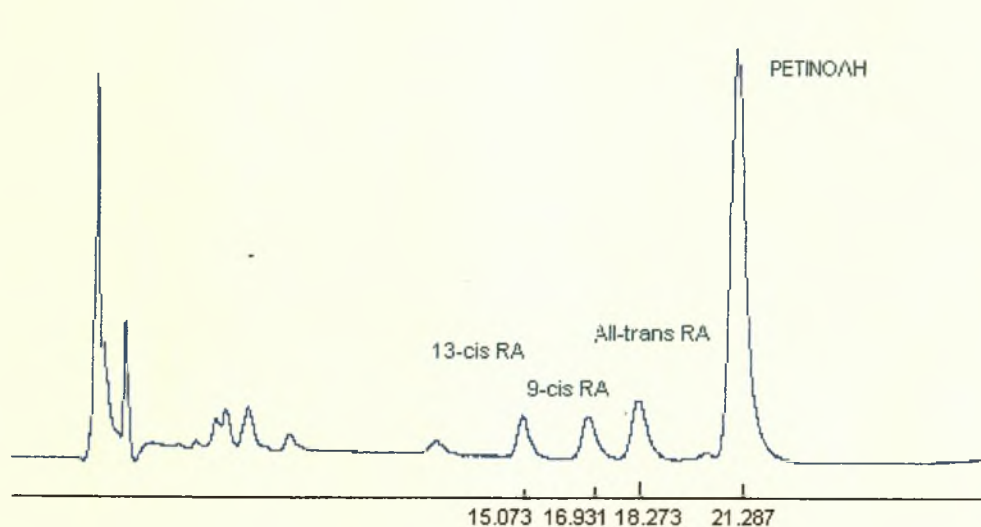


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Τα επίπεδα της ρετινόλης και των ισομερών του ρετινοϊκού οξέος
στον ορό ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα**



Χατζηδημητρίου Δέσποινα

Λάρισα 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4388/1
Ημερ. Εισ.: 10-05-2005
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΧΑΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087957

Εξώφυλλο : Η ηλεκτροχημική ανίχνευση του 13-cis ρετινοϊκού οξέος, του 9-cis ρετινοϊκού οξέος, του all trans ρετινοϊκού οξέος και της ρετινόλης σε χρόνους 15,073 min, 16,931 min, 18,273 min και 21,287 min αντίστοιχα. Τα ρετινοειδή ανιχνεύονται από τον ηλεκτροχημικό ανιχνευτή μετά από ανάλυση μείγματος των ρετινοϊκών οξέων και της ρετινόλης με την HPLC μέθοδο ανίχνευσής και ποσοτικοποίησης των ρετινοειδών, που αναπτύσσεται στην παρούσα πειραματική μελέτη.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής της σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του ΤΕΙ Λάρισας.

Ο επιβλέπων και υπεύθυνος καθηγητής της διπλωματικής εργασίας είναι ο κ. Μουλάς Ανάργυρος, Αναπληρωτής Καθηγητής του τμήματος Ζωϊκής Παραγωγής.

Τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής είναι : ο κ. Κουρέτας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και ο κ. Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή κ. Μουλά Ανάργυρο για την υπόδειξη του θέματος, την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε σε όλο το πέρας της πειραματικής εργασίας και για τις χρήσιμες συμβουλές και διορθώσεις, που μου υπέδειξε κατά τη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Χατζηδημητρίου Δέσποινα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
II. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
II.1 Βιταμίνη Α	
II.1.a. Η βιολογική δράση της Βιταμίνης Α και οι διατροφικές πηγές της.....	2
II.1.b. Τα ρετινοειδή και τα χαρακτηριστικά τους.....	3
II.1.c. Δεσμεντικές πρωτεΐνες των ρετινοειδών	4
II.1.d. Η αφομοίωση, η αποθήκευση και ο μεταβολισμός της Βιταμίνης Α.....	9
II.1.e. Η Βιταμίνη Α στο πλάσμα.....	15
II.2 Ιογενής Ηπατίτιδα	
II.2.a. Το ήπαρ.....	16
II.2.b. Ηπατίτιδα Α.....	16
II.2.c. Ηπατίτιδα Β.....	18
II.2.d. Ηπατίτιδα C.....	22
II.2.e. Ηπατίτιδα D.	25
II.2.f. Ηπατίτιδα Ε	27
II.2.g. Ηπατίτιδα G.....	28
II.3. Σκοπός της εργασίας	29
III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
III.1. Χημικά και διαλύματα	30
III.2. Όργανα και συσκευές.....	30
III.3. Ανάπτυξη μεθόδου διαχωρισμού των ρετινοειδών με πρότυπα διαλύματα	31
III.5. Πρότυπες καμπύλες	34
III.4. Ανάλυση των δειγμάτων ορού των ασθενών και των μαρτύρων.....	37
IV. Αποτελέσματα.....	38
V. Συζήτηση.....	42
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.....	44
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.....	45
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βιταμίνη Α στηρίζει σημαντικές βιολογικές δραστηριότητες του οργανισμού όπως την όραση, την αναπαραγωγή και την ακεραιότητα του αμυντικού συστήματος. Το ήπαρ είναι το κύριο όργανο, που εκτελεί το μεταβολισμό και την αποθήκευση της βιταμίνης Α και ταυτόχρονα αποτελεί στόχο μόλυνσης για του ιούς της ηπατίτιδας.

Με σκοπό τη μελέτη των επιπέδων των ρετινοειδών της βιταμίνης Α σε περιπτώσεις ικής ηπατίτιδας, αναπτύξαμε αρχικά μια μέθοδο διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης του 13-cis ρετινοϊκού οξέος, του 9-cis ρετινοϊκού οξέος, του all-trans ρετινοϊκού οξέος και της ρετινόλης με τη χρήση της HPLC. Με τη μέθοδο αυτή επιτύχαμε το διαχωρισμό του 13-cis ρετινοϊκού οξέος, του 9-cis ρετινοϊκού οξέος, του all-trans ρετινοϊκού οξέος και της ρετινόλης σε χρόνους 15,073 min, 16,931 min, 18,273 min και 21,287 min αντίστοιχα. Έπειτα, αναλύσαμε 30 δείγματα ορού (με ποσοστό ανάκτησης $95 \pm 0.03\%$ για τη ρετινόλη και $96 \pm 0.02\%$ για τα οξέα) ασθενών με ικές ηπατίτιδες (μέσος όρος ηλικίας ασθενών $51,7 \pm 14,8$) και 31 δείγματα ορού υγιών ατόμων-μαρτύρων (μέσος όρος ηλικίας $51,5 \pm 13,6$) και τα συγκρίναμε μεταξύ τους. Από τα 30 δείγματα ασθενών οι 21 πάσχουν από ηπατίτιδα Β, οι 6 από ηπατίτιδα C, οι 2 από ηπατίτιδα Β+C και 1 από ηπατίτιδα Β+D. Μετά την ανάλυση των δειγμάτων ο μέσος όρος της συγκέντρωσης της ρετινόλης βρέθηκε στους μάρτυρες $406,1 \pm 126,78$ ng/ml και στους ασθενείς $327,08 \pm 129,09$ ng/ml, ο μέσος όρος της συγκέντρωσης του 13-cis ρετινοϊκού οξέος βρέθηκε στους μάρτυρες $2,23 \pm 0,72$ ng/ml και στους ασθενείς $1,77 \pm 0,52$ ng/ml και ο μέσος όρος του all trans ρετινοϊκού οξέος για τους ασθενείς βρέθηκε $1,44 \pm 0,33$ ng/ml και για τους μάρτυρες $1,43 \pm 0,21$ ng/ml. Το 9-cis ρετινοϊκό οξύ δεν ήταν ανιχνεύσιμο στους ορούς. Τα δείγματα αξιολογήθηκαν στατιστικά με μη παραμετρικές μεθόδους. Οι δύο πληθυσμοί, των μαρτύρων και των ασθενών, για τη ρετινόλη βρέθηκαν διαφορετικοί σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5% ($p=0,02 < 0,05$).

Η παρούσα πειραματική μελέτη βρίσκεται σε εξέλιξη με σκοπό τη βελτιστοποίηση της απόδοσης και της ευαισθησίας της μεθόδου, για τη δυνατή και καλύτερη ανίχνευση των ρετινοϊκών οξέων και της ρετινόλης. Η βελτιστοποίηση της μεθόδου και η ανάλυση μεγαλύτερων σε αριθμό δειγμάτων που θα γίνει στο μέλλον, πιθανόν να επιτρέψουν τη σύγκριση των ρετινοϊκών οξέων και της ρετινόλης σε δείγματα ασθενών και μαρτύρων, ώστε να προκύψουν κάποια συμπεράσματα για τα επίπεδα της βιταμίνης Α σε περιπτώσεις ηπατοπάθειας.

II. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

II.1 Βιταμίνη Α

II.1.a. Η βιολογική δράση της Βιταμίνης Α και οι διατροφικές πηγές της

Ο διατροφικός όρος *Βιταμίνη Α* αντιπροσωπεύει την οικογένεια των απαραίτητων διατροφικών λιποδιαλυτών συστατικών, που συγγενεύουν δομικά με την all trans ρετινόλη. Στην ίδια οικογένεια συμπεριλαμβάνονται και συγκεκριμένα καροτένια που αποτελούν πρόδρομα διατροφικά μόρια της βιταμίνης Α. Πολύ συχνά χρησιμοποιείται και ο όρος *ρετινοειδή*, που αναφέρεται τόσο στους φυσικούς μεταβολίτες της ρετινόλης όσο και στα συνθετικά της ανάλογα. [1]

Η βιταμίνη Α εξυπηρετεί σε έναν αξιόλογο αριθμό λειτουργιών του οργανισμού κυρίως μέσα από τη δράση των μεταβολιτών της, που εμπλέκονται στην ανάπτυξη πολυάριθμων βιολογικών συστημάτων και στη διατήρηση της λειτουργίας τους. Μερικά τέτοια συστήματα είναι το αναπαραγωγικό, όπου η βιταμίνη Α ρυθμίζει τη σπερματογένεση, τη σύλληψη και το σχηματισμό του πλακούντα και το ανοσοποιητικό, στο οποίο εξασφαλίζει την ακεραιότητά του ρυθμίζοντας κατάλληλα τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων του. Η βιταμίνη Α είναι γνωστή και για τη σημαντική συνεισφορά της στη λειτουργία της όρασης μέσω της ρετινάλης, αλλά και για την ρύθμιση που ασκεί στη διαδικασία της εμβρυογένεσης και στη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων και των κυττάρων του δέρματος και των οστών. Τέλος, δεν θα μπορούσε να παραληφθεί η αντιοξειδωτική δράση που χαρακτηρίζει τη βιταμίνη Α και τα πρόδρομα καροτένια της. [1,2,3]

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η βιταμίνη Α φέρει έναν αναντικατάστατο ρόλο για την ακεραιότητα των βιολογικών συστημάτων, με αποτέλεσμα η αφθονία ή η ανεπάρκειά της στον οργανισμό να είναι ιδιαίτερα επιζήμια γι αυτόν. Η ανεπάρκειά της οδηγεί σε ξήρανση του δέρματος και του κερατοειδούς χιτώνα, σε ελαττωματική προσαρμογή της όρασης στο σκοτάδι και στην περιορισμένη ανάπτυξη του ατόμου, ενώ σε προχωρημένη κατάσταση ανεπάρκειας δημιουργούνται πληγές στον κερατοειδή χιτώνα, προκύπτει απώλεια των φακών, μη αντιστρεπτή τύφλωση και θάνατος. Σε περιπτώσεις υπερβιταμίνωσης σημειώνεται βλάβη των μεμβρανών μέσω της οξειδωτικής δράσης των ρετινοειδών στη μεμβράνη και διαταραχή της διακυτταρικής επικοινωνίας και της πίεσης του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Ακόμα, το άτομο βλέπει τα αντικείμενα διπλά και μπορεί να εκδηλωθεί πυρετός, ίλιγγος, ναυτία και εμφανίζεται απώλεια των μαλλιών, αυξημένες τρανσαμινάσες στον ορό, δυσμορφίες στα οστά, αύξηση του ινώδους ιστού και του όγκου του ήπατος, πυλαία υπέρταση και σε περιπτώσεις εγκυμοσύνης προκύπτουν τερατογενέσεις. Σε προχωρημένη κατάσταση υπερβιταμίνωσης σημειώνεται αιμορραγία, κόμα και θάνατος. [1,19]

Η βιταμίνη Α προσλαμβάνεται από τη τροφή ως προσχηματισμένη βιταμίνη (ρετινυλικοί εστέρες) από ζωικές τροφές και από τα πρόδρομα καροτένια της βιταμίνης. Η σύνθεση των καροτένιων στην φύση γίνεται αποκλειστικά από τα φυτά και τους μικροοργανισμούς. Στη φύση, είναι γνωστά περισσότερα από 600 καροτένια, από τα οποία τα 50 με 60 είναι πρόδρομα της βιταμίνης Α. Ο άνθρωπος και τα ζώα μετατρέπουν τα καροτένια σε ρετινόλη και στους μεταβολίτες της και σπάνια αυτή η μετατροπή έχει απόδοση 100%. Με σκοπό λοιπόν την μέτρηση της ποσότητας της βιταμίνης στα καροτένια των τροφών, έχει γίνει γενικά αποδεκτό ότι 6 μg β-καροτένιων ή 12 μg άλλων καροτένιων (πρόδρομων της βιταμίνης Α) είναι

διατροφικά αντίστοιχα σε 1 μg ρετινόλης, δηλαδή 1 RE (retinol equivalents) = 1 μg ρετινόλης ή 6 μg β-καροτένιου ή 12 μg άλλων καροτένιων που περιέχουν βιταμίνη Α.[1,4]

Οι διατροφικές πηγές της βιταμίνης και της προβιταμίνης Α είναι τα καρότα, τα αυγά, τα λαχανικά και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, με πλουσιότερη πηγή βιταμίνης το συκώτι και το ιχθυέλαιο. Για τον άνθρωπο τα καροτένια με μεγαλύτερη βιολογική σημασία είναι τα β-καροτένια, που βρίσκονται στα φρούτα και στα λαχανικά, κυρίως σε αυτά με κίτρινο, πορτοκαλί και σκούρο πράσινο χρώμα

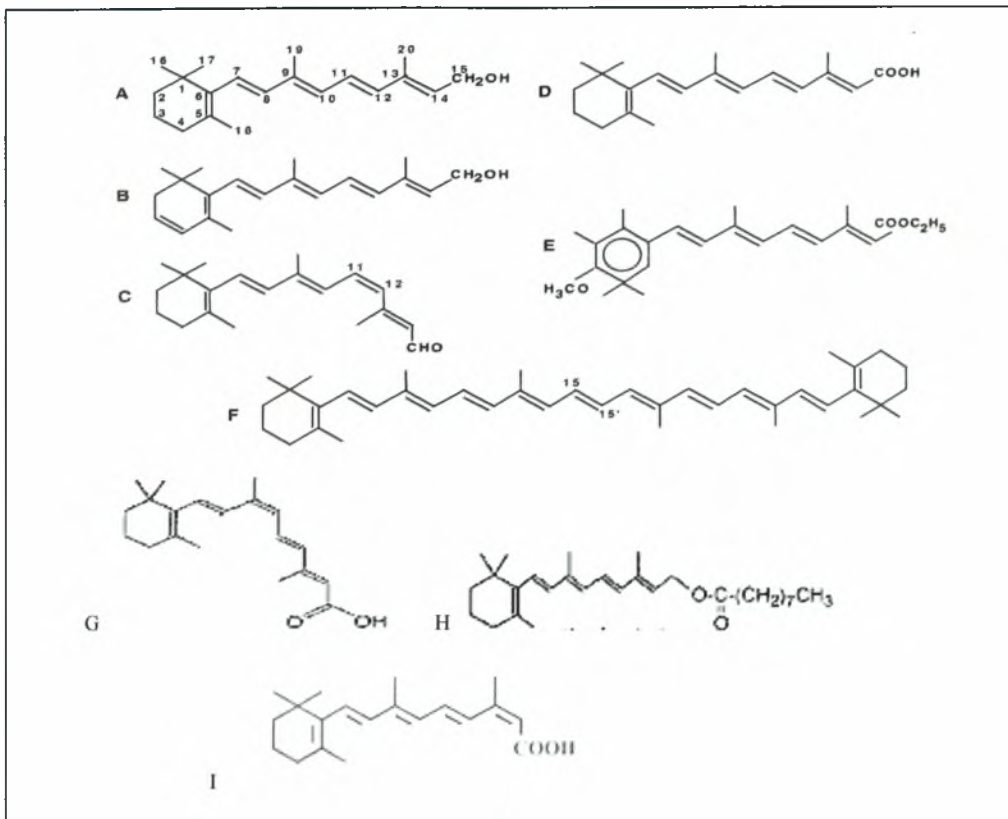
II.1.b. Τα ρετινοειδή και τα χαρακτηριστικά τους

Το 1933 ο Karrer και η ομάδα του ανακάλυψε τη χημική δομή της βιταμίνης Α, ως all-trans-ρετινόλη. Τα δομικά χαρακτηριστικά της ρετινόλης (εικ.2.1.1.A) περιλαμβάνουν τον β-ιονικό δακτύλιο και την πολυισοπρενοϊκή αλυσίδα, η οποία καταλήγει σε μια υδροξυλική ομάδα. Οι πέντε συζυγικοί δεσμοί στο μόριο της ρετινόλης επιτρέπουν την ισομερείωση του μορίου σε ένα all trans ισομερές και σε τέσσερα cis ισομερή, εκ των οποίων τα τρία (9-cis, 11-cis και 13-cis ρετινόλη) συναντώνται στη φύση. Η εστεροποίηση της υδροξυλικής ομάδας της ρετινόλης με τη μακριά αλυσίδα λιπαρών οξέων οδηγεί στον σχηματισμό ρετινυλικών εστέρων, που είναι και η κύρια μορφή της βιταμίνης για την μεταφορά της από το έντερο στο ήπαρ, για την αποθήκευσή της στους περισσότερους ιστούς και για την έκκρισή της από το μαστικό αδένιο στο γάλα. Ένας φυσικός μεταβολίτης της all trans-ρετινόλης, που αποτελεί και συστατικό του ιχθυελαίου, είναι η 3,4-διδεϋδρορετινόλη (εικ.2.1.1.B), η οποία φέρει έναν έκτο διπλό δεσμό που εντοπίζεται στον β-ιονικό δακτύλιο. Η διαδοχική οξείδωση της υδροξυλικής ομάδας της ρετινόλης παράγει τη ρετινάλη και το ρετινοϊκό οξύ, τα οποία όμοια με αυτήν εμφανίζουν γεωμετρικά ισομερή, όπως η 11-cis ρετινάλη (εικ.2.1.C), που εμπλέκεται στον μηχανισμό της όρασης, το all trans ρετινοϊκό οξύ (εικ.2.1.D) και το 9-cis ρετινοϊκό οξύ, που λειτουργούν ως κύριοι προσδέτες των RAR και RXR πυρηνικών υποδοχέων αντίστοιχα (κεφ. II.1.c.).

Η βιταμίνη Α και τα καροτένια είναι διαλυτά στο λάδι και σε αρκετούς οργανικούς διαλύτες, δεν είναι καθόλου διαλυτά στο νερό και είναι ευαίσθητα στην ισομερείωση, στην οξείδωση και στον πολυμερισμό υπό την παρουσία φωτός, υψηλής θερμοκρασίας και οξυγόνου. Όταν αποθηκευτούν σε κρυσταλλική μορφή σε λάδι ή σε κάποιο οργανικό διαλύτη και προστατευθούν από το φως, την υψηλή θερμοκρασία και το οξυγόνο, τότε γίνονται ιδιαίτερα σταθερά μόρια. Ακόμα η βιταμίνη Α είναι σταθερή σε δείγματα ήπατος στους -20 °C και στον ορό στους -70 °C, ενώ τα καροτένια είναι λιγότερο σταθερά σε αυτές τις συνθήκες.[1]

Η ιδιότητα της βιταμίνης Α να απορροφά στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος της ηλεκτροχημικής ακτινοβολίας εξυπηρετεί σημαντικά για την ανίχνευση, την αναγνώριση και την ποσοτικοποίηση της βιταμίνης. Οι συζυγικοί δεσμοί της all trans ρετινόλης σε διαλύτη αιθανόλη δίνουν ένα χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης με μέγιστο απορρόφησης στα 325 nm, ενώ η εστεροποίησή της με λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας δεν αλλάζει αισθητά το φάσμα απορρόφησης της. Η 3,4-διδεϋδρορετινόλη εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 351 nm και το 11-cis ισομερές της ρετιναλδεϋδης, που εμπλέκεται στο σχηματισμό της ροδοψίνης, εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 380 nm. Το all trans ρετινοϊκό οξύ, το 9-cis ρετινοϊκό οξύ και το 13-cis ρετινοϊκό οξύ σε διαλύτη αιθανόλη έχουν μέγιστο απορρόφησης στα 351nm, 343nm και 354nm αντίστοιχα. Είναι απαραίτητο να σημειωθεί ότι το φάσμα απορρόφησης αυτών και άλλων ρετινοϊκών οξέων επηρεά-

ζεται από το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται, λόγω του ιονισμού της καρβονυλικής ομάδας στο μόριο τους.[1]



Εικ.2.1.1: A:all trans ρετινόλη (M.B.286,4), B:3,4-διδεϋδρορετινόλη, C:11-cis ρετινάλη, D:all trans ρετινοϊκό οξύ (M.B.301,5), E:συνθετικό ρετινοϊδές (tretinate), στο οποίο έχει αντικατασταθεί ο β-ιονικός δακτύλιος με αρωματικό, χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση δερματικών παθήσεων, F:all trans-β-καροτένιο, G:9-cis ρετινοϊκό οξύ (M.B.300,44), H:ρετινυλικός παλμιτικός εστέρας (M.B.524,8), I:13-cis ρετινοϊκό οξύ (M.B.300,42) [1, 2]

II.1.c. Δεσμευτικές πρωτεΐνες των ρετινοειδών

Τα ρετινοειδή αποτελούνται από τρεις δομικές περιοχές. Συγκεκριμένα, αποτελούνται από ένα β-ιονικό δακτύλιο, μια πολυακόρεστη αλυσίδα και ένα πολικό άκρο (εικ.2.1). Ο β-ιονικός δακτύλιος και η πολυακόρεστη αλυσίδα αποτελούν το υδρόφοβο τμήμα των ρετινοειδών και αποδίδουν σε αυτά το χαρακτηριστικό της μικρής διαλυτότητάς τους στο νερό. Επιπλέον, τα ρετινοειδή χαρακτηρίζονται από έντονη ευμεταβλητότητα, καθώς οι συζυγιακοί δεσμοί της πολυακόρεστης αλυσίδας τους τα κάνουν επιδεκτικά στο φωτοεκφυλισμό, στην ισομερείωση και στην οξείδωση. Με σκοπό τη μεταφορά των αμφίφιλων ρετινοειδών στο υδατικό περιβάλλον του πλάσματος και την εξασφάλιση της δομικής ακεραιότητάς τους, υπάρχουν συγκεκριμένες εξωκυτταρικές και ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες που συνδέονται με τα ρετινοειδή και εξασφαλίζουν τη μεταφορά τους στο υδατικό εξωκυττάριο και ενδοκυττάριο περιβάλλον αντίστοιχα και ταυτόχρονα τα κατευθύνουν στη σωστή μεταβολική τους πορεία.[1,2]

