S, Segura J, de la Torre R, et al. Furafylline is a potent and selective inhibitor of cytochrome P450IA2 in man. *Br J Clin Pharmacol*, 29:651-663, 1990.
172. Shaw-Stiffel T.A., Tang B.K., Spielberg S.P., and Shear N.H. Caffeine-A novel probe to assess drug effects on hepatic cytochrome P-450 activity. *Hepatology* 8:1385, 1988.
173. Sherlock S., Primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune cholangitis. *J Clin Liver Dis*. Feb;4(1):97-113, 2000
174. Shimada T., Yamazaki H., Mimura M. Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270(1):414-423, 1994.
175. Shrestha R., McKinley C., Showalter R., Wilner K., Marsano L., Vivian B., Everson G. Quantitative liver function tests define the functional severity of liver disease in early-stage cirrhosis. *J. Liver transplantation and surgery*, Vol3, No2: 166-173, 1997.
176. Sinha R. and Rothman N. Role of well-done, grilled meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer. *Cancer Letters* 143:189-194, 1999.

177. Sinha R., Rothman N., Brown E.D., Mark S.D., Hoover R.N., Caporaso N.E., Levander O.A., Knize M.G., Lang N.P., and Kadlubar F.F. Pan-Fried Meat Containing High Levels of Heterocyclic Aromatic Amines but Low Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Induces Cytochrome P4501A2 Activity in Humans. *Cancer Research* 54:6154-6159, 1994..
178. Sinues B., Fanlo A., Bernal ML, Mayayo E., Soriano MA, Martinez-Ballarín E. Influence of the urine flow rate on some caffeine metabolite ratios used to assess CYP1A2 activity. *Ther Drug Monit.* Dec; 24 (6) : 715-721, 2002..
179. Somani S.M., and Gupta P. Caffeine: a new look at an age-old drug. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 26(11):521-533, 1988.
180. Stefos A, Gatselis N, Zachou K, Rigopoulou E, Hadjichristodoulou C, Dalekos GN. Descriptive epidemiology of chronic hepatitis B by using data from a hepatitis registry in Central Greece. *Eur J Intern Med* Jan;20(1):35-43, 2009.
181. Stiehl A., Primary sclerosing cholangitis. *J Internist (Berl).* Jan;45(1):27-32, 2004.
182. Sypsa V, Touloumi G, Tassopoulos NC, Ketikoglou I, Vafiadis I, Hatzis G, Tsantoulas D, Akriviadis E, Delladetsima J, Demonakou M, Hatzakis A. Reconstructing and predicting the hepatitis C virus epidemic in Greece: increasing trends of cirrhosis and hepatocellular carcinoma despite the decline in incidence of HCV infection. *J Viral Hepat.* Jul;11(4):366-74, 2004.
183. Talwalkar JA, Lindor KD. Natural history and prognostic models in primary sclerosing cholangitis. *J Best Pract Res Clin Gastroenterol.* Aug;15(4):563-75, 2001.
184. Talwalkar JA, Lindor KD. Primary sclerosing cholangitis. *J Inflamm Bowel Dis.* 2005 Jan;11(1):62-72.
185. Tanaka E., Ishikawa A., Yamamoto Y., Osada A., Tsuji K., Fukao K., Misawa S., and Iwasaki Y. A simple useful method for the determination of hepatic function in patients with liver cirrhosis using caffeine and its three major dimethylmetabolites. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 30(9):336-341, 1992.

186. Tang B.K., Grant D.M., Kalow W. Isolation and identification of 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil as a major metabolite of caffeine in man. *Drug Metab. Disp.* 11:218-220, 1983.
187. Tang B.K., Zhou Y., Kadar D., and Kalow W. Caffeine as a probe for CYP1A2 activity: potential influence of renal factors on urinary phenotypic trait measurements. *Pharmacogenetics* 4(3):117-124, 1994.
188. Tang-Liu D.D.S., Tozer T.N., and Riegelman S. Dependence of renal clearance on urine flow: A mathematical model and its application. *J. Pharm. Sci.* 72:154-158, 1983.
189. Tang-Liu D.D.S., Williams R.L., and Riegelman S. Disposition of caffeine and its metabolites in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224:180-185, 1983.
190. Tantcheva-Poór I., Zaigler M., Rietbrock S., and Fuhr U. Estimation of cytochrome P-450 CYP1A2 activity in 863 healthy Caucasians using a saliva-based caffeine test. *Pharmacogenetics* 9:131-144, 1999.
191. Tassaneeyakul W., Birkett D.J., Veronese M.E., McManus M.E., Tukey R.H., Quattrochi L.C., Gelboin H.V., and Miners J.O. Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P4501A1 and 1A2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265(1):401-407, 1993.
192. The EASL jury: EASL International Consensus Conference on Hepatitis B, 13-14 September, 2002, Geneva, Switzerland. Consensus statement (Short version). *J Hepatol* 38:533-540, 2003.
193. Tsikrikoni A, Kyriakou DS, Rigopoulou E, Alexandrakis MG, Zachou K, Passam F, Dalekos GN. Markers of cell activation and apoptosis in bone marrow mononuclear cells of patients with autoimmune hepatitis type 1 and primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 42:393-399, 2005.
194. Ullrich D., Compagnone D., Brandes A., Hille H., and Bircher J. Urinary caffeine metabolites in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43:167-172, 1992.