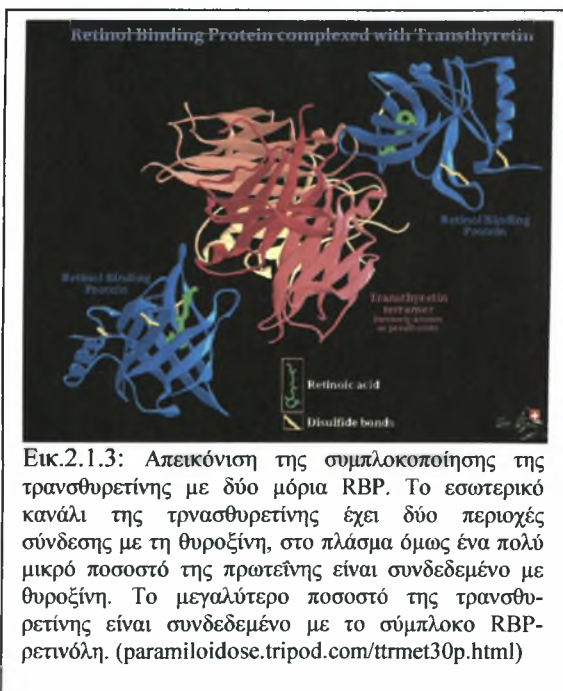
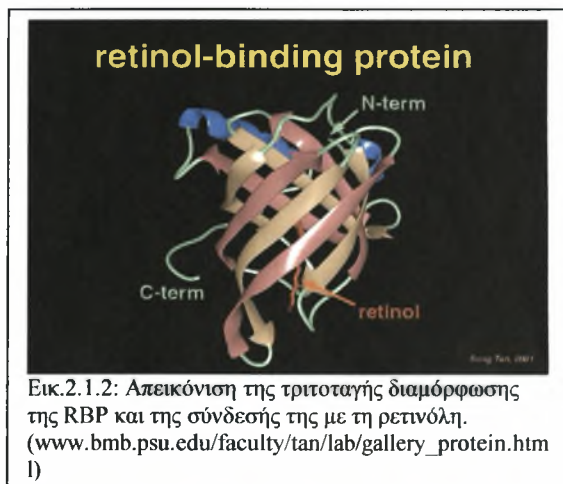
Οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες, που είναι γνωστές και ως λιποκαλίνες, εξυπηρετούν στη μεταφορά των αμφίφιλων ρετινοειδών στον εξωκυττάριο χώρο και χαρακτηρίζονται από μέτρια συγγένεια δέσμευσης με τον προσδέτη τους, με αποτέλεσμα να τον αποδίδουν ευκολότερα στα κύτταρα. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών είναι η β-

γαλακτοσφαιρίνη, που εκκρίνεται στο γάλα των θηλαστικών, η IRBP (interphoto-receptor retinal-binding protein), που εκφράζεται στον αμφιβληστροειδή χιτώνα και εμποδίζει την ισομερείωση της ρετινόλης, η E-RABP (epididymal retinoid acid binding protein), η οποία συνδέεται με all trans-ρετινοϊκό οξύ και 9-cis ρετινοϊκό οξύ και πιθανόν εμπλέκεται στην ανάπτυξη του σπέρματος, η RBP (retinal binding protein) και άλλες πρωτεΐνες.

Η RBP είναι ο αποκλειστικός μεταφορέας της ρετινόλης στο πλάσμα. Γενικά συνδέεται σε αναλογία 1:1 με ενδογενείς προσδέτες που φέρουν δακτύλιο κυκλοεξανίου, όπως η all trans-ρετινόλη. Η RBP εξασφαλίζει τόσο την προστασία της ρετινόλης από την οξείδωση και την ισομερείωση του μορίου της, όσο και την προστασία των κυτταρικών μεμβρανών από τη λυτική επίδραση των αμφίφιλων ρετινοειδών. Η RBP αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα που περιέχει 183 αμινοξέα (21kd), παράγεται κυρίως από τα ηπατοκύτταρα, και λιγότερο από άλλους ιστούς, ενώ ο καταβολισμός της συμβαίνει στα νεφρά.

Η RBP έχει τριτοταγή διαμόρφωση στο χώρο, που σταθεροποιείται από τρεις δισουλφιδικές γέφυρες και περιγράφεται ως β-βαρέλι. Αποτελείται από οχτώ αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα και μια μικρή α-έλικα. Το ένα άκρο του β-βαρελιού είναι κλειστό από το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, ενώ το άλλο άκρο είναι ανοιχτό και επιτρέπει την είσοδο της ρετινόλης στο εσωτερικό της διαμόρφωσης, με τρόπο ώστε το υδρόφοβο τμήμα της να προστατεύεται στο εσωτερικό του β-βαρελιού και το υδροξύλικό της άκρο να βρίσκεται με κατεύθυνση προς την επιφάνεια της πρωτεΐνης (εικ.2.1.2). [4,5]

Υπάρχουν ορμονικοί και φυσιολογικοί παράγοντες που ελέγχουν την έκκριση της RBP. Η ρετινόλη είναι ένας από αυτούς τους παράγοντες, καθώς η απουσία ή η ανεπάρκειά της από τα ηπατοκύτταρα εμποδίζει την έκκριση της πρωτεΐνης. Η ρετινόλη συμπλοκοποιείται με τη RBP στο εσωτερικό των ηπατοκυττάρων, με αποτέλεσμα να αλλάζει η διαμόρφωση της πρωτεΐνης με τρόπο ώστε να ευνοείται η απομάκρυνση του συμπλόκου από τα κύτταρα. Για την απελευθέρωση από τα ηπατοκύτταρα, της συμπλοκοποιημένης με ρετινόλη RBP πρωτεΐνης είναι απαραίτητη και η αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη τρανσθυρετίνη (TTR).



Η τρανσθυρετίνη παράγεται και αυτή στα ηπατοκύτταρα και είναι ένα ομοτετραμερές, που αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες των 127 αμινοξέων. Κάθε μονομέρες έχει δύο εκτεταμένα β-πτυχωτά φύλλα, που το καθένα αποτελείται από τέσσερα αντιπαράλληλα νήματα. Δύο μονομερή σχηματίζουν ένα σταθερό διμερές μέσω δεσμών υδρογόνων και τα δύο διμερή της τετραμερούς πρωτεΐνης είναι σε επαφή μέσω των συμμετρικών βρόγχων τους και διαμορφώνουν ένα εσωτερικό κανάλι ανάμεσά τους. Η αλληλεπίδραση της τρανσθυρετίνης με το σύμπλοκο RBP-ρετινόλη σταθεροποιεί τη σύνδεση της RBP με τη ρετινόλη και εμποδίζει το καταβολισμό της RBP και τη γρήγορη απομάκρυνσή της από τα νεφρά. Με τη τρανσθυρετίνη μπορούν να αλληλεπιδράσουν μέχρι και δύο RBP πρωτεΐνες (εικ.2.1.3).[5,6]

Οι κυτταρικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τα ρετινοειδή ανήκουν στην οικογένεια των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών που δεσμεύονται με λιπίδια (i-LBP, intracellular lipid-binding protein) και εκτελούν τη μεταφορά της ρετινόλης και των μεταβολιτών της στο ενδοκυττάριο περιβάλλον. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι η CRBP (cellular retinal binding protein), η CRBP II (cellular retinal binding protein II), η CRABP (cellular retinoid acid binding protein), η CRABP II (cellular retinoid acid binding protein II) και η CRALBP (cellular retinal-binding protein) (πίνακας 1). In vitro μελέτες υποδεικνύουν ότι οι πρωτεΐνες αυτές δεν λειτουργούν μόνο ως απλοί μεταφορείς των αμφίφιλων ρετινοειδών στο υδατικό ενδοκυτταρικό περιβάλλον, αλλά επιπλέον προστατεύουν τα ρετινοειδή από πιθανή ισομερείωση και μη ενζυματική οξείδωση του μορίου τους και ρυθμίζουν τη μεταβολική πορεία των προσδετών τους μέσω της ικανότητάς τους να ενεργοποιούν τα σωστά ένζυμα μεταβολισμού των ρετινοειδών.[2,6,7]

Πρωτεΐνη	Μοριακή Βάρη (kDa)	Προσδέτης	Ιστός στον οποίο παράγονται	Λειτουργία
CRBP	14.6	Ρετινόλη>> Ρετινάλη	Πολλοί ιστοί όπως ήπαρ, νεφρά, όρχεις	holo: υπόστρωμα για τη LRAT και τη RoDH apo: διεγείρει τη δράση της REH και καταστέλλει τη δράση της LRAT
CRBP II	14.6	Ρετινόλη= Ρετινάλη	Έντερο	holo: υπόστρωμα για τη LRAT και τη ρεδοκτάση της ρετινάλης
CRABP	15	All trans RA>>9-cis RA> 13-cis RA>>9,13 RA	Πολλοί ιστοί όπως όρχεις, πνεύμονες, νεφρά	holo: υπόστρωμα για το μεταβολισμό των ρετινοϊκών οξέων
CRABP II	15.7	All trans RA>>9-cis RA>> 9,13 RA	Δέρμα ενήλικων ατόμων	Έχει παρόμοια δράση με τη CRABP, αλλά εμφανίζει διαφορετική συγγένεια σύνδεσης με τα ρετινοϊκά οξέα σε σχέση με τη CRABP

Πίνακας 2.1: RA:ρετινοϊκό οξύ, LRAT:λεκιθίνη:ρετινόλη ακυλοτρανσφεράση, RoDH: δεϋδρογονάση της ρετινόλης, REH:υδρολάση ρετινυλικών εστέρων, holo:σύμπλοκο πρωτεΐνης-προσδέτης, apo:μη συμπλοκοποιημένη πρωτεΐνη με τον προσδέτη της.

Οι κυτταρικές πρωτεΐνες δέσμευσης των ρετινοειδών έχουν τη δομή β-βαρελίου. Αποτελούνται από δύο μικρές α-έλικες, που δημιουργούν το μοτίβο α-έλικα-στροφή-α-έλικα και δύο ορθογώνια β-πτυχωτά φύλλα, που το καθένα αποτελείται από πέντε αντιπαράλληλα β-νήματα. Το αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών εσωκλείει το κάτω μέρος του β-βαρελίου, ενώ η α-έλικα-στροφή-α-έλικα περιβάλλει τη κορυφή του β-βαρελίου, από όπου πιστεύεται ότι εισέρχεται ο προσδέτης των πρωτεϊνών. Ο προσδέτης περικλείεται στο εσωτερικό της διαμόρφωσης με το υδροξυλικό του τμήμα να τοποθετείται προς το κατώτερο τμήμα του β-βαρελίου (εικ. 2.1.4).



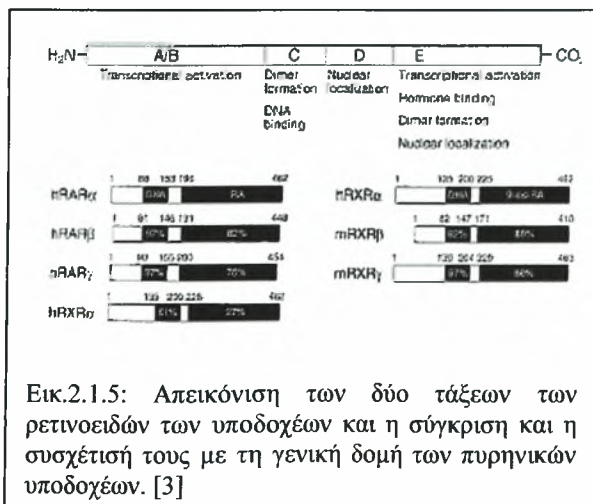
Εικ. 2.1.4: Απεικόνιση της διαμόρφωσης της CRBP πρωτεΐνης, που εσωκλείει τη ρετινόλη.
(www.venus.co.uk/PMDG/pmdg_2.html)

Πέρα από τις παραπάνω πρωτεΐνες, πρόσφατα ανακαλύφθηκε μια ακόμα ενδοκυτταρική πρωτεΐνη μεταφορέας της ρετινόλης, η CRBP III (cellular retinal binding protein III). Η πρωτεΐνη αυτή εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα στη δομή και στην αμινοξική αλληλουχία με τις CRABP και CRABP II πρωτεΐνες και συνδέεται με την all trans ρετινόλη. Η CRBP III έχει βρεθεί ότι παράγεται σε υψηλά επίπεδα στα κύτταρα των νεφρών και του ήπατος και έχει προταθεί ότι λειτουργεί ως ενδοκυτταρικός μεσολαβητής του μεταβολισμού της ρετινόλης σε αυτούς τους ιστούς.[6,7]

Μια ακόμα τάξη πρωτεϊνών που δεσμεύουν ρετινοειδή είναι τα μέλη της υπεροικογένειας των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων, που είναι γνωστά ως υποδοχείς των ρετινοειδών και λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες συγκεκριμένων γονιδίων. Οι υποδοχείς των ρετινοειδών είναι οι RAR (retinoid acid receptor-οι RAR διακρίνονται στους RARα, RARβ, RARγ υπότυπους), οι οποίοι συνδέονται με το all trans ρετινοϊκό οξύ και με όλα τα 9 cis ισομερή του και οι RXR (retinoid X receptor-οι RXR διακρίνονται στους RXRα, RXRβ, RXRγ υπότυπους), οι οποίοι συνδέονται μόνο με το 9 cis ρετινοϊκό οξύ.

Οι RXR και RAR υποδοχείς εμφανίζουν παρόμοια δομή με τους πυρηνικούς υποδοχείς των ορμονών. Συγκεκριμένα, αποτελούνται από τις παρακάτω περιοχές :

- την A/B περιοχή, η οποία είναι σημαντική για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποδοχέα ανεξάρτητα από την πρόσδεση του προσδέτη
- την C περιοχή, η οποία περιλαμβάνει την DBD (DNA binding domain) περιοχή, που είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και την αλληλεπίδραση των υποδοχέων με συγκεκριμένες αλληλουχίες του προαγωγέα του γονιδίου στόχου. Η DBD περιέχει δυο α-έλικες και δύο δακτυλίους Zn²⁺, οι οποίοι



Εικ.2.1.5: Απεικόνιση των δύο τάξεων των ρετινοειδών των υποδοχέων και η σύγκριση και η συσχέτισή τους με τη γενική δομή των πυρηνικών υποδοχέων. [3]

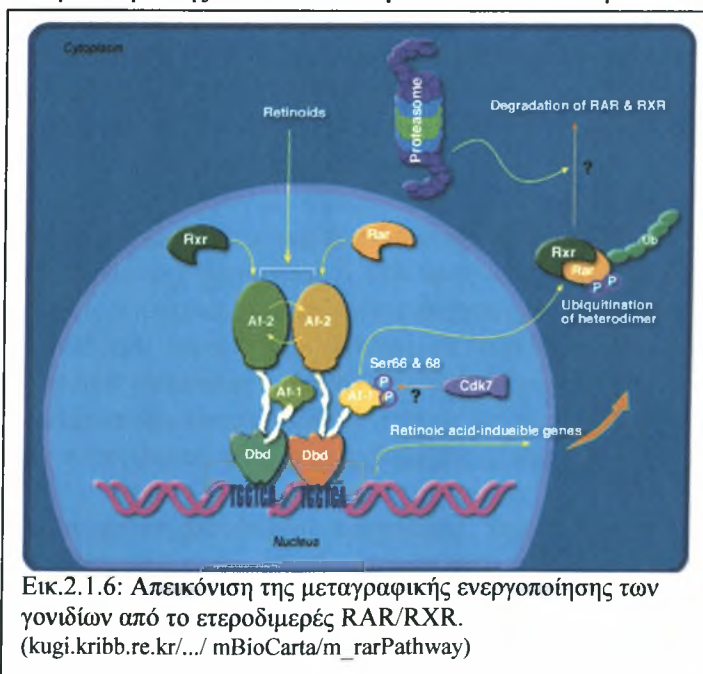
βοηθούν στην αναγνώριση και στην τοποθέτηση του υποδοχέα σε συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του προαγωγέα των γονιδίων.

- την D περιοχή, η οποία λειτουργεί ως εύκαμπτος σύνδεσμος ανάμεσα στην DBD και LDL περιοχή, που επιτρέπει την αλλαγή διαμόρφωσης της DBD και της LDL περιοχής.
- και από την E περιοχή, η οποία αποτελεί την κύρια περιοχή διμερισμού των υποδοχέων. Ακόμα η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για την μεταγραφική ενεργοποίηση του υποδοχέα εξαρτώμενη από τη δέσμευση του προσδέτη. Τέλος, στην E περιοχή βρίσκεται και η περιοχή δέσμευσης του προσδέτη με τον υποδοχέα, LBD (ligand binding domain).[3,8]

Οι υποδοχείς των ρετινοϊκών οξέων οργανωμένοι σε ετεροδιμερή (RAR/RXR) ή σε ομοδιμερή (RXR/RXR) λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων. Οι πυρηνικοί υποδοχείς αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στον προαγωγέα των γονιδίων. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται ρυθμιστικά στοιχεία των ρετινοϊκών οξέων, RAREs (retinoid acid response elements), και συνήθως αποτελούνται από δύο όμοια εξαμερή (AGGTCA) διευθετημένα σε παλινδρομική ακολουθία ή σε άμεσες επαναλήψεις και απομακρυσμένα μεταξύ τους από ένα αριθμό νουκλεοτιδίων.

Σε περίπτωση που απουσιάζει ο προσδέτης του διμερούς, οι υποδοχείς βρίσκονται συνδεδεμένοι, μέσω της DBD περιοχής τους, με τα RAREs των προαγωγέων που αναγνωρίζουν και ταυτόχρονα συνδέονται με πρωτεΐνες-συγκатаστολείς, που εμποδίζουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων. Η σύνδεση του διμερούς των υποδοχέων με τον προσδέτη τους, προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση των υποδοχέων, οι οποίες ευνοούν την αλληλεπίδραση μεταξύ των υποδοχέων του διμερούς και τη συγγένεια δέσμευσής τους με το DNA. Επιπλέον, η δέσμευση του ρετινοϊκού οξέος στο διμερές επάγει την απομάκρυνση των συγκатаστολέων και την αλληλεπίδραση των υποδοχέων με πρωτεΐνες-συνενεργοποιητές. Το σύμπλοκο των υποδοχέων με τους συνενεργοποιητές λειτουργεί ως ακετυλοτρανσφεράση της ιστόνης, που ακετυλιώνει τις λυσίνες της αμινοτελικής ουράς των ιστονών, με αποτέλεσμα τη μείωση της αλληλεπίδρασης των ιστονών με το νουκλεόσωμα και την

τοπική αποσυμπύκνωση της χρωματίνης. Η απόσυμπύκνωση της χρωματίνης επάγεται περαιτέρω από πρωτεΐνες, οι οποίες μέσω της μεθυλίωσης, της ακετυλίωσης των ιστονών και της κατανάλωσης του ATP, διαφοροποιούν την αλληλεπίδραση της ιστόνης με το DNA και των ιστονών μεταξύ τους, με τελικό αποτέλεσμα να διευκολύνεται η είσοδος και η συναρμολόγηση του μεταγραφικού μηχανισμού του γονιδίου. Έπειτα, οι υποδοχείς αλληλεπιδρούν με μετα-



Εικ.2.1.6: Απεικόνιση της μεταγραφικής ενεργοποίησης των γονιδίων από το ετεροδιμερές RAR/RXR. (kugi.kribb.re.kr/.../ mBioCarta/m_rarPathway)

γραφικούς παράγοντες και με πρωτεΐνες-συρρυθμιστές, με αποτέλεσμα την επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων, που αφορούν στη ρύθμιση σημαντικών βιολογικών λειτουργιών, όπως είναι η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση των κυττάρων.

Έχει βρεθεί ότι οι RARs και οι RXRs υποδοχείς αποτελούν υπόστρωμα πολλών κινασών και ότι είναι πολύ σημαντική η φωσφοριλώσή τους για την ικανότητα τους να επάγουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων. Επιπλέον, η ικανότητα των RARs και RXRs υποδοχέων να ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων, επηρεάζεται και από το πρωτεολυτικό σύστημα που εξαρτάται από την ουβικιτίνη. Οι RARs υποδοχείς δεσμεύονται ομοιοπολικά με ένα ή περισσότερα μόρια ουβικιτίνης και οι ουβικιτινιλωμένες πρωτεΐνες υδρολύονται από ένα σύμπλοκο πρωτεολυτικών ενζύμων. Η δράση αυτού του πρωτεολυτικού συστήματος εξαρτώμενο από ουβικιτίνη, μέσω της αποικοδόμησης που προκαλεί στο RAR υποδοχέα, έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την διάρκεια της μεταγραφικής ενεργοποίησης που ασκούν στο γονίδιο-στόχος οι συμπλοκοποιημένοι με τα ρετινοϊκά οξέα υποδοχείς.[8]

II.1.d. Η αφομοίωση, η αποθήκευση και ο μεταβολισμός της Βιταμίνης Α

Η βιταμίνη Α προσλαμβάνεται από τη τροφή ως προσχηματισμένη βιταμίνη και με τη μορφή καροτένιων. Η προσχηματισμένη βιταμίνη Α συνιστάται κυρίως από ρετινυλικούς εστέρες, ρετινόλη και σε πολύ μικρή ποσότητα από ρετινοϊκό οξύ.

Ο μεταβολισμός της βιταμίνης Α ξεκινά στον αυλό του λεπτού εντέρου, όπου οι διατροφικοί ρετινυλικοί εστέρες υδρολύονται σε ρετινόλη. In vitro πειράματα προτείνουν ως πιθανά ένζυμα υδρόλυσης των ρετινυλικών εστέρων τις παγκρεατικές λιπάσες, όπως η λιπάση των τριγλυκεριδίων και η υδρολάση των χολεστερικών εστέρων [2]. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ένα ακόμα ένζυμο υδρόλυσης των ρετινυλικών εστέρων, την υδρολάση των ρετινυλικών εστέρων [2]. Το ένζυμο αυτό υδρολύει κατά προτίμηση ρετινυλικούς εστέρες με μακριά αλυσίδα, όπως οι παλμιτικοί, βρίσκεται στο εσωτερικό της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου και η δράση του ενεργοποιείται από την παρουσία τριύδροξυ και διύδροξυ χολικών αλάτων. Η σχηματισμένη από την υδρόλυση των εστέρων ρετινόλη και η διατροφική ρετινόλη γαλακτοματοποιούνται με χολικά άλατα και ελεύθερα λιπαρά οξέα ώστε να προσληφθούν από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου. Πειραματικές μελέτες υποδεικνύουν την παρουσία ενός εξειδικευμένου μεταφορέα της ρετινόλης, ο οποίος βρίσκεται στην μεμβράνη των ενετροκυττάρων και διευκολύνει την πρόσληψή της από αυτά.

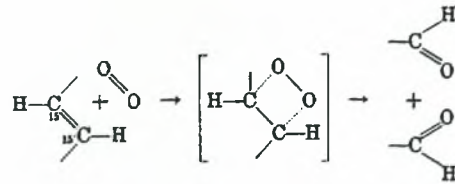
Τα διατροφικά ρετινοϊκά οξέα απορροφούνται άθικτα από τα εντεροκύτταρα και έπειτα παραδίδονται στην αιματική κυκλοφορία συμπλοκοποιημένα με αλβουμίνη.

Τα καροτένια, που είναι πρόδρομα της βιταμίνης Α και προσλαμβάνονται από τη τροφή απορροφώνται γαλακτοματοποιημένα με παθητική διάχυση από τα κύτταρα του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου, όπου υποβάλλονται σε διάσπαση του μορίου τους με αποτέλεσμα την παραγωγή ρετινάλης. Υπάρχουν καροτένια τα οποία δεν υποβάλλονται σε αυτή τη διαδικασία και μεταφέρονται άθικτα με τα χυλομικρά στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς, όπου αποθηκεύονται ή μεταβολίζονται για την παραγωγή ρετινοειδών.

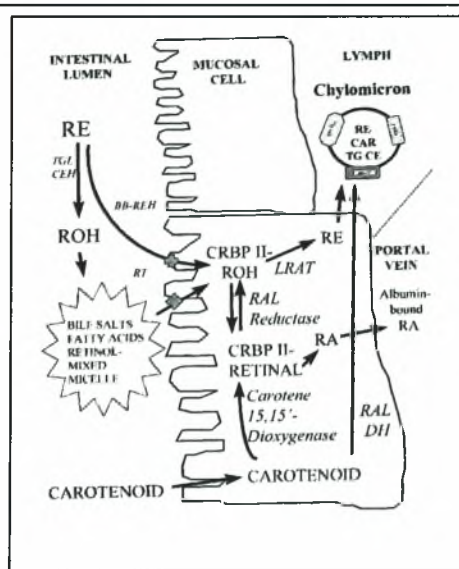
Τα β-καροτένια δεν ανήκουν στην παραπάνω κατηγορία καροτένιων, καθώς υποβάλλονται στη διαδικασία διάσπασης του μορίου τους στα εντερικά κύτταρα. Υπάρχουν δύο πιθανά μονοπάτια διάσπασης του μορίου των β-καροτένιων. Σύμφωνα με το πρώτο, που θεωρείται και το επικρατέστερο, το μόριο διαχωρίζεται ακριβώς στη μέση μεταξύ του 15 και 15' ατόμου άνθρακα και η αντίδραση αυτή, σύμφωνα με

μελέτες, καταλύεται από το ένζυμο καροτένιο-15,15'-διοξυγονάση (carotene-15-15'-dioxygenase, εικ.2.1.7). Τα αποτελέσματα της αντίδρασης είναι η παραγωγή δύο μορίων ρετινάλης. Σύμφωνα με το δεύτερο μονοπάτι, τα μόρια των β-καροτένιων διαχωρίζονται σε περιοχές μακριά από το κέντρο του μορίου, προς το σχηματισμό μικρότερων μορίων από αυτά των β-καροτένιων και το μεγαλύτερο από αυτά τα μόρια διαχωρίζεται προς τον σχηματισμό ρετινάλης. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν την ύπαρξη και ενός τρίτου μονοπατιού, κατά το οποίο προκύπτει η άμεση παραγωγή ρετινοϊκού οξέος από β-καροτένιο [17,18].

Ένα πολύ μικρό ποσοστό της ρετινάλης, που προέρχεται από τη διάσπαση του μορίου των β-καροτένιων οξειδώνεται σε ρετινοϊκό οξύ, το οποίο μεταφέρεται στην αιματική κυκλοφορία όντας συμπλοκοποιημένο με αλβουμίνη. Το μεγαλύτερο όμως ποσοστό της ρετινάλης αναγάγεται σε ρετινόλη από το ένζυμο ρεδουκτάση της ρετινάλης. Η ρεδουκτάση της ρετινάλης για να καταλύσει την αναγωγή της ρετινάλης σε ρετινόλη απαιτεί τη συμπλοκοποίηση της ρετινάλης με την CRBP II πρωτεΐνη. Η ρετινόλη παραμένει σε σύμπλοκο με τη CRBP II, ενώ με αυτή την πρωτεΐνη συνδέεται και η διατροφική ρετινόλη και η ρετινόλη, που προέρχεται από την υδρόλυση των ρετινυλικών εστέρων. Η ρετινόλη που είναι συμπλοκοποιημένη με την CRBP II μετατρέπεται σε ρετινυλικό εστέρα από το ένζυμο λεκιθίνη: ρετινάλη ακυλοτρανσφεράση (Lecithin: retinal acylotransferase-LRAT). Αυτή η ακυλοτρανσφεράση μεταφέρει sn-1 λιπαρό οξύ από τη λεκιθίνη στη ρετινόλη, με αποτέλεσμα την παραγωγή ρετινυλικού εστέρα και την απελευθέρωση της CRBP II πρωτεΐνης. Οι νεοσυντιθέμενοι ρετινυλικοί εστέρες μαζί με τριγλυκερίδια, εστέρες της χοληστερόλης, φωσφολιπίδια και άλλα διαιτητικά λιπίδια ενσωματώνονται στα χυλομικρά, που περιέχουν απολιποπρω-



Εικ.2.1.7: Απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού για την οξειδωτική κοπή των β-καροτένιων (ή άλλων καροτένιων που είναι πρόδρομα της βιταμίνης Α) που καταλύεται από το ένζυμο καροτένιο-15,15'-διοξυγενάση. Σύμφωνα με αυτό το μηχανισμό, το μοριακό οξυγόνο τοποθετείται στο διπλό δεσμό των 15-15' ατόμων άνθρακα. [2]



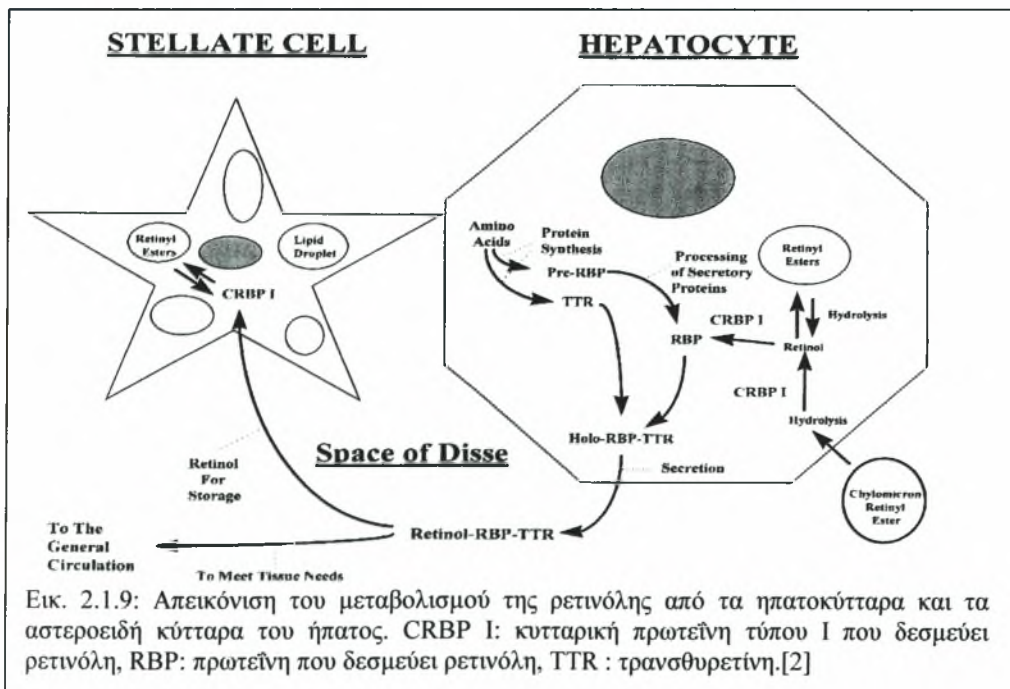
Εικ. 2.1.8 : Σχηματική απεικόνιση της εντερικής απορρόφησης και του μεταβολισμού της προσχηματισμένης βιταμίνης Α και των καροτενίων. ApoB₄₈:απολιποπρωτεΐνη B₄₈, ApoE: απολιποπρωτεΐνη E, BB-REH: υδρολάση ρετινυλικών εστέρων που βρίσκεται στο εσωτερικό της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου, CAR:καροτένια, CEH:υδρολάση εστέρων χοληστερόλης, CRBP II: κυτταρική πρωτεΐνη δέσμησης ρετινόλη τύπου II, LRAT: λεκιθίνη : ρετινόλη ακυλοτρανσφεράση, RA: ρετινοϊκό οξύ, RAL: ρετινάλη, RAL DH: δεϋδρογονάση ρετινάλης, RE: ρετινυλικοί εστέρες, RT: μεταφορέας ρετινόλης, TG: τριακυλογλυκερόλη, TGL: λιπάση τριγλυκεριδίων. [2]

τεΐνη Β (apoB). Τα χυλομικρά εκκρίνονται στο λεμφικό σύστημα και μέσω του θωρακικού πόρου στις μεγάλες φλέβες του τραχήλου (εικ.2.1.8).

Τα χυλομικρά καθώς βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος αλληλεπιδρούν με τη λιποπρωτεϊνική λιπάση, που βρίσκεται στο ενδοθήλιο των τριχοειδών και υδρολύει τα τριγλυκερίδια που περιέχονται στα χυλομικρά. Η υδρόλυση των τριγλυκεριδίων έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή λιπαρών οξέων και μικρότερων λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων, που ονομάζονται υπολείμματα χυλομικρών. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα προσλαμβάνονται από εξωηπατικούς ιστούς για την παραγωγή ενέργειας, ενώ τα υπολείμματα χυλομικρών συνδέονται με την απολιποπρωτεΐνη Ε (apoE). Η σύνδεση των υπολειμμάτων των χυλομικρών με την απολιποπρωτεΐνη Ε είναι πολύ σημαντική για την πρόσληψή τους από τα ηπατοκύτταρα.

Τα υπολείμματα των χυλομικρών καταλήγουν στο ήπαρ. Εκεί προσλαμβάνονται κυρίως από τα ηπατοκύτταρα μέσω της συμπολοκοποίησή τους με τους υποδοχείς που αναγνωρίζουν λιποπρωτεΐνες που περιέχουν την απολιποπρωτεΐνη Ε. Τέτοιοι υποδοχείς είναι ο LDL υποδοχέας (LDL receptor-LDL-R) και LRP υποδοχέας (LDL receptor related protein-LRP) [2,9]. Τα ηπατοκύτταρα εμφανίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των ρετινοειδών, γεγονός που δικαιολογεί και τις σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις της ρετινόλης, της RBP και της CRBP I πρωτεΐνης, της LRAT ακυλοτρανσφεράσης, της υδρολάσης των ρετινυλικών εστέρων και της δεϋδρογονάσης της ρετινόλης και της ρετινάλης στα κύτταρα αυτά.

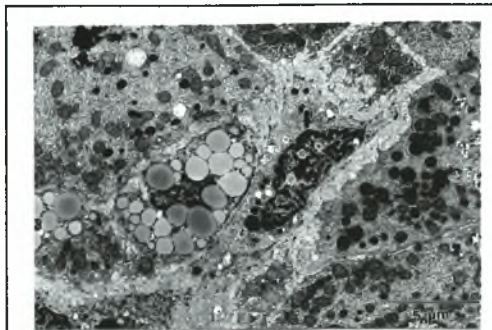
Κατά την πρόσληψη των υπολειμάτων των χυλομικρών από τα ηπατοκύτταρα λαμβάνει χώρα η υδρόλυση των ρετινυλικών εστέρων τους, από την υδρολάση των ρετινυλικών εστέρων, στην επιφάνεια ή/και στο εσωτερικό των κυστιδίων, που προκύπτουν από την ενδοκύττωση των υπολειμμάτων των χυλομικρών. Αυτή η υδρολάση των ρετινυλικών εστέρων διαφοροποιείται σε σχέση με αυτή του εντέρου καθώς δεν απαιτεί την παρουσία χολικών αλάτων για την ενεργοποίησή της. Η υδρόλυση των ρετινυλικών εστέρων οδηγεί στην παραγωγή ρετινόλης, η οποία συμπλοκοποιείται με τη CRBP I. Έπειτα, η CRBP I παραδίδει τη ρετινόλη στη RBP για να εκκριθεί από τα ηπατοκύτταρα μέσω του συμπλόκου ρετινόλη-RBP-τρανσθυρετίνη (Holo-RBP-TTR). Η ρετινόλη αφού εκκριθεί από τα ηπατοκύτταρα, με τη μορφή του παραπάνω συμπλόκου, μπορεί να απελευθερωθεί στην αιματική



Εικ. 2.1.9: Απεικόνιση του μεταβολισμού της ρετινόλης από τα ηπατοκύτταρα και τα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος. CRBP I: κυτταρική πρωτεΐνη τύπου I που δεσμεύει ρετινόλη, RBP: πρωτεΐνη που δεσμεύει ρετινόλη, TTR : τρανσθυρετίνη.[2]

κυκλοφορία για να προσληφθεί από διάφορους ιστούς ή μπορεί να κατευθυνθεί στα αστεροειδή (stellate) κύτταρα, για να αποθηκευτεί με τη μορφή ρετινυλικών εστέρων (εικ.2.1.9)

Τα αστεροειδή κύτταρα αποτελούν τα κύρια κύτταρα αποθήκευσης ρετινόλης του οργανισμού, καθώς το 50-90% της συνολικής ρετινόλης του οργανισμού βρίσκεται σε αυτά. Περίπου το 99% των ρετινοειδών στα αστεροειδή κύτταρα είναι στη μορφή ρετινυλικών εστέρων που οργανώνονται σε σταγονίδια (εικ.2.1.10). Αυτά τα σταγονίδια λιπιδίων των αστεροειδών κυττάρων αποτελούν το κύριο μορφολογικό χαρακτηριστικό τους και περιέχουν περίπου 42% ρετινυλικούς εστέρες, 28% τριγλυκερίδια, 13% χοληστερόλη και 4% φωσφολιπίδια. Το 42% των ρετινυλικών εστέρων αποτελείται



Εικ. 2.1.10: Απεικόνιση των κυτταροπλασματικών λιπιδιακών σταγονιδίων των αστεροειδών κυττάρων. (www.comparative-hepatology.com/.../s15/figure/F2)

από παλμιτικούς (70%), στεατικούς(15%), ελαϊκούς (8%), από λινελαϊκούς ρετινυλικούς εστέρες(4%) και από άλλους ρετινυλικούς εστέρες μακριάς αλυσίδας. Τα αστεροειδή κύτταρα περιέχουν αρκετή ποσότητα της CRBP I και CRABP I πρωτεΐνης και της LRA1T ακυλοτρανσφεράσης, η οποία καταλύει την μετατροπή της ρετινόλης σε ρετινυλικούς εστέρες, ενώ δεν περιέχουν αρκετή ποσότητα της RBP.

Σύμφωνα με πειραματικές μελέτες υποστηρίζεται ότι πέρα από την πρόσληψη των ρετινυλικών εστέρων των υπολειμμάτων των χυλομικρών από το ήπαρ, ένα μικρό ποσοστό αυτών, περίπου το 25%, προσλαμβάνεται από εξωηπατικούς ιστούς. Συγκεκριμένα, υποστηρίζεται ότι μετά την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων των χυλομικρών από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση, οι ρετινυλικοί εστέρες των υπολειμμάτων των χυλομικρών υδρολύονται από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση, γεγονός που επιτρέπει την πρόσληψή τους από εξωηπατικούς ιστούς όπως ο λιπώδης, ο σκελετικός και ο καρδιακός ιστός. Επιπλέον, πιστεύεται ότι ο βαθμός δραστηριότητας του ενζύμου επηρεάζει και το ποσοστό πρόσληψης των ρετινυλικών εστέρων από τους εξωηπατικούς ιστούς. Τέλος, πειραματικές μελέτες υποδεικνύουν ότι εκτός από το ήπαρ διάφοροι εξωηπατικοί ιστοί όπως οι πνεύμονες, τα νεφρά και ο λιπώδης ιστός φέρουν σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση της ρετινόλης. Με αναλύσεις των κυττάρων των ιστών αυτών από ποντίκια βρέθηκαν σε αυτά ρετινόλη, ρετινυλικοί εστέρες και τα ένζυμα παραγωγής και υδρόλυσης των ρετινυλικών εστέρων, ενώ ορισμένα κύτταρα των πνευμόνων και των νεφρών, βρέθηκαν να περιέχουν σταγονίδια λιπιδίων και να μοιάζουν μορφολογικά και δομικά με τα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος. Πιστεύεται ότι η αποθήκευση αυτή της ρετινόλης από τους εξωηπατικούς ιστούς γίνεται για την κάλυψη των τοπικών αναγκών σε ρετινόλη αλλά και ολόκληρου του οργανισμού.[2,15]

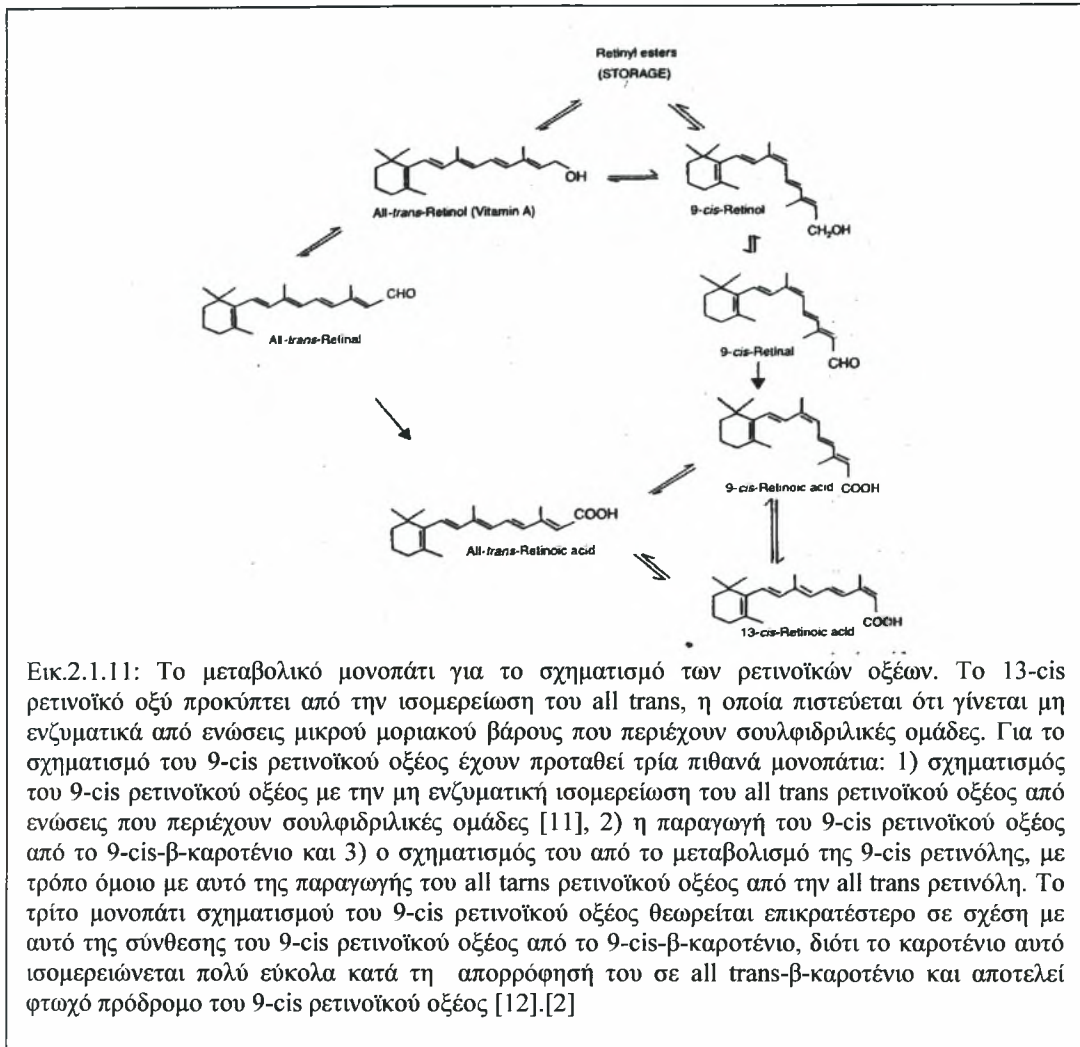
Η ρετινόλη που βρίσκεται αποθηκευμένη στα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος μπορεί να απελευθερωθεί από αυτά στην αιματική κυκλοφορία σε περιπτώσεις που υπάρχει ανάγκη πρόσληψης ρετινόλης από τους ιστούς. Για να απελευθερωθεί και να μεταφερθεί η ρετινόλη στους ιστούς-στόχους, πρέπει πρώτα να γίνει υδρόλυση των ρετινυλικών εστέρων σε ρετινόλη και έπειτα αυτή να συμπλοκοποιηθεί με τη RBP, ώστε να εκκριθεί με το σύμπλοκο ρετινόλη-RBP-τρανσθυρετίνη. Ο τρόπος πρόσληψης της ρετινόλης από τα κύτταρα-στόχους δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα και σύμφωνα με πειραματικές ενδείξεις έχουν προταθεί δύο πιθανοί μηχανισμοί.

Σύμφωνα με τον πρώτο, υπάρχουν εξειδικευμένοι υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων που αναγνωρίζουν την RBP και διευκολύνουν στην μεταφορά της ρετινόλης στο εσωτερικό του κυττάρου. Σύμφωνα με το δεύτερο μηχανισμό, η ρετινόλη διαχωρίζεται από το σύμπλοκο ρετινόλη-RBP-τρανσθυρετίνη στο υδατικό εξωκυττάριο περιβάλλον και έπειτα διαχέεται προς το εσωτερικό των κυττάρων. Πιστεύεται ότι η CRBP πρωτεΐνη επάγει τη διάχυση της ρετινόλης στο εσωτερικό των κυττάρων, διότι η ρετινόλη αλληλεπιδρά πέντε φορές γρηγορότερα με την CRBP σε σχέση με την RBP πρωτεΐνη και η δέσμευση της ρετινόλης με την CRBP μειώνει την ποσότητα της ενδοκυτταρικής ελεύθερης ρετινόλης, με αποτέλεσμα να επάγεται η διάχυσή της προς το εσωτερικό του κυττάρου.[1,2,3]

Στο εσωτερικό των κυττάρων, η νεοπροσληφθείσα ρετινόλη μεταβολίζεται προς την παραγωγή ρετινοϊκών οξέων, ενώ σε περίπτωση που η ενδοκυτταρική συγκέντρωσή της υπερβαίνει των απαιτήσεων σε ρετινόλη του κυττάρου, η ποσότητα της ρετινόλης που περισεύει μετατρέπεται σε ρετινυλικούς εστέρες και αποθηκεύεται στο κύτταρο.