195. Vistisen K, Loft S, Olsen JH, Vallentin S, Ottesen S, Hirsch FR, Poulsen HE. Low CYP1A2 activity associated with testicular cancer. *Carcinogenesis*. Jun;25(6):923-9. Epub 2004 Feb 19, 2004.
196. Vistisen K., Loft S., and Poulsen H.E. Cytochrome P4501A2 activity in man measured by caffeine metabolism: effect of smoking, broccoli and exercise. *Adv. Exp. Med. Biol.* 283:407-411, 1991.
197. Wakim-Fleming J, Mullen KD. Long-term management of alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis.* Feb;9(1):135-49, 2005.
198. Walsh K.and Alexander G., Alcoholic liver disease, May;76(895):280-6, 2000.
199. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. Jan 23;421(6921):384-8, 2003.
200. Welfare M.R., Aitkin M., Bassendine M.F. and Daly A.K. Detailed modelling of caffeine metabolism and examination of the CYP1A2 gene: lack of a polymorphism in CYP1A2 in Caucasians. *Pharmacogenetics* 9(6):782, 1999.
201. Westphal J. and Brogard J., Drug administration in chronic liver disease. *J. Drug safety*17(1): 47-73, 1997.
202. Wietholtz H, Zysset T, Marschall HU, Generet K, Matern S. The influence of rifampin treatment on caffeine clearance in healthy man. *J Hepatol* 22: 78-81, 1995.
203. Wong P, Villeneuve G, Tessier V, Banerjee K, Nedev H, Jean-Claude BJ, Leyland-Jones B., Stability of 5-acetamido-6-formylamino-3-methyluracil in buffers and urine., *J Pharm Biomed Anal.*, May 15;28(3-4):693-700, 2002.
204. Yeh RF, Gaver VE, Patterson KB, Rezk NL, Baxter-Meheux F, Blake MJ, Eron JJ Jr, Klein CE, Rublein JC, Kashuba AD Lopinavir/ritonavir induces the hepatic activity of cytochrome P450 enzymes CYP2C9, CYP2C19, and CYP1A2 but



inhibits the hepatic and intestinal activity of CYP3A as measured by a phenotyping drug cocktail in healthy volunteers. *J Acquir Immune Defic Syndr.* May;42(1):52-60, 2006.

205. Yoshikawa H, Kurokawa M, Ozaki N, Nara K, Atou K, Takada E, Kamochi H, Suzuki N. Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7. *Clin Exp Immunol.* Oct;146(1):116-23, 2006.

206. Zachou K, Liaskos C, Rigopoulou E, Gabeta S, Papamichalis P, Gatselis N, Georgiadou S, Dalekos GN. Presence of high avidity anticardiolipin antibodies in patients with autoimmune cholestatic liver diseases. *Clin Immunol.* May;119(2):203-12. Epub 2006 Feb 24, 2006.

207. Zachou K, Rigopoulou E, Dalekos GN. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. *J Autoimmune Dis.* Oct 15;1(1):2, 2004.

208. Zachou K, Rigopoulou E, Liaskos C, Patsiaoura K, Makri E, Stathakis N, Dalekos GN. Primary biliary cirrhosis presented as peripheral eosinophilia in asymptomatic women with or without elevated alkaline phosphatase. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* Apr;16(4):425-8, 2004.

209. Zachou K, Yurdaydin C, Drebbel U, Dalekos GN, Erhardt A, Cakaloglu Y, Degertekin H, Gurel S, Zeuzem S, Bozkaya H, Schlaphoff V, Dienes HP, Bock TC, Manns MP, Wedemeyer H; H1DT-1 Study Group. Quantitative HBsAg and HDV-RNA levels in chronic delta hepatitis. *Liver Int.* Mar;30(3):430-7. Epub 2009 Oct 16, 2010.

210. Zervou EK, Dalekos GN, Boumba DS, Tsianos EV. Value of anti-HBc screening of blood donors for prevention of HBV infection: results of a 3-year prospective study in Northwestern Greece. *Transfusion.* May;41(5):652-8, 2001..

211. Zervou EK, Gatselis NK, Xanthi E, Ziciadis K, Georgiadou SP, Dalekos GN. Intrafamilial spread of hepatitis B virus infection in Greece. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. Sep;17(9):911-5, 2005.
212. Zervou EK, Gatselis NK, Xanthi E., Ziciadis K, Georgiadou SP, Dalekos GN. Intrafamilial spread of hepatitis B virus infection in Greece. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. Sep;17(9):911-5, 2005.
213. Zylber-Katz E., Granit L., and Levy M. Relationship between caffeine concentrations in plasma and saliva. *Clin. Pharmacol. Ther.* 36(1):133-137, 1984.
214. Γεωργιάτσος Ι.Γ. και Αρζόγλου Π.Ι. Αρχές Κλινικής Χημείας. pp 31-32, 100, 230-233. Εκδόσεις Γιαχούδη- Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, 1999.
215. Νταλέκος Γ. και Σταθάκης Ν., Νοσήματα του ήπατος , των χοληφόρων οδών και του παγκρέατος, εκδόσεις: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2001.
216. Ράπτης Σ., Εσωτερική Παθολογία,εκδόσεις: Μ. Παρισιάνου, τόμος 2, σελ.1110-1167, 1996.