Με σκοπό την παραγωγή ρετινοϊκών οξέων, αρχικά η ρετινόλη οξειδώνεται σε ρετινάλη. Για την κατάλυση αυτής της αντίδρασης έχουν προταθεί δύο πιθανές οικογένειες ενζύμων, που είναι: α) η οικογένεια των ADHs (cytosolic medium-chain alcohol dehydrogenases) δεϋδρογονασών, που αποτελείται από δεϋδρογονάσες, οι οποίες στον άνθρωπο παράγονται από εννιά γονίδια, βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και καταλύουν την οξείδωση της ελεύθερης ρετινόλης (μη συμπλοκοποιημένη με πρωτεΐνη δέσμευσης) και απαιτούν NAD^+ για τη δράση τους β) και η οικογένεια των SCAD (short-chain alcohol dehydrogenases) δεϋδρογονασών, που αποτελείται περίπου από 60 μέλη των 28-32 kDa. Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται στο εσωτερικό των μικροσωματίων και καταλύουν την οξείδωση της ρετινόλης σε ρετινάλη, όταν αυτή είναι συμπλοκοποιημένη με την CRBP I πρωτεΐνη. Επιπλέον, έχουν προταθεί και τρεις τύποι δεϋδρογονασών της ρετινόλης (RoDH I, RoDH II, RoDH III) ως πιθανά ένζυμα κατάλυσης της οξείδωσης της ρετινόλης. Τα ένζυμα αυτά, που βρίσκονται στο εσωτερικό των μικροσωματίων, καταλύουν την οξείδωση της ρετινόλης που είναι συνδεδεμένη με την CRBP I πρωτεΐνη και απαιτούν NADP^+ για την δράση τους. [2,10] Η παραγόμενη από την οξείδωση της ρετινόλης, ρετινάλη, οξειδώνεται προς την παραγωγή του all trans ρετινοϊκού οξέος. Η αντίδραση αυτή πιθανολογείται ότι καταλύεται από τις δεϋδρογονάσες της ρετινάλης, που είναι ένζυμα που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και καταλύουν την οξείδωση της all trans ρετινάλης και της 9-cis ρετινάλης, παρουσία NAD^+ και ορισμένα από τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν ως υπόστρωμα τη ρετινάλη που είναι συνδεδεμένη με την CRBP I πρωτεΐνη. Επιπλέον, έχουν προταθεί ως πιθανά ένζυμα κατάλυσης της οξείδωσης της ρετινάλης και οι αλδεϊδικές δεϋδρογονάσες, που είναι επίσης κυτταροπλασματικά ένζυμα και απαιτούν NAD^+ για τη δράση τους και καταλύουν την οξείδωση της all trans-, 9-cis- και 13-cis ρετινάλης στα αντίστοιχα ρετινοϊκά οξέα.

Μετά την παραγωγή του all trans ρετινοϊκού οξέος, αυτό μπορεί να συνδεθεί με τους πυρηνικούς υποδοχείς των ρετινοϊκών οξέων, με σκοπό τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, που αφορούν ποικίλες βιολογικές διαδικασίες, όπως η διαφοροποίηση και η μορφογένεση των κυττάρων. Επιπλέον, το all trans ρετινοϊκό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την παραγωγή διαφόρων ρετινοϊκών οξέων, όπως του 13-cis ρετινοϊκού οξέος και του 9-cis ρετινοϊκού οξέος (εικ.2.1.11).



Έχει βρεθεί ότι *in vivo* λαμβάνει χώρα ο οξειδωτικός μεταβολισμός του all trans ρετινοϊκού οξέος προς την παραγωγή διαφόρων οξέων, όπως το 5,6-έποξυ-ρετινοϊκό οξύ, το 4-ύδροξυ-ρετινοϊκό οξύ και το 4-όξο-ρετινοϊκό οξύ κ.ά. Μερικοί από αυτούς τους μεταβολίτες δρουν ως ενεργοί βιολογικά μεταβολίτες του all trans ρετινοϊκού οξέος, ενώ άλλοι προκύπτουν ως προϊόντα καταβολισμού της ρετινόλης. Η ενζυματική διαδικασία που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή αυτών των οξέων δεν έχει αναγνωριστεί ακόμα, ωστόσο πιστεύεται ότι σε αυτήν τη διαδικασία έχει σημαντικό ρόλο το κυτόχρωμα P450. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι τα ρετινοϊκά οξέα και η ρετινόλη συνδέονται με γλυκουρονικό οξύ, με αποτέλεσμα την αύξηση της πολικότητάς τους και την ευκολότερη απομάκρυνσή τους από τον οργανισμό. Η διαδικασία αυτή πιστεύεται ότι αποτελεί μονοπάτι του καταβολισμού της βιταμίνης Α και υπεύθυνο ένζυμο για την κατάλυση της σύζευξης θεωρείται η UDP-γλυκουρονοσυλτρανσφεράση. Τα συζευγμένα με γλυκουρονικό οξύ ρετινοειδή αποβάλλονται από τον οργανισμό μέσω της χολής, μπορεί όμως ένα ποσοστό αυτών να υδρολυθούν προς την παραγωγή ελεύθερων ρετινοειδών, με αποτέλεσμα την παραμονή των τελευταίων στον οργανισμό.[1,2,13]

II.1.ε. Η Βιταμίνη Α στο πλάσμα

Στον ορό υγιών ατόμων, η βιταμίνη Α βρίσκεται με τη κύρια μορφή της, ως ρετινόλη σε συγκέντρωση 100-1000 ng/mL και με τη μορφή των διαφόρων μεταβολιτών της, όπως το all trans ρετινοϊκό οξύ που βρίσκεται σε συγκέντρωση 1,2-4,2 ng/ml, το 13-cis ρετινοϊκό οξύ σε συγκέντρωση 1,2-3 ng/ml, οι παλμιτικοί εστέρες σε συγκέντρωση 5-20 ng/ml κ.ά. Ένα μικρό ποσοστό των ρετινυλικών εστέρων της ρετινόλης στον ορό βρίσκονται σε VLDL και LDL κλάσματα. Στον ορό ένα μικρό ποσοστό της ρετινόλης και των οξέων της βρίσκεται συνδεδεμένο με γλυκουρονικό οξύ (6,8 nmol/l). Τέλος, υπάρχουν και μικρές συγκεντρώσεις των retro-μεταβολιτών της ρετινόλης, όπως είναι η 14-ύδροξυ-retro-ρετινόλη και η άνυδρο-retro-ρετινόλη. Οι μεταβολίτες αυτοί παράγονται σε κύτταρα συγκεκριμένων ιστών, όπως είναι τα λεμφοκύτταρα, από ένα διαφορετικό μεταβολικό μονοπάτι σε σχέση με αυτό της κλασικής οδού μεταβολισμού της ρετινόλης, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Οι retro-μεταβολίτες της ρετινόλης πιστεύεται ότι ελέγχουν τη διαδικασία διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων στα οποία παράγονται.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα επίπεδα της ρετινόλης στο πλάσμα είναι μικρότερα στα παιδιά, ενώ αυξάνονται στους εφήβους και στους ενήλικες και επηρεάζονται από περιπτώσεις εγκυμοσύνης, κατανάλωσης αντισυλληπτικών, νεφροπαθειών και ηπατοπαθειών. Υποστηρίζεται ότι σε περιπτώσεις που υπάρχει μόλυνση, φλεγμονή ή τραύμα στον οργανισμό τα επίπεδα της ρετινόλης στον ορό μπορεί να μειωθούν σημαντικά, ενώ σε περίπτωση που δεν υπάρχει κάποια φλεγμονή ή μόλυνση στον οργανισμό τα χαμηλά επίπεδα της ρετινόλης στον ορό μπορεί να οφείλονται στην ελάττωση της αποθηκευμένης ρετινόλης στο ήπαρ.[1,2,14,16]

Η.2 Ιογενής Ηπατίτιδα

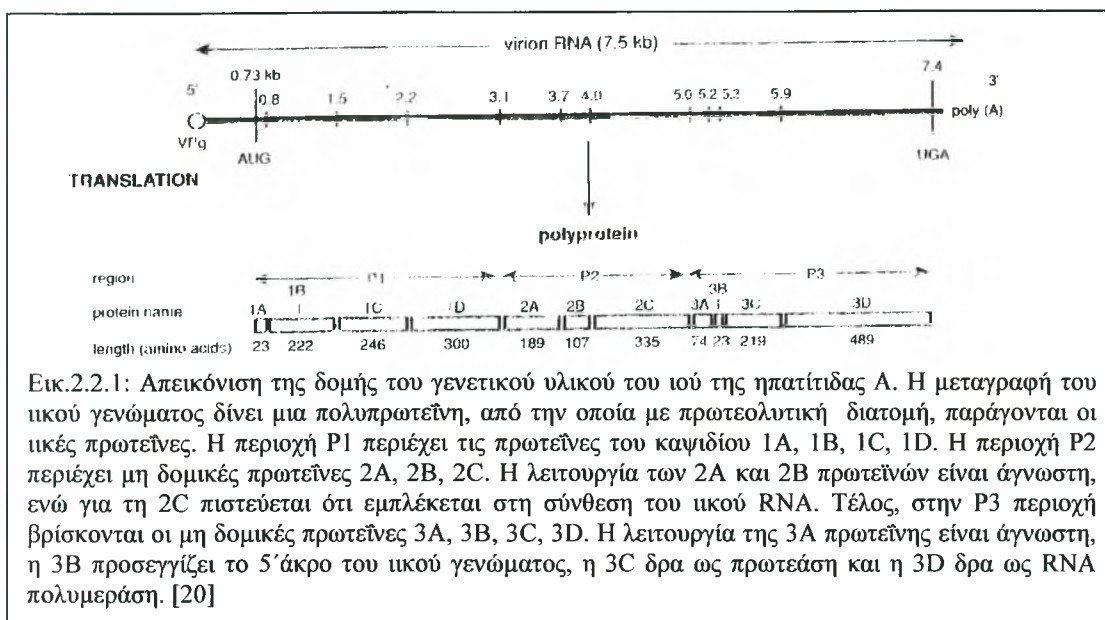
Η.2.α. Το ήπαρ

Το ήπαρ είναι ο μεγαλύτερος αδένας του ανθρώπινου σώματος, βρίσκεται στο άνω δεξί τμήμα της κοιλιακής χώρας και ζυγίζει περίπου 1500g σε ένα ενήλικο άτομο. Τα κύρια συστατικά του ήπατος είναι τα ηπατικά λόβια, οι χοληφόροι πόροι, τα αγγεία και τα νεύρα. Το ήπαρ αποτελείται από τα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, όπως τα κύτταρα Kupffer, που έχουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες και από τα παρεγχυματικά κύτταρα, τα οποία επιτελούν τη μεταβολική δραστηριότητα του ήπατος και αποτελούν το 80% του συνολικού όγκου του οργάνου. Ακόμα, το ήπαρ διαθέτει τα λιποαποταμιευτικά αστεροειδή (stellate) κύτταρα (κύτταρα του Ito), που αποθηκεύουν τη βιταμίνη Α. Γειτονικά με τα παρεγχυματικά κύτταρα βρίσκονται τα φλεβικά κολποειδή, που μεταφέρουν αίμα από τη πυλαία φλέβα και την ηπατική αρτηρία στην κεντρική φλέβα, και τα χοληφόρα τριχοειδή, μέσω των οποίων η χολή εκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα στους χοληφόρους πόρους. Το ήπαρ είναι ένα ζωτικής σημασίας όργανο καθώς διεξάγει ποικίλες μεταβολικές λειτουργίες, όπως ο μεταβολισμός και η απέκκριση ενδογενών (χολερυθρίνη) και εξωγενών (φάρμακα, αιθυλική αλκοόλη) ουσιών, η απέκκριση χολής, ο μεταβολισμός θρεπτικών συστατικών (υδατανθράκων, πρωτεϊνών, λιπών), η σύνθεση πρωτεϊνών (λευκωματίνης, παραγόντων της πήξης και του συμπληρώματος, αναστολέων πρωτεασών) και λιπαρών οξέων, η αποθήκευση βιταμινών και ιχνοστοιχείων και η φαγοκυττάρωση ποικίλων παραγόντων από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα του ήπατος (Kupffer).[68]

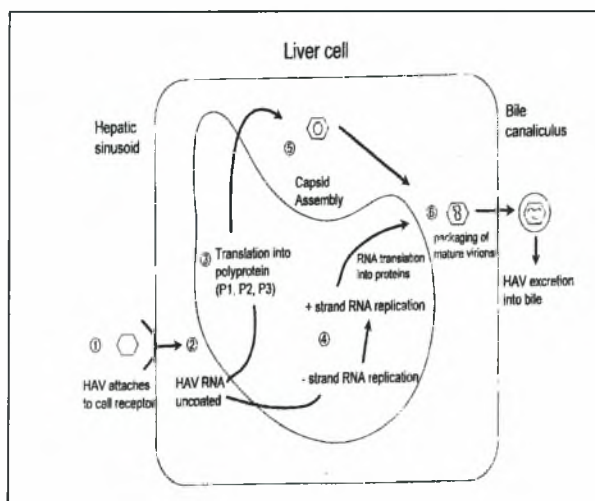
Μια από τις πιο κοινές αιτίες ηπατοπάθειας είναι η ηπατίτιδα, που εκδηλώνεται ως βλάβη στα ηπατικά κύτταρα. Η πιο συχνή αιτία οξείας ηπατίτιδας είναι οι λοιμώδεις παράγοντες, ιδιαίτερα οι ιοί και οι τοξίνες, όπως η παρακεταμόλη και ο τετραχλωράνθρακας. Οι ιοί που κυρίως σχετίζονται με ηπατίτιδα είναι οι ιοί της ηπατίτιδας Α, Β, C, D, E, G, που έχουν κύριο στόχο μόλυνσης το ήπαρ. Υπάρχουν όμως και πολλοί άλλοι όπως ο ιός Epstein-Barr, κυτομεγαλοϊός, Marburg, influenza κ.ά., οι οποίοι προκαλούν νοσηρότητα στον οργανισμό συμπεριλαμβανομένου και του ήπατος. Πολλές περιπτώσεις ηπατίτιδας υποχωρούν πλήρως, σε ορισμένες όμως περιπτώσεις αναπτύσσεται χρόνια ηπατίτιδα, που ορίζεται ως ηπατική φλεγμονή που παραμένει χωρίς βελτίωση για έξι μήνες. Οι αιτίες που μπορούν να οδηγήσουν σε χρόνια ηπατίτιδα είναι η αυτοάνοση ηπατική βλάβη, η χρόνια λοίμωξη με ηπατίτιδα από ιό Β ή C, το αλκοόλ και τα φάρμακα.[68,69]

Η.2.β. Ηπατίτιδα Α

Ο ιός της ηπατίτιδας Α ανήκει στην οικογένεια των Πικορναϊών, έχει εικοσαεδρικό σχήμα με διάμετρο 27-28 nm και δεν περιβάλλεται από φάκελο. Το γενετικό υλικό του ιού είναι ένα γραμμικό, θετικής πολικότητας, μονόκλωνο μόριο RNA, το οποίο στο 5' άκρο του συνδέεται με πρωτεΐνη και στο 3' άκρο του φέρει poly(A) ουρά (εικ.2.2.1). Το ικό RNA έχει μήκος περίπου 7,5 kb. Ο ιός της ηπατίτιδας Α είναι παθογόνος για τον άνθρωπο, τους χιμπατζήδες και για άλλα θηλαστικά και πολλαπλασιάζεται αποκλειστικά στα κύτταρα του ήπατος (εικ.2.2.2). Επιπλέον, ο ιός της ηπατίτιδας Α είναι αρκετά ανθεκτικός στη θερμότητα (60°C x 60 min) και σε χημικές ουσίες (π.χ. δισοξαρίλη) και έχει πυκνότητα επίπλευσης και συντελεστή καθίζησης 1,32-1,34 gr/cm³ (σε CsCl) και 156-160 S αντίστοιχα.



Εικ.2.2.1: Απεικόνιση της δομής του γενετικού υλικού του ιού της ηπατίτιδας Α. Η μεταγραφή του ιικού γενώματος δίνει μια πολυπρωτεΐνη, από την οποία με πρωτεολυτική διατομή, παράγονται οι ιικές πρωτεΐνες. Η περιοχή P1 περιέχει τις πρωτεΐνες του καψιδίου 1Α, 1Β, 1C, 1D. Η περιοχή P2 περιέχει μη δομικές πρωτεΐνες 2Α, 2Β, 2C. Η λειτουργία των 2Α και 2Β πρωτεϊνών είναι άγνωστη, ενώ για τη 2C πιστεύεται ότι εμπλέκεται στη σύνθεση του ιικού RNA. Τέλος, στην P3 περιοχή βρίσκονται οι μη δομικές πρωτεΐνες 3Α, 3Β, 3C, 3D. Η λειτουργία της 3Α πρωτεΐνης είναι άγνωστη, η 3Β προσεγγίζει το 5' άκρο του ιικού γενώματος, η 3C δρα ως πρωτεάση και η 3D δρα ως RNA πολυμεράση. [20]



Εικ.2.2.2: Ο πολλαπλασιασμός του ιού της ηπατίτιδας Α. 1) Ο ιός αλληλεπιδρά με συγκεκριμένο μεμβρανικό υποδοχέα των κυττάρων του ήπατος και εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα, όπου απελευθερώνεται το ιικό RNA. 2) Το ιικό RNA μεταγράφεται σε πολυπρωτεΐνη 3) Η ιική RNA πολυμεράση αντιγράφει το ιικό RNA στο συμπληρωματικό του RNA αρνητικής πολικότητας, που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του ιικού RNA. 4) Το ιικό RNA μεταφράζεται για τη σύνθεση των πρωτεϊνών του ιού. Οι ιικές πρωτεΐνες και το ιικό RNA συναρμολογούνται για το σχηματισμό νέων σωματιδίων του ιού. 5,6) οι ιοί απελευθερώνονται στο λεπτό έντερο μέσω της χολής και τελικά εκκρίνονται στα κόπρανα.[20]

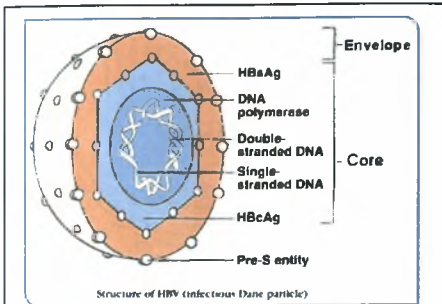
Οι κύριοι οδοί της μόλυνσης από τον ιό της ηπατίτιδας Α είναι μέσω της οδού κοπράνων-στόματος, της κατανάλωσης μολυσμένης τροφής και νερού και μέσω της παρεντερικής οδού από μολυσμένο αίμα ή από μολυσμένα προϊόντα αίματος ή σπάνια με τη σεξουαλική επαφή.

Η περίοδος επώασης του ιού είναι συνήθως 2-6 εβδομάδες. Τα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα μπορεί να θανατωθούν από τα λεμφοκύτταρα κατά την κυτταροτοξική απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο ιός της ηπατίτιδας Α μπορεί να προκαλέσει οξεία φλεγμονή στο ήπαρ του ξενιστή, η οποία μπορεί να αντιμετωπιστεί χωρίς να αναπτυχθεί χρόνια ηπατοπάθεια. Ακόμα, η λοίμωξη από τον ιό μπορεί να είναι και ασυμπτωματική. Η διάγνωση της ηπατίτιδας Α γίνεται με ορολογική εξέταση ανίχνευσης του ειδικού για τον ιό IgM αντίσωμα με ELISA.

Σύμφωνα, με επιδημιολογικές μελέτες η ηπατίτιδα Α είναι ενδημική στις περισσότερες χώρες και ιδιαίτερα στις τροπικές. Επιδημίες εμφανίζονται από καιρό σε καιρό, μερικές από τις οποίες σχετίζονται με μόλυνση της τροφής και του ύδατος. Τέλος, τα άτομα ηλικίας 5-15 ετών είναι περισσότερο ευάλωτα στη μόλυνση από τον ιό, αλλά επιδημίες που ξεκινούν από τη τροφή συχνά επηρεάζουν και τους ενήλικες.[21]

II.2.c. Ηπατίτιδα Β

Ο ιός της ηπατίτιδας Β (εικ.2.2.3.) ανήκει στην οικογένεια των Ηπαντναϊών, έχει δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA 3,2 kb με μονόκλωνες περιοχές (εικ.2.2.4) και περιβάλλεται από φάκελο.



Εικ.2.2.3.: Απεικόνιση του ιού της ηπατίτιδας Β. Ο ιός περιβάλλεται από φάκελο στην επιφάνεια του οποίου βρίσκονται πρωτεΐνες (pre-S entity) ορισμένες από τις οποίες εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση του ιού με τα κύτταρα του ήπατος. Στην επιφάνεια του φακέλου βρίσκεται και το αντιγόνο HBsAg. Στο εσωτερικό περιβλήμα (core) του ιού βρίσκεται η DNA πολυμεράση, το αντιγόνο HBcAg και το ικό DNA, που είναι δίκλωνο με μονόκλωνες περιοχές. (http://rds.yahoo.com/S=96062883/K=hepatitis+B/v=2/SID=e/I=IVR/SIG=11r0vtcaf/*-http%3A/www.worldwidevaccines.com/hepatitis_b/virus.asp)

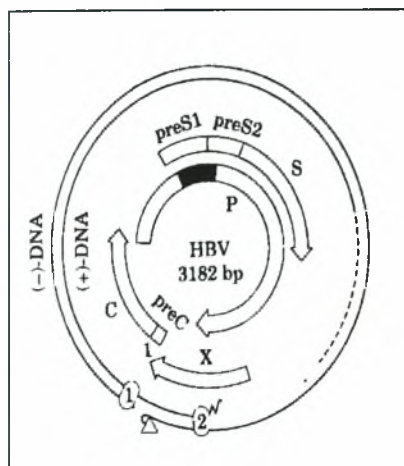
Τα σωματίδια του ιού της ηπατίτιδας Β είναι σχεδόν σφαιρικά με διάμετρο 42nm και είναι γνωστά ως σωματίδια του Dane. Σε μολυσμένο αίμα ανιχνεύονται ακόμα σφαιρικά σωματίδια με διάμετρο 22nm και σωληνωτές δομές, που προκύπτουν από τη συσσωμάτωση του αντιγόνου της επιφάνειας του ιού και των λιπιδίων του ξενιστή. Τα σωματίδια αυτά δεν είναι μολυσματικά καθώς δεν περιέχουν νουκλεϊνικό οξύ και έχουν πυκνότητα επίπλευσης 1,18 gr/cm³ (CsCl) και συντελεστή καθίζησης 39-54S. Τα ικά σωματίδια έχουν πυκνότητα επίπλευσης 1,3 gr/cm³ (CsCl) και συντελεστή καθίζησης 30S.

Ο ιός της ηπατίτιδας Β μεταδίδεται μέσω της μετάγγισης με μολυσμένο αίμα, από τη μητέρα στο έμβryo, δια του δέρματος με τη χρήση μολυσμένης βελόνας, που αποτελεί μια συνήθη αιτία μόλυνσης των τοξικομανών και με τη σεξουαλική επαφή, ενώ δεν υπάρχουν πειστικές αποδείξεις για την πιθανή μετάδοση του ιού δια του στόματος με το σάλιο.

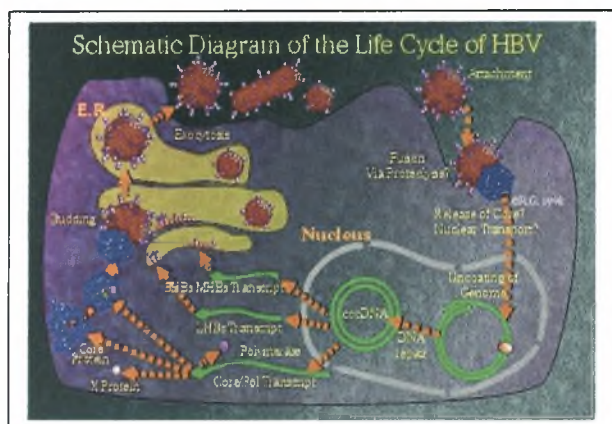
Η διάγνωση της ηπατίτιδας Β γίνεται με ορολογική εξέταση των αντιγόνων του ιού και των αντισωμάτων των ικών αντιγόνων. Τα αντι-

γόνα του ιού είναι το HBsAg, που είναι γλυκοπρωτεΐνη της επιφάνειας του ιού, βρίσκεται στα σωματίδια των 22nm και στα σωματίδια του Dane και εμφανίζει τέσσερις υποτύπους (adw, adr, ayw, ayr), το HBcAg, που είναι αντιγόνο της εσωτερικής μεμβράνης και το HBeAg, το οποίο αποτελεί μέρος της πρωτεΐνης του εσωτερικού περιβλήματος του σωματιδίου του Dane.

Το αντιγόνο HBsAg ανιχνεύεται με ELISA και η παρουσία του στον ορό υποδηλώνει οξεία ή χρόνια ηπατίτιδα Β. Μετά την απομάκρυνση του αντιγόνου από τον ορό είναι ανιχνεύσιμο το αντίσωμα του αντιγόνου (Anti-HBs), η παρουσία του οποίου φανερώνει την ανάρρωση του ασθενούς με ηπατίτιδα Β. Το αντιγόνο HBcAg δεν είναι ανιχνεύσιμο στον ορό, ωστόσο ανιχνεύσιμα είναι τα αντισώματά του, το IgM και το IgG. Η ανίχνευση του IgM συνήθως σχετίζεται με οξεία ηπατίτιδα Β, ενώ η ανίχνευση του IgG υποδηλώνει την ανάρρωση του ασθενούς. Το IgG μπορεί να ανιχνευτεί ταυτόχρονα με το HBsAg σε περιπτώσεις χρόνιας ηπατίτιδας Β. Το αντιγόνο HBeAg, παρόλο που αποτελεί πρωτεΐνη του εσωτερικού περιβλήματος του ιού, βρίσκεται στο αίμα ασθενούς στη φάση οξείας ηπατίτιδας Β για σύντομο χρονικό διάστημα. Η παρουσία του αντιγόνου στον ορό δείχνει ενεργό αντιγραφή του ιού και βρίσκεται σε υψηλή αναλογία σε ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα μετά από ηπα-



Εικ.2.2.4: Η δομή του γενετικού υλικού του ιού της ηπατίτιδας Β. Το γενετικό υλικό του ιού είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA, που αποτελείται από το κλώνο (-)-DNA και από το κλώνο (+)-DNA, που είναι μικρότερο σε μήκος από το πρώτο κλώνο. Με το κλώνο (-)-DNA συνδέεται η πολυμεράση (μεγάλο τρίγωνο) του ιού και με το κλώνο (+)-DNA συνδέεται ένα ολιγοριβονουκλεοτίδιο (η γραμμή με τις γωνίες). Τα βέλη στο εσωτερικό αντιπροσωπεύουν τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης: preC και C (precore και core πρωτεΐνες), P (πολυμεράση), preS1, preS2 και S (L, M και S πρωτεΐνες τις επιφάνειας του φακέλου) και η X πρωτεΐνη (δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής). Οι πρωτεΐνες που παράγονται από την preC και C περιοχή είναι πρωτεΐνες του νουκλεοκαψιδίου και σχετίζονται και με τη μολυσματικότητα του ιού. Η πολυμεράση (P περιοχή) είναι ένα πολυλειτουργικό ένζυμο καθώς δρα ως εκκινήτης για την έναρξη της αντιγραφής, ως αντίστροφη μεταγραφή και ως RNase H. Η πρωτεΐνη X συμβάλλει στην αποδοτικότερη αντιγραφή του ιού καθώς αλληλεπιδρά με διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες και μπορεί ακόμα να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και το θάνατο του κυττάρου. Στο 5' άκρο των κλώνων υπάρχουν τα DR1 και DR2 στοιχεία (είναι άμεσες επαναλήψεις έντεκα νουκλεοτιδίων), που απαιτούνται για την σύνθεση των κλώνων κατά την αντιγραφή. Επιπλέον, στο ιικό DNA υπάρχουν δύο ενισχυτές ο En I και ο En II, που εξασφαλίζουν την ειδικευμένη έκφραση του ιικού γενώματος στα κύτταρα του ήπατος. Τέλος, στην S περιοχή βρίσκονται ρυθμιστικά στοιχεία των γλυκοκορτικοειδών, που σχετίζονται με την αυξημένη μεταγραφή του ιικού γενώματος υπό την παρουσία γλυκοκορτικοειδών. [1]



Εικ.2.2.5.: Ο πολλαπλασιασμός του ιού της ηπατίτιδας Β. Ο ιός αλληλεπιδρά με ειδικό υποδοχέα στην επιφάνεια των ηπατικών κυττάρων, συγχωνεύεται με τη κυτταρική μεμβράνη και απελευθερώνει το νουκλεοκαψίδιο στο κυτταρόπλασμα. Το νουκλεοκαψίδιο μεταφέρεται στον πυρήνα όπου το ιικό DNA μετασχηματίζεται από την πολυμεράση σε ένα ομοιολογικά κλειστό κυκλικό σχηματισμό (covalently closed circular for cccDNA) στον οποίο οι μονόκλωνες περιοχές του ιικού γενώματος γίνονται δίκλωνες. Το cccDNA μεταγράφεται προς την παραγωγή των τεσσάρων ιικών RNA, που έχουν μήκος 3.5, 2.4, 2.1 και 0.7 kb. Τα ιικά RNA διακρίνονται σε αυτά που μεταφράζονται σε ιικές πρωτεΐνες και στα προγονιδιωματικά RNA (pregenomic RNA-pgRNA). Τα RNA, που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, πολυαδενυλιώνονται και μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα, όπου και μεταφράζονται. Οι πρωτεΐνες του φακέλου εισέρχονται ως ενδομεμβρικές πρωτεΐνες στη λιπιδιακή μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Τα προγονιδιωματικά μόρια RNA πολυαδενυλιώνονται και συσκευάζονται μαζί με την RNA πολυμεράση και μια πρωτεϊνική κινάση στο εσωτερικό περιβλήμα των σωματιδίων για το σχηματισμό RNA προ-ιόν. Οι RNA προ-ιόν με την αντίστροφη πολυμεράση μετατρέπονται βαθμιαία σε ισομάτια αρχικά με μόρια υβρίδια με RNA-DNA, ύστερα με μονόκλωνο DNA και τέλος σε ιούς με ατελές δίκλωνο κυκλικό DNA. Τα ώριμα νουκλεοκαψίδια μπορούν να ακολουθήσουν δύο ενδοκυτταρικές πορείες, μια από τις οποίες οδηγεί στο σχηματισμό και την έκκριση των νέων ιών, ενώ η άλλη οδηγεί στην ενίσχυση του προερχόμενου από ιό γονιδιώματος μέσα στον πυρήνα των κυττάρων. Με σκοπό την παραγωγή νέων ιών, τα νουκλεοκαψίδια μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου συνδέονται με τις πρωτεΐνες του φακέλου και βλαστάνουν στο εσωτερικό του αυλού του ενδοπλασματικού δικτύου για να μεταφερθούν στο Golgi και από κει να εκκριθούν στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου. Με σκοπό την ενίσχυση του ιικού γενώματος, τα νουκλεοκαψίδια απελευθερώνουν το γένωμα στον πυρήνα για την ενίσχυση του cccDNA. (www.globalserve.net/~harlequin/HBV/hbvcycle.htm).

γής των τεσσάρων ιικών RNA, που έχουν μήκος 3.5, 2.4, 2.1 και 0.7 kb. Τα ιικά RNA διακρίνονται σε αυτά που μεταφράζονται σε ιικές πρωτεΐνες και στα προγονιδιωματικά RNA (pregenomic RNA-pgRNA). Τα RNA, που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, πολυαδενυλιώνονται και μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα, όπου και μεταφράζονται. Οι πρωτεΐνες του φακέλου εισέρχονται ως ενδομεμβρικές πρωτεΐνες στη λιπιδιακή μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Τα προγονιδιωματικά μόρια RNA πολυαδενυλιώνονται και συσκευάζονται μαζί με την RNA πολυμεράση και μια πρωτεϊνική κινάση στο εσωτερικό περιβλήμα των σωματιδίων για το σχηματισμό RNA προ-ιόν. Οι RNA προ-ιόν με την αντίστροφη πολυμεράση μετατρέπονται βαθμιαία σε ισομάτια αρχικά με μόρια υβρίδια με RNA-DNA, ύστερα με μονόκλωνο DNA και τέλος σε ιούς με ατελές δίκλωνο κυκλικό DNA. Τα ώριμα νουκλεοκαψίδια μπορούν να ακολουθήσουν δύο ενδοκυτταρικές πορείες, μια από τις οποίες οδηγεί στο σχηματισμό και την έκκριση των νέων ιών, ενώ η άλλη οδηγεί στην ενίσχυση του προερχόμενου από ιό γονιδιώματος μέσα στον πυρήνα των κυττάρων. Με σκοπό την παραγωγή νέων ιών, τα νουκλεοκαψίδια μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου συνδέονται με τις πρωτεΐνες του φακέλου και βλαστάνουν στο εσωτερικό του αυλού του ενδοπλασματικού δικτύου για να μεταφερθούν στο Golgi και από κει να εκκριθούν στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου. Με σκοπό την ενίσχυση του ιικού γενώματος, τα νουκλεοκαψίδια απελευθερώνουν το γένωμα στον πυρήνα για την ενίσχυση του cccDNA. (www.globalserve.net/~harlequin/HBV/hbvcycle.htm).

τίτιδα Β. Στους ασθενείς αυτούς το αντιγόνο εμφανίζει συνεχή παρουσία στον ορό. Τέλος, η ανίχνευση του αντισώματος του αντιγόνου ΗΒεΑg σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα αντιγραφής και μολυσματικότητας του ιού. Επιπλέον, η διάγνωση της ηπατίτιδας Β μπορεί να γίνει με PCR, που έχει ευαισθησία ανίχνευσης δέκα μορίων DNA του ιού ανά ml ορού, με Southern υβριδισμό, με in situ υβριδισμό και με ανοσοϊστοχημική ανάλυση ηπατικού ιστού. [20,21]

Η κλινική εκδήλωση της μόλυνσης από τον ιό της ηπατίτιδας Β ποικίλει αρκετά μπορεί να είναι οξεία ηπατίτιδα, ικτερική ή μη ικτερική, μπορεί να αναπτυχθεί κίρρωση ή και χρόνια ηπατίτιδα ή ακόμα και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Η κλινική εκδήλωση της μόλυνσης εξαρτάται από τα επίπεδα αντιγραφής του ιού, από την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή και από την ηλικία του ατόμου που μολύνθηκε, π.χ. η μόλυνση των νεογέννητων και των παιδιών σχετίζεται με υψηλή πιθανότητα ανάπτυξης χρόνιας ηπατίτιδας. Αντίθετα, η μόλυνση ενήλικων ατόμων σχετίζεται με μικρή πιθανότητα εμφάνισης χρόνιας ηπατίτιδας. Ο ιός της ηπατίτιδας Β προκαλεί έμμεσα την απόπτωση των μολυσμένων από τον ιό κύτταρα, μέσω της κυτταροτοξικής απόκρισης που επάγει.

Η ανάπτυξη οξείας ηπατίτιδας Β μετά από μόλυνση από τον ιό διαρκεί 1-4 μήνες και το 30% των ασθενών με οξεία ηπατίτιδα Β αναπτύσσουν ίκτερο. Στον ορό ασθενών με οξεία ηπατίτιδα Β παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα της τρανσαμινάσης του ασπαραγινικού οξέως και της αλανίνης, που αντανακλούν στη κυτταρική βλάβη. Ακόμα, σε ασθενείς με ικτερική ηπατίτιδα παρατηρούνται και αυξημένα επίπεδα χολερυθρίνης στον ορό. Για την πρόγνωση της οξείας ηπατίτιδας μελετάται ο χρόνος προθρομβίνης, η αύξηση του οποίου συχνά αποτελεί πρώιμο σύμπτωμα ηπατικής νόσου. Το 0,1%-0,5% των ασθενών με οξεία ηπατίτιδα Β αναπτύσσουν ηπατική ανεπάρκεια.

Η ανάπτυξη χρόνιας ηπατίτιδας Β είναι αντιστρόφως ανάλογη με την ηλικία, έτσι τα παιδιά ηλικίας 1-5 ετών που είναι μολυσμένα από τον ιό, σε ποσοστό 30% αναπτύσσουν χρόνια ηπατίτιδα, ενώ οι ενήλικοι ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα αναπτύσσουν χρόνια ηπατίτιδα μόλις σε ποσοστό 5%. Η χρόνια ηπατίτιδα αποτελείται από δύο φάσεις: από την αρχική φάση, που χαρακτηρίζεται από την αντιγραφή του ιού και από ενεργή ηπατική νόσο και από τη δεύτερη φάση, που χαρακτηρίζεται από ύφεση της ηπατικής νόσου και μη αντιγραφή του ιού. Η χρόνια ηπατίτιδα Β δύναται να πάρει δύο



τύπους, αυτόν της χρόνιας διαρκούσας ηπατίτιδας, η οποία χαρακτηρίζεται από φλεγμονώδη σημεία στο ήπαρ με ελάχιστα ή καθόλου συμπτώματα και αυτόν της χρόνιας ενεργούς ηπατίτιδας, που είναι μια σοβαρή ασθένεια με δυσλειτουργία του ήπατος, η όποια στο 15-20% των περιπτώσεων οδηγεί σε κίρρωση και τελικά σε προοδευτική ανεπάρκεια. Ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα των τρανσαμινάσεων και αυξημένο χρόνο προθρομβίνης.

Η χρόνια ηπατίτιδα Β μπορεί να επάγει την ανάπτυξη πρωτοπαθούς ηπατικού όγκου. Ο ιός της ηπατίτιδας Β παγκοσμίως έχει αναγνωριστεί ως μια από τις κύριες αιτίες ανάπτυξης ηπατικού όγκου. Το γενετικό υλικό του ιού έχει βρεθεί ενσωματωμένο στο γενετικό υλικό του ξενιστή κυττάρου στο πρώιμο στάδιο ακόμα του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και πιστεύεται ότι εξαιτίας της ενσωμάτωσης αυτής διεγείρεται η έκφραση των ογκογονιδίων ή καταστέλλεται η έκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Ακόμα, έχει βρεθεί ότι η Χ πρωτεΐνη του ιού (εικ.2.2.4)αλληλεπιδρά με το p53 κατασταλτικό γονίδιο, με αποτέλεσμα την εξασθένιση της καταστολής του πολλαπλασιασμού του κυττάρου.[22,23] Τέλος, είναι πιθανό η χρόνια ηπατίτιδα Β να προκαλεί έμμεσα την ανάπτυξη καρκίνου μέσω της ηπατικής βλάβης που προκαλεί. Η ηπατική βλάβη αναγκάζει τα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται συνεχώς, με συνέπεια την αυξημένη αντιγραφή του DNA των κυττάρων, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση μεταλλάξεων που τελικά να οδηγούν στην ανάπτυξη καρκίνου.[20,29]

Η θεραπεία των ασθενών με ηπατίτιδα Β γίνεται με τη χορήγηση ιντερφερόνης α, η οποία ελαττώνει το βαθμό αντιγραφής του ιού και με τη χορήγηση λαμβουδίνης, η οποία εμποδίζει το πολλαπλασιασμό του ιού. Όμως, μετά από παρατεταμένη χρήση της λαμβουδίνης ο ιός αναπτύσσει ανοχή στο φάρμακο μέσω νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων του γονιδίου της πολυμεράσης. Μια πιθανή μελλοντική θεραπεία της ηπατίτιδας Β μπορεί να αποτελέσει η χορήγηση ανταγωνιστών των υποδοχέων των ρετινοϊκών οξέων. Πειραματικές μελέτες υποδεικνύουν τη συσχέτιση του RXRa και του ρετινοϊκού οξέος με τη μολυσματική δράση του ιού της ηπατίτιδας Β. Ένα τμήμα του ενισχυτή En I (εικ.2.2.4), που αφορά τη ρύθμιση της δράσης του ενισχυτή, βρέθηκε να έχει ομολογία με την αλληλουχία της περιοχής σύνδεσης με το DNA των υποδοχέων των στεροϊδών ορμονών και σε *in vivo* πειράματα διαπιστώθηκε ότι το σύμπλοκο ρετινοϊκό οξύ-RXRa συνδέεται με το τμήμα αυτό του ενισχυτή και επάγει την έκφραση των ιικών γονιδίων και τον πολλαπλασιασμό του ιού. Αυτά τα πειράματα στρέφουν τον επιστημονικό κόσμο στην παραγωγή και στη χρήση ανταγωνιστών του υποδοχέα RXRa του ρετινοϊκού οξέος, ως πιθανή θεραπεία για τη καταπολέμηση της ηπατίτιδας Β.[24,25]

Μέχρι σήμερα οι δυνατότητες καταπολέμησης του ηπατοκυτταρικού όγκου είναι περιορισμένες, όμως πειραματικές μελέτες δίνουν την ελπίδα της καλύτερης αντιπετώπισής του για το μέλλον. Πολλές από αυτές υποδεικνύουν τη χρήση των ρετινοειδών ως πιθανοί παράγοντες καταπολέμησης του καρκίνου καθώς έχουν δοκιμαστεί με επιτυχία σε *in vivo* πειράματα απόπτωσης καρκινικών ηπατοκυττάρων.[1,28] Επιπλέον, έχει προταθεί η χρήση συνθετικών ρετινοειδών, όπως το ακυκλικό ρετινοειδές το οποίο σε συνδιαστική χρήση με τις α-, β-ιντερφερόνες επάγει την απόπτωση των καρκινικών ηπατοκυττάρων και η χρήση αντικαρκινικών παραγόντων σε συνδιασμό με ρετινοϊκά οξέα.[27,28]

Με σκοπό την προφύλαξη του πληθυσμού από τον ιό της ηπατίτιδας Β χρησιμοποιείται εμβόλιο, που περιέχει το HBsAg αντιγόνο. Το εμβόλιο χορηγείται ενδομυϊκώς σε τρεις δόσεις και παρέχει καλή προστασία.

II.2.d. Ηπατίτιδα C



Εικ. 2.2.7: Απεικόνιση του ιού της ηπατίτιδας C. Τα ιικά σωματίδια είναι σφαιρικά με διάμετρο 50nm.

(http://rds.yahoo.com/S=96062883/K=hepatitis+C/v=2/SID=e/1=IVR/SIG=12aamdrsn/*http%3A//www.oecz.at/zeitung/3aktuel/2003/21/info/info21_2003angr.html)

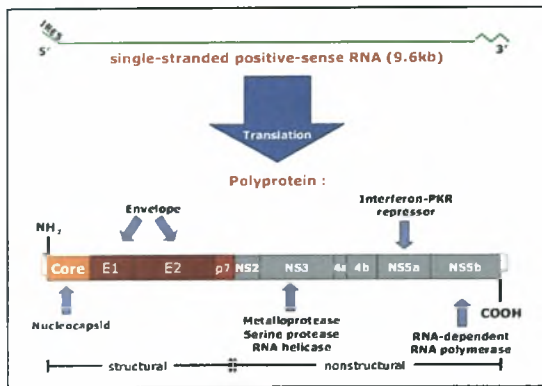
Ο ιός της ηπατίτιδας C ανήκει στην οικογένεια των Φλαβιϊών και αποτελείται από ένα μονόκλωνο, θετικής πολικότητας RNA και από νουκλεοκαψίδιο, το οποίο περιβάλλεται από φάκελο, που προέρχεται από τη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή. Τα ιικά σωματίδια έχουν πυκνότητα (CsCl) 1,24-1,32 gr/cm³ και συντελεστή καθίζησης περίπου 200 S και εμφανίζουν ευαισθησία σε λιποδιαλυτές ουσίες και στη UV ακτινοβολία και αντοχή στη θερμότητα (50⁰ C).

Ο ιός της ηπατίτιδας C χαρακτηρίζεται από γενετική ετερογένεια, εξαιτίας της δράσης της RNA πολυμεράρας, η οποία δεν μπορεί να αναγνωρίσει και έτσι να διορθώσει τα νουκλεοτίδια που τοποθετεί λανθασμένα κατά την αντιγραφή του RNA, με αποτέλεσμα την παραγωγή ιών με νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις, οι οποίες μπορεί να προσδίδουν και νέα βιολογικά χαρακτηριστικά στους ιούς. Παρόλο, των συχνών μεταλλάξεων

που προκαλεί η RNA πολυμεράση του ιού, οι 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές του γενετικού υλικού είναι υψηλά συντηρημένες, λόγω της σημασίας που έχουν στην αντιγραφή, στη μεταγραφή και στη σταθερότητα του ιικού RNA. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί έξι γενότυποι και παραπάνω από ογδόντα υπότυποι του ιού της ηπατίτιδας C. Οι γενότυποι 1 και 2 είναι ευρέως διαδεδομένη ανά το κόσμο, ο γενότυπος 3 είναι περισσότερο κοινός στην Ινδία, στο Πακιστάν, στην Αυστραλία και στη Σκωτία, ο γενότυπος 4 βρίσκεται κυρίως στη Μέση Ανατολή και στην Αφρική, ο γενότυπος 5 βρίσκεται στη νότια Αφρική και ο γενότυπος 6 στο Χονγκ Κονγκ και στο Μακάο. Οι γενότυποι 4 και 6 απέχουν αρκετά φυλογενετικά από τους 1 και 2 γενότυπους και πιστεύεται ότι εξελίχθηκαν τα τελευταία 500 με 2000 χρόνια, ενώ οι 1 και 2 γενότυποι πιστεύεται ότι εξελίχθηκαν πιο πρόσφατα, τα τελευταία 50 με 300 χρόνια, και ότι εξαπλώθηκαν ανά τον κόσμο λόγω των μεταναστεύσεων.[20,32,33]

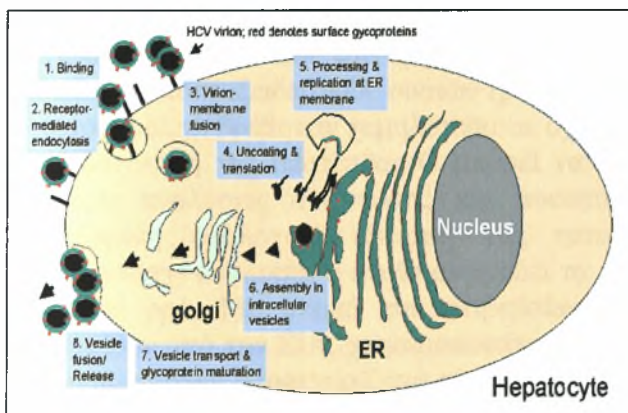
Ο ιός της ηπατίτιδας C μεταδίδεται κυρίως παρεντερικώς μέσω του αίματος, π.χ. με τη χρήση μολυσμένης βελόνας, από τη μετάγγιση με μολυσμένο αίμα, μέσω της μεταμόσχευσης από μολυσμένο δότη. Η μετάδοση του ιού μπορεί επίσης να γίνει από τη μολυσμένη μητέρα στο νεογνό και μέσω της σεξουαλικής επαφής.

Η μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας C έχει χρόνο επώασης 6-12 εβδομάδες και μπορεί να εκδηλωθεί με διάφορους τρόπους. Η εκδήλωση της μόλυνσης και η πορεία της ηπατίτιδας επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η ικανότητα πολλαπλασιασμού, ο γενότυπος και η ανοσογονική ικανότητα του ιού, η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, η ηλικία μόλυνσης του ατόμου (η πορεία της ασθένειας σε άτομα που μολύνθηκαν μετά την ηλικία των 50-55 ετών εμφανίζει μεγαλύτερο ρυθμό εξέλιξης σε σχέση με μικρότερες ηλικίες μόλυνσης).[25] Επιπλέον, η πορεία της ηπατίτιδας C επηρεάζεται και από το αλκοόλ, η κατανάλωση του οποίου επιταχύνει την ηπατική βλάβη σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C.[24,25,26] Τέλος, η ταυτόχρονη μόλυνση των ατόμων από τον ιό της ηπατίτιδας B και C επάγει με μεγαλύτερη πιθανότητα την εκδήλωση οξείας ηπατοπάθειας και την εμφάνιση ηπατοκυτταρικού καρκίνου, σε σχέση με τη μεμονωμένη μόλυνση από έναν από τους δύο ιούς. [38,39]



Εικ.2.2.8.: Το γενετικό υλικό του ιού της ηπατίτιδας C και οι ικές πρωτεΐνες. Ο ιός της ηπατίτιδας C, έχει μονόκλωνο, θετικής πολικότητας RNA (9,6 kb). Το ικό RNA αποτελείται από τα 5' και 3' αμετάφραστα άκρα και από ένα μεγάλο πλαίσιο ανάγνωσης (περίπου 9,033-9,099 νουκλεοτιδίων), το οποίο κωδικοποιείται σε μια πολυπρωτεΐνη (που περιέχει περίπου 3000 αμινοξέα). Το 5' αμετάφραστο άκρο είναι υψηλά συντηρημένο, αποτελείται από 341-344 νουκλεοτίδια και περιέχει τέσσερις δομές φουρκέτας. Στο 5' αμετάφραστο άκρο υπάρχει περιοχή που μοιάζει με τις περιοχές IRES (internal ribosome entry site), με τις οποίες συνδέεται το ριβόσωμα και οι πρωτεΐνες του ξενιστή για την έναρξη της μεταγραφής. Ακόμα, στην 5' αμετάφραστη περιοχή βρίσκεται το κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής AUG. Το 3' αμετάφραστο άκρο ποικίλει στο μέγεθος του και περιέχει μια poly-U ουρά και μια αλληλουχία 98 νουκλεοτιδίων υψηλά συντηρημένη. Πιστεύεται ότι η συντηρημένη αυτή περιοχή του 3' αμετάφραστου άκρου είναι σημαντική για τη σταθερότητα, για τη σύνθεση και για το πακετάρισμα του ιικού RNA. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης μεταγράφεται σε μια πολυπρωτεΐνη, από την οποία έπειτα παράγονται οι δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. Οι ικές δομικές πρωτεΐνες είναι η C, που είναι πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου, η E1 και E2, που είναι πρωτεΐνες του φακέλου. Οι μη δομικές είναι η p7, που είναι άγνωστη η λειτουργία της, η NS2, η NS3, η NS4a, η NS4b, η NS5a και η NS5b. Η NS2 δρα ως μεταλλοεξαρτώμενη πρωτεΐνάση που αυτοκαταλύει τη κοπή της για την παραγωγή της NS2 και της NS3 πρωτεΐνης. Η NS3 δρα ως μεταλλοπρωτεάση, πρωτεάση σερίνης και RNA ελκίαση. Η NS4a λειτουργεί ως συμπαραγοντας της NS3, στη δράση της ως πρωτεάση. Η λειτουργία της NS4b είναι άγνωστη. Η NS5a έχει πιθανό ρόλο στην ευαισθησία του ιού στην ιντερφερόνη και η NS5 λειτουργεί ως RNA πολυμεράση εξαρτώμενη από RNA.

(http://rds.yahoo.com/S=96062883/K=genomic+structure+of+HCV/v=2/SID=e/l=IVR/SIG=129fcqr6p/*-http%3A/www.dkfz-heidelberg.de/atv/f040/english/mott/research/hcv.htm)



Εικ. 2.2.9: Απεικόνιση του πολλαπλασιασμού του ιού της ηπατίτιδας C. Τα ικά σωματίδια αλληλεπιδρούν με ένα κυτταρικό υποδοχέα και εισέρχονται στο εσωτερικό των ηπατοκυττάρων με ενδοκύτωση. Ο υποδοχέας με τον οποίο αλληλεπιδρούν δεν έχει ακόμα αναγνωρισθεί, όμως έχει προταθεί ως πιθανός υποδοχέας, ο υποδοχέας των LDL, γιατί έχει βρεθεί ότι τα ικά σωματίδια αλληλεπιδρούν με τις LDL λιποπρωτεΐνες. [31] Στο κυτταρόπλασμα ο ιός απελευθερώνει το γενετικό του υλικό και το ριβόσωμα και οι πρωτεΐνες του

ξενιστή συνδέονται με τη περιοχή IRES της 5' αμετάφραστης περιοχής για την έναρξη της μεταγραφής του ιικού γενώματος. Η πολυπρωτεΐνη διέρχεται στο εσωτερικό του ενδοπλασματικού δικτύου. Οι δομικές πρωτεΐνες επεξεργάζονται στο Ε.Δ. από πεπτιδάσες του ξενιστή και η πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου απελευθερώνεται και συναρμολογείται με το ιικό RNA, ενώ οι πρωτεΐνες του φακέλου επεξεργάζονται περαιτέρω στο Golgi, όπου γλυκοσυλιώνονται και έπειτα απελευθερώνονται για να συναρμολογηθούν προς το σχηματισμό φακέλου. Οι μη δομικές πρωτεΐνες προκύπτουν από την υδρόλυση της πολυπρωτεΐνης (η οποία καταλύεται από τις ικές μεταλλοπρωτεϊνάσες και την πρωτεάση σερίνης) και εκτελούν την αντιγραφεί του ιικού RNA. Η αντιγραφή του RNA ξεκινά από την 3' UTR περιοχή, η NS5B συνθέτει το αρνητικής πολικότητας RNA και η ική ελκίαση μετά την αντιγραφή διαχωρίζει τους συμπληρωματικούς κλώνους. Το RNA αρνητικής πολικότητας χρησιμοποιείται για τη σύνθεση ικών RNA. Τα ικά RNA συναρμολογούνται με τις πρωτεΐνες του καψιδίου και σχηματίζονται τα νουκλεοκαψιδία, τα οποία περιβάλλονται έπειτα με τις πρωτεΐνες του φακέλου και οι νέοι ιοί απελευθερώνονται με εκβλάστηση από το κύτταρο του ξενιστή.

(<http://www3.utsouthwestern.edu/microbiology/pages/faculty/gale-HCVmodel.html>)

Η οξεία ηπατίτιδα C συνήθως είναι ασυμπτωματική και χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα των τρανσαμινασών στον ορό για διάστημα περίπου 2-26 εβδομάδων και το 25% περίπου των ασθενών αναπτύσσουν ίκτερο. Η χρόνια ηπατίτιδα C αναπτύσσεται μετά από την οξεία μόλυνση σε ποσοστό περίπου 60% των ασθενών, από τους οποίους το 20% αναπτύσσει κίρρωση του ήπατος μετά από ένα διάστημα περίπου δέκα ετών. Η χρόνια ηπατίτιδα C αναγνωρίζεται ως μια σημαντική αιτία του πρωτογενούς καρκίνου του ήπατος, που εκδηλώνεται μετά από μία μακρά περίοδο (περίπου είκοσι χρόνων) μόλυνσης από τον ιό.

Ο μηχανισμός με τον οποίο ο ιός της ηπατίτιδας C μπορεί να επάγει ηπατοπάθεια παραμένει άγνωστος, ωστόσο υπάρχουν αρκετές ενδείξεις που προτείνουν την έμμεση ή την άμεση συμμετοχή των πρωτεϊνών του ιού και κυρίως της πρωτεΐνης του νουκλεοκαψιδίου στην ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου. [27,39] Η βλάβη του ήπατος, μετά από μόλυνση από τον ιό, πιστεύεται ότι μπορεί να προκαλείται και από την κυτταροπαθογόνο δράση του ιού, η οποία όμως δεν μπορεί ακόμα να επιβεβαιωθεί εξαιτίας του μη ικανού πολλαπλασιασμού του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες, που δυσκολεύει αρκετά τη μελέτη του.[36,37] Επιπλέον, προτείνεται ότι σε περιπτώσεις χρόνιας ηπατίτιδας C η βλάβη των ηπατικών κυττάρων μπορεί να οφείλεται σε αυξημένο οξειδωτικό στρες. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται σε αποτελέσματα ανάλυσης του ορού ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C, των οποίων τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ουσιών (ρετινόλη, β-κρυπτοξανθίνη, α-β-καροτένια, α-, γ-τοκοφερόλη,) βρέθηκαν χαμηλότερα σε σχέση με αυτά υγιών ατόμων.[44,46]

Η διάγνωση της ηπατίτιδας C μπορεί να γίνει με ορολογικές εξετάσεις και με μοριακές αναλύσεις ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του ιικού RNA. Η πιο διαδεδομένη ορολογική εξέταση της ηπατίτιδας C είναι η EIA (enzyme immunoassay) ανάλυση, η οποία ανιχνεύει τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του ιού στον ορό. Με σκοπό την επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων, που προκύπτουν από την EIA, χρησιμοποιείται η RIBA (recombinant immunoblot assay) ανάλυση, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικευση, καθώς στηρίζεται στη χρήση συνθετικών και ανασυνδυασμένων πεπτιδίων αντιστοιχών του κάθε αντιγόνου που χρησιμοποιήθηκε στην EIA ανάλυση. Οι μοριακές αναλύσεις του ιικού RNA είναι πολύ πιο ευαίσθητες από τις ορολογικές εξετάσεις ανίχνευσης των αντισωμάτων και συνήθως οι αναλύσεις που χρησιμοποιούνται είναι η RT-PCR, η οποία χρησιμοποιείται τόσο για την ανίχνευση του ιού όσο και για την ποσοτικοποίησή του, η bDNA (branched DNA) ανάλυση, που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση του ιικού RNA [19] και η TMA (transcription mediation amplification) ανάλυση, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία (έχει ικανότητα ανίχνευσης 2-5 αντιγράφων του ιού /ml).[20,34]

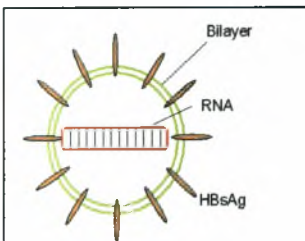
Μέχρι σήμερα, η θεραπεία της ηπατίτιδας C γίνεται με τη χορήγηση φαρμάκων με αντιική δράση, με σκοπό την παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού του ιού και τη μείωση του ρυθμού εξέλιξης της ασθένειας. Τέτοια φάρμακα είναι η ιντερφερόνη, η χορήγηση της οποίας παρουσιάζει οφέλη σε ασθενείς με οξεία και χρόνια ηπατίτιδα C. η ανταπόκριση όμως του ιού σχετίζεται με τον γενότυπό του, π.χ. ασθενείς

Εικ.2.2.10: Γεωγραφική κατανομή της χρόνιας ηπατίτιδας C.
(http://rds.yahoo.com/S=96062883/K=hepatitis+C/v=2/SID=e/l=IVR/SIG=11n8jilso/*-http%3A//www.virahep.com/information/information.htm)



μολυσμένη από ιό με υπότυπο Ib ανταποκρίνονται λιγότερο στη χορήγηση ιντερφερόνης. Ακόμα, χρησιμοποιείται και η ριμπαβιρίνη, που αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό του ιού και η συνδυαστική χορήγησή της με ιντερφερόνη έχει δείξει να είναι αρκετά αποτελεσματική. Τέλος, η γενετική ετερογένεια του ιού της ηπατίτιδας C δεν επιτρέπει μέχρι τώρα την παραγωγή αποτελεσματικού εμβολίου για την προστασία των πληθυσμών.

II.2.e. Ηπατίτιδα D



Εικ.2.2.11: Απεικόνιση του ιού της ηπατίτιδας D. (<http://www.med.sc.edu:85/virol/hepatitis-virus.htm>)

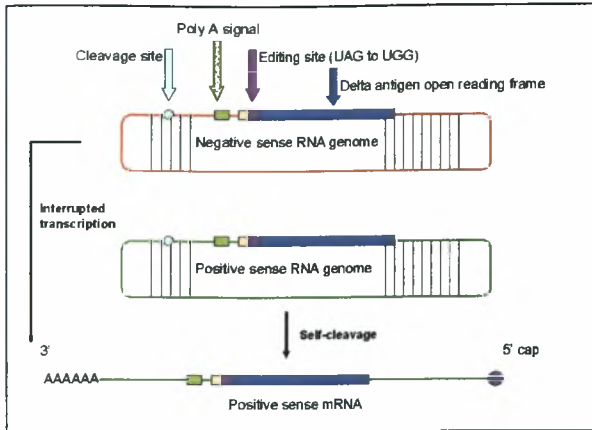
Ο ιός της ηπατίτιδας D ανήκει στην οικογένεια των Δελταϊών και αποτελείται από ένα μονόκλωνο, κυκλικό, αρνητικής πολικότητας RNA (1,7kb) και από τα δύο αντιγόνα του, τα οποία περιβάλλονται από το HBsAg αντιγόνο του ιού της ηπατίτιδας B. Τα ιικά σωματίδια έχουν διάμετρο περίπου 35-37 nm και πυκνότητα επίπλευσης σε CsCl 1,25 gr/cm³. Το 70% των νουκλεοτιδικών βάσεων του RNA είναι συμπληρωματικές, με αποτέλεσμα το RNA να οργανώνεται σε ραβδοειδής διαμόρφωση (εικ.2.2.11). Το γενετικό υλικό του ιού έχει ένα πλαίσιο ανάγνωσης, που κωδικοποιεί μια μόνο πρωτεΐνη, το αντιγόνο του ιού. Υπάρχουν δύο ισομορφές του ιικού αντιγόνου, το μικρό δέλτα αντιγόνο (SHDAg)

και το μεγάλο δέλτα αντιγόνο (LHDAg), που έχει επιπλέον 19 αμινοξέα στο καρβοξυτελικό του άκρο σε σχέση με το μικρό (εικ.2.2.12). Το μικρό δέλτα αντιγόνο (SHDAg) είναι απαραίτητο για την αντιγραφή του γενετικού υλικού και το μεγάλο δέλτα αντιγόνο (LHDAg) εμπλέκεται στη συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων μέσω της αλληλεπίδρασης του με το HbsAg, εμποδίζει την αντιγραφή του RNA και εμπλέκεται στη μολυσματικότητα του ιού.

Ο ιός της ηπατίτιδας D διακρίνεται σε τρεις κύριους γενότυπους με διαφορετική γεωγραφική κατανομή. Ο γενότυπος I του ιού επικρατεί στις Η.Π.Α και στην Ευρώπη, ο γενότυπος II έχει αναγνωριστεί στη Μέση Ανατολή και ο γενότυπος III έχει βρεθεί σε χώρες της νότιας και βόρειας Αμερικής. Ένα τμήμα του γενετικού υλικού των διαφορετικών γενότυπων του ιού που είναι καλά συντηρημένο είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί τα αντιγόνα του ιού. [1]

Ο ιός της ηπατίτιδας D αποτελεί έναν ασυνήθη νοσογόνο παράγοντα, διότι για την αναπαραγωγή του έχει ανάγκη τη συλλοίμωξη των ηπατικών κυττάρων με τον ιό της ηπατίτιδας B. Ο ιός της ηπατίτιδας D είναι ένας ελλειμματικός ή ατελής ιός, που εξαρτάται για την αναπαραγωγή και την επιβίωση του από τον ιό της ηπατίτιδας B, που δρα ως βοηθός ιός. Ειδικότερα, ο ιός της ηπατίτιδας D εξαρτάται από την σύνθεση του αντιγόνου HbsAg για την αλληλεπίδρασή του με το μεμβρανικό υποδοχέα των κυττάρων, για τον πολλαπλασιασμό του και για την ικανότητά του να προκαλέσει λοίμωξη.

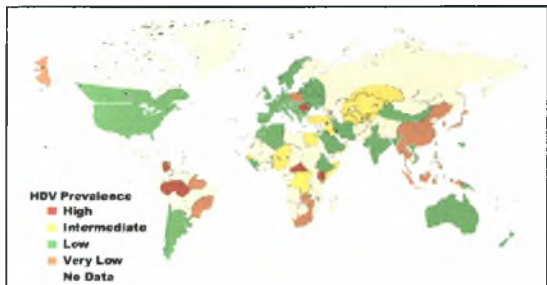
Η κλινική εκδήλωση της μόλυνσης από τον ιό της ηπατίτιδας D ποικίλει από ασυμπτωματική μέχρι την ανάπτυξη σοβαρής ηπατοπάθειας και επηρεάζεται από το βαθμό έκφρασης των ιών της ηπατίτιδας D και B και από την αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Η αλληλεπίδραση των ιών είναι αρκετά πολύπλοκη και η έκφραση του ιού της ηπατίτιδας D ποικίλει από ανεπιτυχής μέχρι αρκετά μολυσματική. Γενικά, σε περιπτώσεις συλλοίμωξης τα κλινικά συμπτώματα τείνουν να είναι πολύ πιο σοβαρά σε σχέση με αυτά της οξείας ηπατίτιδας B και είναι περισσότερο πιθανό να αναπτυχθεί ηπατική ανεπάρκεια. Οι ασθενείς των περιπτώσεων αυτών εμφανίζουν ανιχνεύσιμα IgM αντισώματα στον ορό για διάστημα περίπου 2-6 εβδομάδων και



Εικ.2.2.12: Ο πολλαπλασιασμός του ιού της ηπατίτιδας D. Ο ιός της ηπατίτιδας D αλληλεπιδρά με υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή μέσω του HbsAg και εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Το γενετικό υλικό του ιού μετατοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου η RNA πολυμεράση II του ξενιστή καταλύει την αντιγραφή του ιικού RNA. Το αρνητικής πολικότητας RNA αντιγράφεται σε θετικής πολικότητας RNA, που είναι επίσης κυκλικό. Το ιικό RNA μπορεί επίσης να μεταγραφεί σε γραμμικό RNA με καλύπτρα στο 5' άκρο και με polyA ουρά, που είναι μικρότερο από το γενωμικό RNA και περιέχει το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, που μεταφράζε-

ται σε αντιγόνο. Το RNA αυτό μπορεί να παραχθεί και μέσω της αυτοκαταλυτικής διαδικασίας κοπής του RNA θετικής πολικότητας. Το αντιγόνο του ιού παράγεται από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Το μεγάλο αντιγόνο παράγεται με έναν ιδιαίτερο μηχανισμό, σύμφωνα με τον οποίο το κωδικόνιο λήξης UAG μετατρέπεται σε UGG από ένζυμο του ξενιστή, με αποτέλεσμα την συνέχιση της μετάφρασης και την παραγωγή του μεγάλου αντιγόνου. Μετά την παραγωγή του μικρού και μεγάλου αντιγόνου του ιού και του ιικού RNA, αυτά συναρμολογούνται σε ριβονουκλεοπρωτεΐνη και στο κυτταρόπλασμα το LHDAg αλληλεπιδρά με το HbsAg. (<http://www.med.sc.edu:85/virol/hepatitis-virus.htm>)

ορισμένες φορές αυξημένα επίπεδα τρανσαμινασών. Η επιλοίμωξη των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα B συνήθως συνοδεύεται με καταστολή της αντιγραφής του ιού της ηπατίτιδας B και οι ασθενείς αυτοί έχουν ανιχνεύσιμα IgM και IgG αντισώματα έναντι του ιού και αυξημένα επίπεδα τρανσαμινασών. Το 15% των ασθενών με ηπατίτιδα D και B εμφανίζουν μικρό βαθμό εξέλιξης της ηπατοπάθειας. Η μειονότητα των ασθενών με ηπατίτιδα D και B αναπτύσσουν ηπατική ανεπάρκεια, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών αναπτύσσουν κίρρωση σε διάστημα λίγων χρόνων. Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν μεγάλο κίνδυνο ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου σε διάστημα περίπου δώδεκα χρόνων. [20,21]

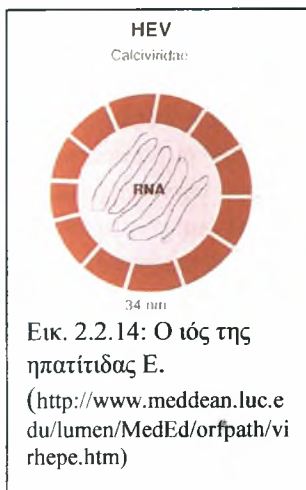


Εικ.2.2.13: Γεωγραφική κατανομή του ιού της ηπατίτιδας D. Με κόκκινο χρωματίζονται οι περιοχές με υψηλό ποσοστό σε ηπατίτιδα D, με κίτρινο οι περιοχές με μέση επικράτηση του ιού, με πράσινο οι περιοχές με χαμηλό ποσοστό σε ηπατίτιδα D, με πορτοκαλί οι περιοχές με πολύ μικρό ποσοστό σε ηπατίτιδα D και με άσπρο χρωματίζονται οι περιοχές για τις οποίες δεν υπάρχουν στοιχεία.
http://rds.yahoo.com/S=96062883/K=hepatitis+D/v=2/SIE=e/l=1VR/SIG=11npsfdiv/*-http%3A/www.bbraunusa.com/hepatitis/hepatitis5.html

Ο τρόπος μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας D είναι ίδιος με αυτόν του ιού της ηπατίτιδας B. Η διάγνωση της μόλυνσης από τον ιό της ηπατίτιδας D γίνεται μέσω ανίχνευσης του RNA του ιού με τη χρήση της PCR ή με την ανίχνευση του ADAg στο ήπαρ. Μέχρι σήμερα η μόνη αποδεδειγμένη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας D είναι η χορήγηση της α-ιντερφερόνης, με την οποία το 15-20% των μη κίρρωτικών ασθενών θεραπεύεται. Επίσης, αρκετά αποτελεσματική είναι και η μεταμόσχευση ήπατος, η οποία αυξάνει κατά πολύ περισσότερο το χρόνο ζωής των ασθενών σε σχέση με τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση ήπατος. Τέλος, το εμβόλιο της ηπατίτιδας B παρέχει προστασία στον πληθυσμό από τον ιό της ηπατίτιδας D.

της χρόνιας ηπατίτιδας D είναι η χορήγηση της α-ιντερφερόνης, με την οποία το 15-20% των μη κίρρωτικών ασθενών θεραπεύεται. Επίσης, αρκετά αποτελεσματική είναι και η μεταμόσχευση ήπατος, η οποία αυξάνει κατά πολύ περισσότερο το χρόνο ζωής των ασθενών σε σχέση με τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση ήπατος. Τέλος, το εμβόλιο της ηπατίτιδας B παρέχει προστασία στον πληθυσμό από τον ιό της ηπατίτιδας D.

II.2.f. Ηπατίτιδα Ε



Ο ιός της ηπατίτιδας Ε κατατάσσεται στην οικογένεια των Caliciviridae, παρόλο που η μοριακή δομή του γονιδίου της πολυμεράσης του ιού μοιάζει με αυτό των ιών rubella και furoviruses. Ο ιός της ηπατίτιδας Ε είναι RNA ιός, δεν περιβάλλεται από φάκελο και έχει εικοσαεδρική συμμετρία με διάμετρο 32-34 nm. Το RNA του ιού (7,5 kb) είναι μονόκλωνο, γραμμικό, θετικής πολικότητας και αποτελείται από τρία ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, που πλαισιώνονται από την 5' και 3' αμετάφραστη περιοχή (μήκους 27 και 65 νουκλεοτιδίων αντίστοιχα) και περιέχει καλύπτρα (5') και polyA ουρά (3'). Σύμφωνα με αναλύσεις της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γενετικού υλικού του ιού, το πρώτο πλαίσιο ανάγνωσης κωδικοποιεί τις μη λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού (μεθυλοτρανσφεράση, πρω-

τεάση, ελικάση, RNA πολυμεράση εξαρτώμενη από RNA), το δεύτερο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του καψιδίου και το τρίτο κωδικοποιεί πρωτεΐνες, των οποίων η λειτουργία είναι άγνωστη. Ο τρόπος πολλαπλασιασμού του ιού της ηπατίτιδας Ε δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμα, εξαιτίας του μη αποτελεσματικού πολλαπλασιασμού του ιού σε κυτταρικές καλλιέργειες. Ωστόσο, έχει προταθεί ένα μοντέλο πολλαπλασιασμού του ιού που βασίζεται στην ομολογία των περιοχών του γενετικού υλικού του ιού με άλλους RNA ιούς. [45] Τα ιικά σωματίδια έχουν συντελεστή καθίζησης 183 S και πυκνότητα επίπλευσης (CsCl) 1,30 και 1,35 gr/cm³ και είναι πολύ ευπαθή στη κυκλική κατάψυξη-θέρμανση και καταστρέφονται στους 4-8⁰ C μετά από 3-5 ημέρες.

Ο ιός της ηπατίτιδας Ε μεταδίδεται κυρίως μέσω της οδού κοπράνων-στόματος και πρόσφατες μελέτες προτείνουν και την μετάδοση του ιού από την μολυσμένη μητέρα στο νεογνό, ενώ πιστεύεται ότι ο ιός δεν μεταδίδεται παρεντερικά μέσω του αίματος ή με τη σεξουαλική επαφή. [20]

Ο χρόνος επώασης του ιού της ηπατίτιδας Ε μπορεί να διαρκέσει 2-9 εβδομάδες και η κλινική εκδήλωση της μόλυνσης από τον ιό ποικίλει. Το πιο κοινό χαρακτηριστικό της κλινικής εκδήλωσης, μετά από μόλυνση από τον ιό, είναι η ανάπτυξη οξείας ικτερικής ηπατίτιδας. Ένα μικρό ποσοστό των ασθενών αυτών μπορεί να αναπτύξουν και οξεία ηπατική ανεπάρκεια, η οποία μπορεί να καταλήξει ακόμα και στο θάνατο. Κατά τη διάρκεια της οξείας ηπατίτιδας Ε στον ορό των ασθενών ανιχνεύονται η τρανσαμινάση της αλανίνης σε υψηλά επίπεδα και τα αντισώματα IgM και IgG έναντι του ιού. Το IgM εμφανίζεται από τις πρώτες εβδομάδες της κλινικής εκδήλωσης της ασθένειας και η παρουσία του στον ορό διαρκεί 4-5 μήνες, ενώ το IgG είναι ανιχνεύσιμο για μερικά χρόνια. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, τα άτομα ηλικίας 15-40 ετών μολύνονται με μεγαλύτερη συχνότητα και σε περιπτώσεις εγκύων η μόλυνση από τον ιό μπορεί να προκαλέσει το θάνατο σε ποσοστό 15-25%. Ο ιός της ηπατίτιδας Ε δεν σχετίζεται με την ανάπτυξη χρόνιας ηπατίτιδας, κίρρωσης και ηπατοκυτταρικού καρκίνου.

Η μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας Ε είναι ενδημική στην νοτιοανατολική και κεντρική Ασία και έχουν σημειωθεί επιδημίες της ηπατίτιδας στη Μέση Ανατολή, στη βόρεια και δυτική Αφρική και στο Μεξικό. Συνήθως, επιδημία της ηπατίτιδας Ε εμφανίζεται μετά από έντονες βροχοπτώσεις και πλημμύρες, που ευνοούν τη μόλυνση των υδάτων και έτσι τη μετάδοση του ιού. Η συχνότητα εμφάνισης της ηπατίτιδας σε άλλες περιοχές του κόσμου είναι πολύ μικρή και οφείλεται κυρίως στη μόλυνση ατόμων μετά από ταξίδι στις ενδημικές χώρες. [20]

Η διάγνωση της ηπατίτιδας Ε βασίζεται στην ανίχνευση του ιού ή των συστατικών του (γενετικό υλικό και ιικά αντιγόνα) ή στην ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι του ιού. Περισσότερο διαδεδομένα είναι τα τεστ ανίχνευσης των αντισωμάτων έναντι του ιού. Οι πιο κοινές μέθοδοι ανίχνευσης των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται είναι η IEM (Immune electron microscopy), η οποία βασίζεται στην ικανότητα των αντισωμάτων να αλληλεπιδρούν με τα φυσικά αντιγόνα στην επιφάνεια των ιικών σωματιδίων, η FA (Fluorescent-antibody blocking assay), η οποία βασίζεται στην ικανότητα των αντισωμάτων να εμποδίζουν τη σύνδεση ενός φθορίζοντος αντισώματος με τα φυσικά αντιγόνα του ιού, η Western blot ανάλυση, στην οποία χρησιμοποιούνται ανασυνδυασμένες ή συνθετικές πρωτεΐνες, αντίστοιχες των αντιγόνων του ιού για την ανίχνευση των αντισωμάτων και η EIA ανάλυση.[20]

Με σκοπό την προστασία των πληθυσμών από την μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας Ε, απαιτείται η λήψη απαραίτητων μέτρων υγιεινής και ύδρευσης και ιδιαίτερα επιβάλλεται η αποφυγή κοπρανώδους ρύπανσης του νερού και επαρκής χλωρίωση. Μέχρι σήμερα δεν είναι διαθέσιμος κάποιος τρόπος θεραπείας της ηπατίτιδας Ε, ούτε υπάρχει εμβόλιο για την προστασία των πληθυσμών, πειραματικές μελέτες όμως υποδεικνύουν την παραγωγή εμβολίου με ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, αντίστοιχες των πρωτεϊνών της επιφάνειας των ιικών σωματιδίων.[57,58] Το εμβόλιο αυτό θα μπορεί να εξασφαλίζει την παροδική προστασία των ατόμων και ενδείκνυται για την προστασία των εγκύων και των ατόμων που ταξιδεύουν στις ενδημικές χώρες.

II.2.g. Ηπατίτιδα G

Ο ιός της ηπατίτιδας G κατατάσσεται στην οικογένεια των Φλαβιών, περιβάλλεται από φάκελο και το γενετικό του υλικό είναι RNA θετικής πολικότητας μήκους 9392 νουκλεοτιδίων, που κωδικοποιείται σε μια πολυπρωτεΐνη 2873 αμινοξέων. Η οργάνωση του γενετικού υλικού του ιού είναι όμοια με αυτή του ιού της ηπατίτιδας C και το 25% της μοριακής δομής τους είναι παρόμοιο, ωστόσο χαρακτηρίζονται από διαφορετικές αντιγονικές ιδιότητες. Ελάχιστες πληροφορίες υπάρχουν για τον τρόπο πολλαπλασιασμού του ιού. Ο ιός εμφανίζει ευρεία γεωγραφική κατανομή και μετά από ανάλυση της 5'αμετάφραστης περιοχής του γενετικού υλικού απομονωμένων ιών από διάφορες περιοχές, διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν τρεις διαφορετικοί γενότυποι του ιού.[20]

Ο ιός της ηπατίτιδας G μεταδίδεται κυρίως παρεντερικά, μέσω μολυσμένου αίματος, σεξουαλικά και από τη μητέρα στο νεογνό. Η διάγνωση της μόλυνσης από τον ιό γίνεται με τη χρήση της RT-PCR για την ανίχνευση του ιικού RNA και μέσω της ανίχνευσης των αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών του φακέλου του ιού. Η παρουσία του ιικού RNA και των αντισωμάτων δεν είναι ταυτόχρονη στον ορό, αντίθετα η ανίχνευση αντισωμάτων σχετίζεται με την απώλεια του RNA στον ορό.[47,48,49,50]

Δεν είναι ακόμα σαφές το κατά πόσο ο ιός αυτός μπορεί να προκαλέσει ηπατοπάθεια, και αν ναι δεν είναι γνωστός ο τύπος της χρόνιας ή οξείας ηπατοπάθειας που μπορεί να προκαλεί. Έχουν διαγνωστεί περιπτώσεις οξείας μόλυνσης από τον ιό, οι οποίες συνήθως είναι ήπιες. Τα άτομα που μολύνθηκαν από τον ιό φαίνεται να είναι θετικά στην ανίχνευση του ιικού RNA για περίπου εννιά χρόνια. Ο ιός έχει ανιχνευθεί σε 20% περιπτώσεις ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα, μερικοί από τους οποίους ήταν μολυσμένοι και από τον ιό της ηπατίτιδας C. Ωστόσο, ο ιός της ηπατίτιδας G δεν έχει συσχετιστεί απόλυτα με την ανάπτυξη χρόνιας ηπατίτιδας. Πιστεύεται ότι ο ιός μπορεί να μολύνει άτομα που είναι ήδη μολυσμένα από τους Α, Β, C ιούς ή να μολύνει

τα άτομα ταυτόχρονα με κάποιο από τους ιούς αυτούς. Σε περιπτώσεις ασθενών, που εμφανίζουν χρόνια ηπατίτιδα, η μόλυνσή τους από τον ιό της ηπατίτιδας G δεν επηρεάζει τόσο την πορεία της ασθένειας όσο και την ανταπόκριση του ιού, που ευθύνεται για τη χρόνια ηπατίτιδα, στην αντική θεραπεία.[51,52,53,54,55]

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει συγκεκριμένος τρόπος θεραπείας των μολυσμένων ατόμων από τον ιό ούτε η δυνατότητα εμβολιασμού έναντι του ιού της ηπατίτιδας G.

II.3. Σκοπός της εργασίας

Η βιταμίνη A και οι συναφείς ενώσεις των ρετινοειδών φέρουν αντιοξειδωτική δράση και εμπλέκονται στη ρύθμιση μιας πληθώρας λειτουργιών του οργανισμού, όπως η όραση, η αναπαραγωγή, η ανάπτυξη των οστών και η κυτταρική διαφοροποίηση. Μέχρι σήμερα λίγες είναι οι πληροφορίες που είναι διαθέσιμες και που αφορούν στα επίπεδα των ενδογενών ρετινοειδών στον ορό και σε άλλους ιστούς στα θηλαστικά. Οι μελέτες, που αφορούν στον καθορισμό των επιπέδων ρετινοειδών, συνήθως εμφανίζουν το πρόβλημα της απουσίας ευαισθησίας της μεθόδου στον καθορισμό των επιπέδων των ενδογενών ρετινοϊκών οξέων σε βιολογικά δείγματα. Στην παρούσα πειραματική μελέτη αναπτύχθηκε αρχικά μια HPLC μέθοδος διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης της ρετινόλης, του 13-cis ρετινοϊκού οξέος, του 9-cis ρετινοϊκού οξέος και του all trans ρετινοϊκού οξέος σε δείγματα ορού, η οποία έπειτα χρησιμοποιήθηκε για το καθορισμό των επιπέδων των ρετινοειδών αυτών σε δείγματα ασθενών με ιογενή ηπατίτιδα και σε δείγματα ορού υγιών ατόμων-μαρτύρων. Η εργασία αυτή βρίσκεται σε εξέλιξη, με σκοπό την μελέτη της πιθανής διαφοροποίησης των επιπέδων των ρετινοειδών της βιταμίνης A σε βιολογικά δείγματα σε διάφορες περιπτώσεις ηπατοπάθειας (π.χ. ιογενείς ηπατίτιδες, κίρρωση, ηπατοκυτταρικού καρκίνου) και τη δυνατότητα ανάπτυξης μιας κλινικής μεθόδου παρακολούθησης των ηπατοπαθειών.

III. Πειραματικό μέρος

III.1. Χημικά και διαλύματα

Η παρασκευή των χημικών αναλώσιμων και η διαδικασία παρασκευής των διαλυμάτων παρουσιάζονται αναλυτικά στα Παραρτήματα 1 και 2.

III.2. Όργανα και συσκευές

Για την ανάλυση και την ποσοτικοποίηση δειγμάτων ορού, χρησιμοποιήθηκε η HPLC-υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Η HPLC επιτρέπει αποδοτικούς διαχωρισμούς και μετρήσεις σε λίγα λεπτά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό και την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων ουσιών ποικίλης προελεύσεως. Εκεί που αξιοποιείται η ισχύς της τεχνικής είναι στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, τα οποία περιέχουν τα φυσιολογικά συστατικά, τα χορηγούμενα φάρμακα, τους μεταβολίτες τους κ.ά., συνήθως σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

Στην παρούσα πειραματική μελέτη η εκτέλεση της υγρής χρωματογραφίας έγινε σε Hewlett-Packard σύστημα (HP1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) που αποτελείται από :

1) Το σύστημα παροχής και απαέρωσης διαλύτη. Στο σύστημα αυτό ο διαλύτης βρίσκεται αποθηκευμένος σε δοχείο και προωθείται προς τη στήλη με αντλία υψηλής πίεσης. Με σκοπό τη καθαρότητα του διαλύτη γίνεται η απαέρωσή του μέσω της διήθησής του από ειδικά φίλτρα υπό κενό. Σε αυτήν την πειραματική μελέτη η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση (ισοκρατική έκλουση) και είναι πολικότερη από τη στατική φάση (χρωματογραφία αντίστροφης φάσης).

2) Το σύστημα εισαγωγής δείγματος, που αποτελείται από περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσης με βρόχο δείγματος. Στη βαλβίδα αυτή βρίσκεται η θέση «φορτώσεως», όπου με τη βοήθεια μιας σύριγγας πληρώνεται ο βρόχος με το προς ανάλυση δείγμα. Μετά την πλήρωση του με το δείγμα, ο βρόχος στρέφεται ώστε η κινητή φάση να παρασύρει ποσοτικά τον όγκο του δείγματος και να το προωθήσει προς τη στήλη. Στο σύστημα αυτό χρησιμοποιείται η βαλβίδα Rheodyne, στην οποία γίνεται εισαγωγή δείγματος 100μl. Η ανάλυσή του δείγματος γίνεται με ταχύτητα ροής 1ml/min και με πίεση περίπου 120bar.

3) Τη στήλη. Στην παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε η στήλη Hypesil Betabasic C18 (Pore Size 150A, Part Size 5nm, Lot No P1L11, Serial No 0320816H, Part No 255-715, Dimension 250X4,6). Η στήλη Hypesil Betabasic C18 διαχωρίζει τα ρετινοειδή με χρωματογραφία προσροφήσεως. Στη χρωματογραφία προσροφήσεως, τα συστατικά του μείγματος προσροφούνται στην επιφάνεια ενός προσροφητικού υλικού της στατικής φάσης. Η κινητή φάση ανταγωνίζεται τα συστατικά στην κάλυψη των θέσεων προσρόφησης της στατικής φάσης. Η έκλουση των συστατικών του μείγματος από τη στήλη είναι αποτέλεσμα της εκτόπισής τους από το προσροφητικό υλικό της στατικής φάσης. Στο σύστημα αυτό πριν από τη στήλη παρεμβάλλεται μια προστήλη, η οποία προστατεύει τη κύρια στήλη από ακαθαρσίες που προσροφούνται μη αντιστρεπτά. Η προστήλη προστατεύει και τη στατική φάση της κύριας στήλης. Επειδή η κινητή φάση μπορεί να διαλύει μερικώς την υγρή στατική φάση της κύριας στήλης, με αποτέλεσμα τη βαθμιαία καταστροφή της, η προστήλη (που είναι πληρωμένη με το ίδιο υλικό πλήρωσης με τη κύρια στήλη) προκαλεί κορεσμό στη κινητή φάση με την υγρή στατική φάση, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο την υγρή στατική φάση της στήλης.

4) Τον ανιχνευτή. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των δειγμάτων είναι ο UV ανιχνευτής HP 1100 με ανίχνευση στα 350 nm και ο ηλεκτροχημικός ανιχνευτής ESA Coulochem με E1:800mV, E2: 0mV και R1=R2=100μA.

5) Λογισμικό HP Chemstation. Το λογισμικό HP Chemstation ελέγχει τη λειτουργία του συστήματος παροχής κινητής φάσης, αναλαμβάνει τη συλλογή, αποθήκευση και επεξεργασία των σημάτων των ανιχνευτών και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης.

Το ύδωρ (18.2 MΩ) που χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες δραστηριότητες στο εργαστήριο ανανεωνόταν συχνά και η παρασκευή του γινόταν στο εργαστήριο με τη συσκευή USF ELGA. Τέλος, για τη φυγοκέντρηση των δειγμάτων ορού χρησιμοποιήθηκε η συσκευή SV 1L RH Firlabo (4000 RPM).

III.3. Ανάπτυξη μεθόδου διαχωρισμού των ρετινοειδών με πρότυπα διαλύματα

Με σκοπό την ανάπτυξη της μεθόδου διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης της ρετινόλης, του 13-cis ρετινοϊκού οξέος, του 9-cis ρετινοϊκού οξέος και του all-trans ρετινοϊκού οξέος, αρχικά έγιναν δοκιμές ανάλυσης πρότυπων διαλυμάτων των ρετινοειδών, η παρασκευή των οποίων περιγράφεται στο Παράρτημα 2. Η χρήση και οι αναλύσεις των πρότυπων διαλυμάτων γινόταν με τις απαραίτητες προφυλάξεις, ώστε να αποφευχθεί η ισομερείωση και ο εκφυλισμός των ρετινοειδών. Κάθε δοκιμασία αφορούσε στη μελέτη της ικανότητας του εκάστοτε διαλύτη να παρέχει α) ένα ικανοποιητικό διαχωρισμό των παραπάνω ρετινοειδών και β) ένα ικανοποιητικό σήμα ανίχνευσης από τον ηλεκτροχημικό ανιχνευτή. Η δοκιμασία του κάθε διαλύτη περιλάμβανε την ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων των ρετινοειδών στα δυναμικά του ηλεκτροχημικού 200,400,600,700,800,900,100,1100 και 1200mV. Στο εύρος των δυναμικών που υπήρχε καλύτερο σήμα ανίχνευσης, γινόταν περαιτέρω ανάλυση των διαλυμάτων των ρετινοειδών σε δυναμικά αυξανόμενα ανά 50mV, π.χ. έστω ότι μεταξύ 700 με 900mV υπήρχε καλύτερο σήμα ανίχνευσης, τα ρετινοειδή αναλύονταν στα δυναμικά 750, 850, 900. Τέλος, τα αποτελέσματα ανίχνευσης από τον ηλεκτροχημικό και τον UV ανιχνευτή συγκρίνονταν μεταξύ τους, για να διαπιστωθεί αν ο προς δοκιμασία διαλύτης μπορεί να παρέχει μια μέθοδο διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης των ρετινοειδών και ικανοποιητικό σήμα ηλεκτροχημικής ανίχνευσης. Οι διαλύτες που δοκιμάστηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1).

Διαλύτης	H ₂ O	CH ₃ OH	CH ₃ CN	Buffer
1	31%	22%	75%	25mM HClO ₄
2	12%	20%	68%	25mM HClO ₄
3	5%	10%	85%	25mM HClO ₄
4	5%	15%	80%	25mM HClO ₄
5	5%	20%	75%	25mM HClO ₄
6	5%	25%	70%	25mM HClO ₄
7	5%	39%	65%	25mM HClO ₄
8	20%	40%	40%	25mM HClO ₄
9	15%	40%	45%	25mM HClO ₄
10	12%	20%	68%	25mM HClO ₄
11	15%	40%	45%	15mM HClO ₄
12	10%	45%	45%	15mM HClO ₄
13	15%	40%	45%	60mM HClO ₄
14	12%	20%	68%	25mM HClO ₄
15	15%	40%	45%	30mM HClO ₄ , 30mM C ₁₆ H ₃₆ ClNO ₄
16	15%	40%	45%	30mM HClO ₄ , 30 mM NaClO ₄
17	15%	40%	45%	30mM HClO ₄ , 0,25 w/v C ₁₆ H ₃₆ ClNO ₄
18	15%	45%	40%	30 mM NaClO ₄
19	18%	45%	42%	60mM HClO ₄
20	18%	42%	40%	0,01 M CH ₃ COOH, 0,1M CH ₃ COONa
21	20%	40%	40%	2% C ₁₆ H ₃₆ ClNO ₄
22	20%	40%	40%	0,01 M CH ₃ COOH, 0,10M CH ₃ COONa
23	22%	40%	38%	3% C ₁₆ H ₃₆ ClNO ₄
24	—	38%	40%	22% διάλυμα: 0,01 M H ₃ PO ₄ +HNaO, pH=6,1
25	—	38%	40%	22% διάλυμα: 0,01 M H ₃ PO ₄ +HNaO, pH=4,9
26	—	38%	40%	22% διάλυμα: 0,01 M H ₃ PO ₄ +HNaO, pH=3,5
27	—	38%	40%	22% διάλυμα: 0,03 M CH ₃ COOH 0,03 M CH ₃ COONa
28	—	41%	40%	19% διάλυμα: 0,03 M CH ₃ COOH 0,03 M CH ₃ COONa

Πίνακας 1: Οι διαλύτες που δοκιμάστηκαν με σκοπό το διαχωρισμό των ρετινοειδών.

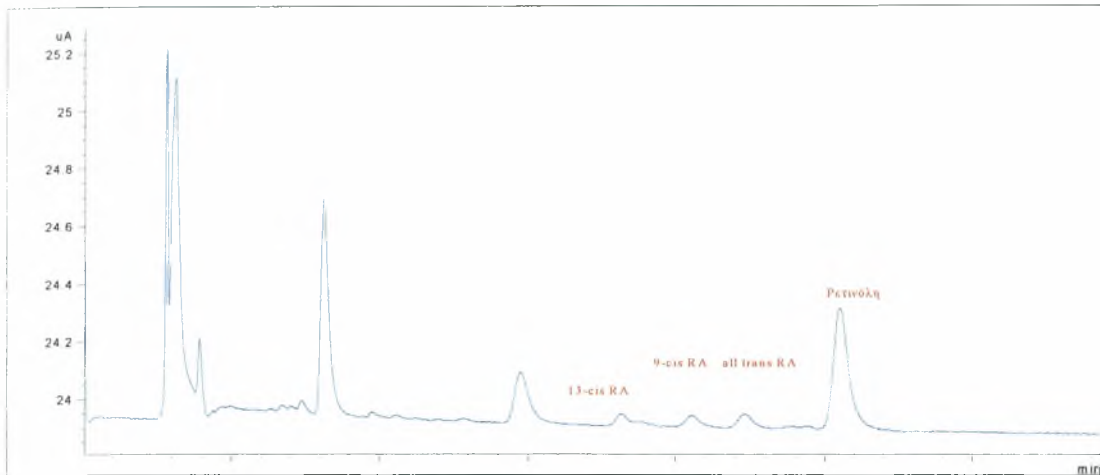
Μετά τις παραπάνω δοκιμές διαλυτών σε διάφορα δυναμικά καταλήξαμε στον διαλύτη με σύσταση: 41% CH₃OH, 40% CH₃CN, 19% διάλυμα: 0,03 M CH₃COOH 0,03 M CH₃COONa και τελικά στη μέθοδο διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης της ρετινόλης, του 13-cis ρετινοϊκού οξέος, του 9-cis ρετινοϊκού οξέος και του all-trans ρετινοϊκού οξέος, τα χαρακτηριστικά της οποίας είναι:

- η χρήση του διαλύτη με σύσταση: 41% CH₃OH, 40% CH₃CN, 19% διάλυμα: 0,03 M CH₃COOH 0,03 M CH₃COONa, ο οποίος διαχωρίζει τα ρετινοειδή και οι χρόνοι ανίχνευσής τους είναι 15,073 min, 16,931 min, 18,273 min και 21,287 min για το 13-cis ρετινοϊκό οξύ, το 9-cis ρετινοϊκό οξύ, το all-trans ρετινοϊκό οξύ και τη ρετινόλη αντίστοιχα,
- η ανάλυση των δειγμάτων σε στήλη Hypesil Betabasic C18, με ταχύτητα ροής 1 ml/min

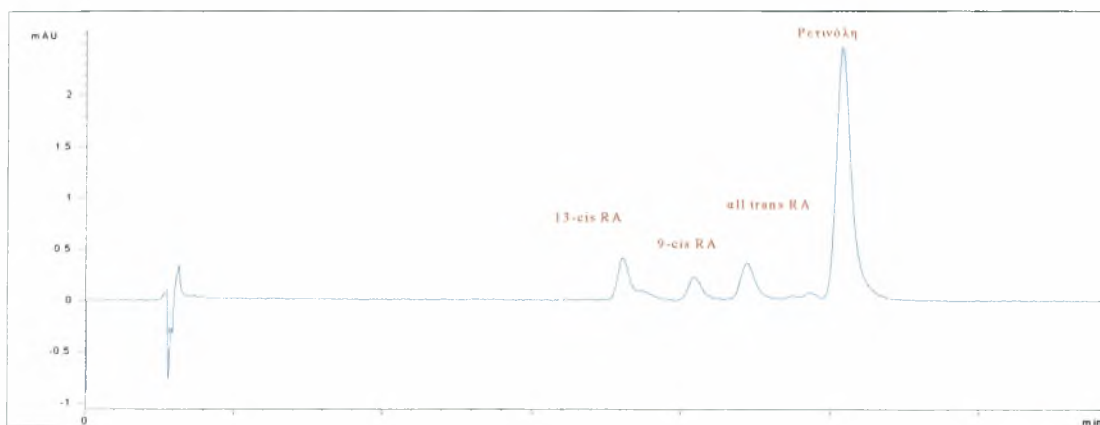
33 Πειραματικό μέρος

- και η ανίχνευση των ουσιών με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή, που παρέχει ικανοποιητικό σήμα ανίχνευσης σε συνθήκες: $E_1:800\text{mV}$ και $E_2:0\text{mV}$ και $R_1=R_2=100\mu\text{A}$ (εικ.3.1.A) και με UV ανιχνευτή, που ανιχνεύει στα 350nm (εικ.3.1.B).

A:



B:



Εικ.3.1: Η ανάλυση μείγματος spike των ρετινοϊκών οξέων και της ρετινόλης από τη μέθοδο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των ρετινοειδών, που αναπτύχθηκε στην παρούσα πειραματική μελέτη. Ανίχνευση του 13-cis ρετινοϊκού οξέος, του 9-cis ρετινοϊκού οξέος, του all trans ρετινοϊκού οξέος και της ρετινόλης από A: τον ηλεκτροχημικό ανιχνευτή ($E_1:800\text{mV}$, $E_2:0\text{mV}$, $R_1=R_2=100\mu\text{A}$) και B: τον UV ανιχνευτή (350nm) σε χρόνους 15,073 min, 16,931 min, 18,273 min και 21,287 min αντίστοιχα.

Η μέθοδος αυτή δοκιμάστηκε και στην ανάλυση δειγμάτων ορού. Τα δείγματα ορού παρασκευάζονταν και αναλύονταν με την εξής διαδικασία:

- 1) προσθήκη 300μl ορού σε δοκιμαστικό σωλήνα και αποπρωτεϊνωποίηση με 700μl CH_3CN ,
- 2) καλή ανάδευση
- 3) φυγοκέντρηση για 10 min
- 4) έκχυση 100μl υπερεκμεμένου στο βρόχο του συστήματος με σύριγγα.

Η μέθοδος διαχωρισμού των ρετινοειδών που αναπτύξαμε εξασφαλίζει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του all trans και 13-cis ρετινοϊκού οξέος και της ρετινόλης σε δείγματα ορού. Το 9-cis ρετινοϊκό οξύ δεν είναι ανιχνεύσιμο στα δείγματα ορού. Πιθανόν, η μικρή συγκέντρωσή του στον ορό, να εμποδίζει την ανίχνευσή του από τη μέθοδο που αναπτύξαμε. Ακόμα, παρόλο που το σήμα του ηλεκτροχημικού ανιχνευτή είναι πιο ευαίσθητο, υπάρχει μεγάλος θόρυβος. Για το λόγο αυτό η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων ορού έγινε με το UV ανιχνευτή (κεφ.ΙΙΙ.4.). Η βελτιστοποίηση της ηλεκτροχημικής μεθόδου βρίσκεται σε εξέλιξη.

Τέλος, μία ακόμα παράμετρος που εξετάστηκε είναι η ανάκτηση των ρετινοειδών σε δείγματα ορού. Με σκοπό τη μελέτη της ανάκτησης των ρετινοειδών παρασκευάσαμε δυο διαλύματα με σύσταση 300μl ορού, 50μl μείγματος spike των ρετινοειδών (για την παρασκευή του μείγματος spike αναμείχθηκαν σε ογκομετρική φιάλη ίσες ποσότητες από κάθε πρότυπο διάλυμα spike των ρετινοειδών. Ο τρόπος παρασκευής και η σύσταση των πρότυπων διαλυμάτων spike παρουσιάζεται στο Παράρτημα 2) και 650μl CH₃CN (διαλύματα α), δύο διαλύματα που το καθένα περιείχε 300μl ορού και 700μl CH₃CN (διαλύματα β) και δύο διαλύματα με σύσταση 50μl μείγματος spike των ρετινοειδών και 950μl CH₃CN το καθένα (διαλύματα γ). Τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με τη μέθοδο διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης που αναπτύξαμε. Η ανάκτηση των ρετινοειδών υπολογίστηκε σύμφωνα με το τύπο:

(μέσος όρος των τιμών των εμβαδών των διαλυμάτων α)–(μέσος όρος των τιμών των εμβαδών των διαλυμάτων β) / (μέσος όρος των εμβαδών των τιμών διαλυμάτων γ) και βρέθηκε ίση με 95±0.03% για τη ρετινόλη και 96 ± 0.02% για τα οξέα.

ΙΙΙ.4. Πρότυπες καμπύλες

Μετά την ανάπτυξη της μεθόδου διαχωρισμού της ρετινόλης και των ρετινοϊκών οξέων σε δείγματα ορού, έγινε η παραγωγή των πρότυπων καμπυλών των ρετινοειδών, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, που θα προέκυπταν μετά από την ανάλυση των δειγμάτων των ασθενών και των υγιών ατόμων-μαρτύρων. Επειδή, η ηλεκτροχημική ανίχνευση δεν τελειοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων ορού έγινε με το UV ανιχνευτή.

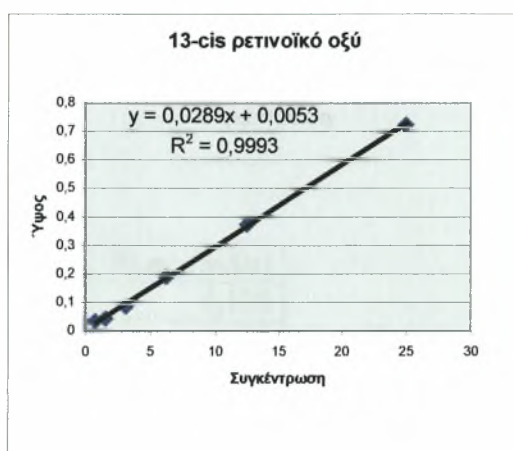
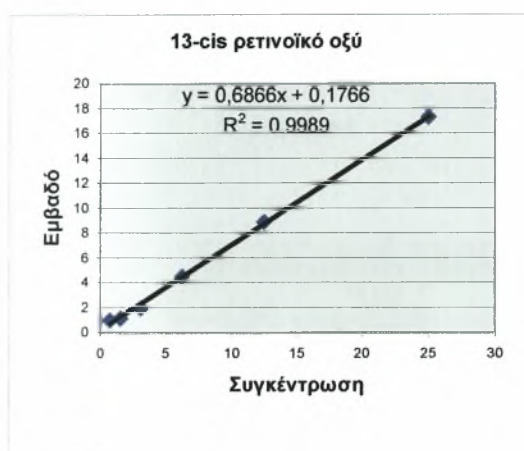
Για την παραγωγή των πρότυπων καμπυλών παρασκευάστηκαν τα παρακάτω μείγματα (πίνακας 2) από τα spike (παράρτημα 2) των ρετινοειδών με διαλύτη το διαλύτη της κινητής φάσης της μεθόδου διαχωρισμού των ρετινοειδών.

Μείγμα	Σύσταση σε ρετινόλη(ng/ml)	Σύσταση σε all trans RA(ng/ml)	Σύσταση σε 9-cis RA(ng/ml)	Σύσταση σε 13-cis RA(ng/ml)
St1	1000	100	100	100
St2	500	50	50	50
St3	250	25	25	25
St4	125	12,5	12,5	12,5
St5	62,5	6,25	6,25	6,25
St6	31,25	3,125	3,125	3,125
St7	15,625	1,56	1,56	1,56
St8	7,81	0,78	0,78	0,78

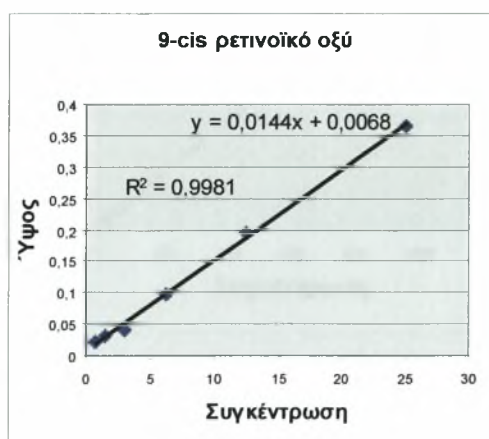
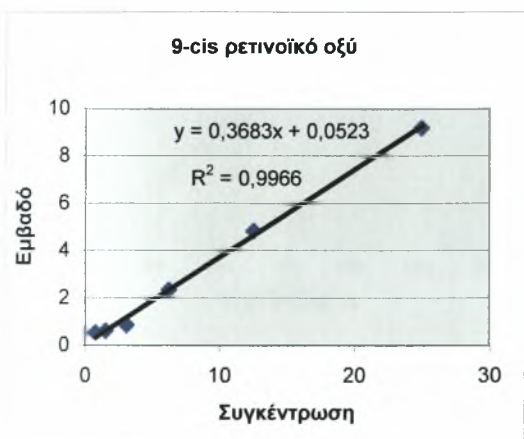
Πίνακας 1: Η συγκέντρωση των ρετινοϊκών οξέων και της ρετινόλης στα μείγματα πρότυπων ουσιών.

Κάθε μείγμα αναλύθηκε δύο φορές με τη μέθοδο διαχωρισμού που αναπτύξαμε (κεφ.ΙΙΙ.3). Οι τιμές του ύψους και του εμβαδού που παρουσιάζονται παρακάτω αποτελούν το μέσο όρο των τιμών, που προέκυπταν μετά τη διπλή ανάλυση του κάθε δείγματος. Με σκοπό την καλύτερη ανίχνευση των συγκεντρώσεων των ρετινοϊκών οξέων, οι πρότυπες καμπύλες κατασκευάστηκαν με τις τιμές των διαλυμάτων St8-St3. Παρακάτω ακολουθούν οι πρότυπες καμπύλες:

13-cis ρετινοϊκό οξύ (ng/ml)	Εμβαδόν (mAu*s)	Ύψος (mAu)
0,78	1	0,035
1,56	1,15	0,044
3,125	2	0,087
6,25	4,5	0,19
12,5	8,9	0,375
25	17,3	0,725

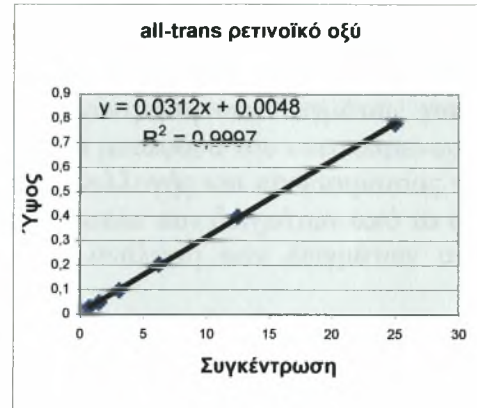
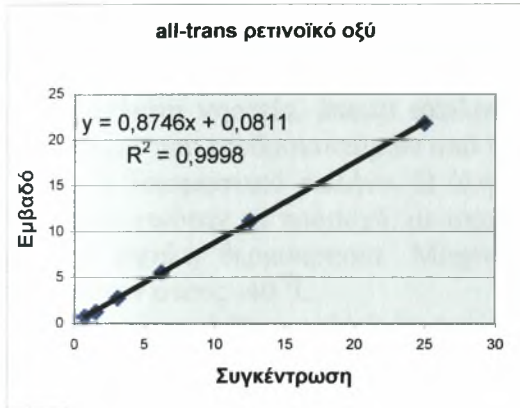


9-cis ρετινοϊκό οξύ (ng/ml)	Εμβαδόν (mAu*s)	Ύψος (mAu)
0,78	0,55	0,022
1,56	0,625	0,03
3,125	0,865	0,0425
6,25	2,35	0,097
12,5	4,85	0,195
25	9,2	0,365

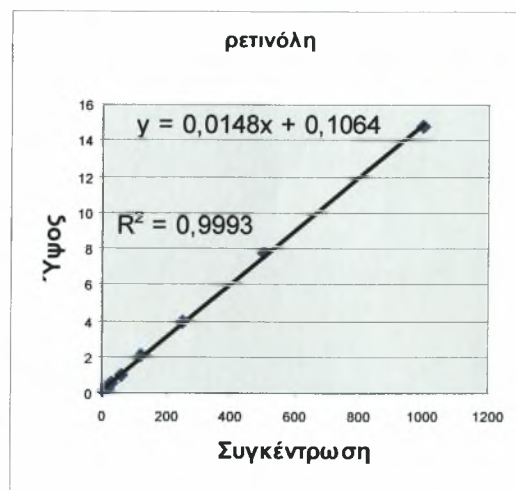
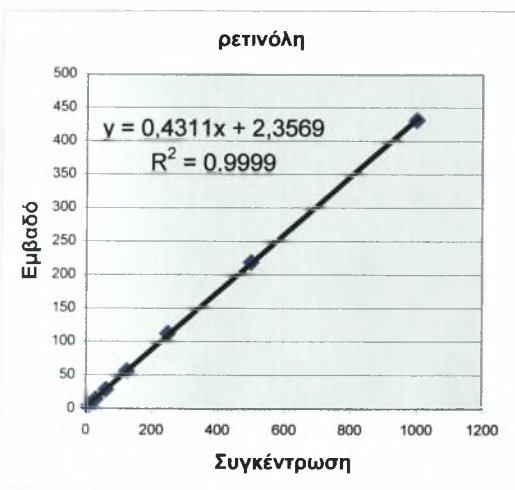


36 Πειραματικό μέρος

all trans ρετινοϊκό οξύ (ng/ml)	Εμβαδόν (mAu*s)	Ύψος (mAu)
0,78	0,78	0,029
1,56	1,3	0,049
3,125	2,8	0,099
6,25	5,6	0,0205
12,5	11,2	0,4
25	21,85	0,78



ρετινόλη (ng/ml)	Εμβαδόν (mAu*s)	Ύψος (mAu)
7,81	4,25	0,135
15,625	7,25	0,235
31,25	15,25	0,5
62,5	29,4	1
125	57,35	2,05
250	113	3,95
500	219,2	7,75
1000	432,05	14,8



III.5. Ανάλυση δειγμάτων ορού ασθενών και υγιών ατόμων

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, για τη δημιουργία της μεθόδου διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης των ρετινοειδών, που περιγράφεται στα κεφάλαια III.3 και III.4, ακολούθησε η προετοιμασία και η ανάλυση των δειγμάτων των ασθενών και των μαρτύρων.

Τα δείγματα των ασθενών προσήλθαν για τακτικό έλεγχο και συλλέχθηκαν στα πλαίσια αυτού του ελέγχου. Για τη συλλογή των δειγμάτων τηρήθηκαν οι προβλεπόμενοι κανόνες, που αφορούν στην ιατρική δεοντολογία και ηθική και ελήφθη πρόνοια για την προστασία του ιατρικού απορρήτου, με τη χρήση κωδικών αντί ονομάτων.

Τα δείγματα των ασθενών και των υγιών ατόμων συλλέχθηκαν με αιμοληψία μετά από ολονύκτια νηστεία, έπειτα ακολουθούσε φυγοκέντρωση των δειγμάτων για το διαχωρισμό των ερυθροκυττάρων από το πλάσμα και μεταφορά του υπερκείμενου με πιπέτα σε δοκιμαστικό σωλήνα. Η όλη διαδικασία συλλογής και προετοιμασίας των δειγμάτων γινόταν με προσοχή, με σκοπό την προστασία των δειγμάτων από το φως και την υψηλή θερμοκρασία. Μέχρι να γίνει η ανάλυση των δειγμάτων αυτά φυλάγονταν στους -40°C .

Συνολικά αναλύθηκαν 31 δείγματα υγιών ατόμων-μαρτύρων με μέσο όρο ηλικίας $51,5 \pm 13,6$ και 30 δείγματα ασθενών με μέσο όρο ηλικίας $51,7 \pm 14,8$, εκ των οποίων οι 21 πάσχουν από ηπατίτιδα Β, οι 6 από ηπατίτιδα C, οι 2 από ηπατίτιδα Β+C και ένας από ηπατίτιδα Β+D. Τα δείγματα για να αναλυθούν, προετοιμάστηκαν με τη παρακάτω διαδικασία:

- 1) προσθήκη 300μl ορού σε δοκιμαστικό σωλήνα και αποπρωτεϊνωποίηση με 700μl CH_3CN ,
- 2) καλή ανάδευση
- 3) φυγοκέντρωση για 10 min
- 4) έκχυση 100μl υπερκείμενου στο βρόχο του συστήματος με σύριγγα.

IV. Αποτελέσματα

Τα 30 δείγματα των ασθενών με ιογενή ηπατίτιδα και τα 31 δείγματα των υγιών ατόμων-μαρτύρων αναλύθηκαν με τη HPLC μέθοδο διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης της ρετινόλης, του 13-cis, του 9-cis και του all trans ρετινοϊκού οξέος. Η ρετινόλη ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα και ο μέσος όρος συγκέντρωσής της στον ορό των ασθενών βρέθηκε ίσος με $327,08 \pm 129,09$ ng/ml και στον ορό των μαρτύρων βρέθηκε ίσος με $406,1 \pm 126,78$ ng/ml. Η διάμεσος των τιμών της ρετινόλης στο δείγμα των μαρτύρων είναι ίση με $381,44$ ng/ml και των ασθενών ίση με $291,35$ ng/ml. Η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή της ρετινόλης στους μάρτυρες είναι $223,8$ ng/ml και $764,32$ ng/ml αντίστοιχα και στους ασθενείς είναι $111,17$ ng/ml και $606,66$ ng/ml αντίστοιχα. Τα ρετινοϊκά οξέα δεν ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα. Συγκεκριμένα, το 13-cis ρετινοϊκό οξύ ανιχνεύθηκε σε 17 δείγματα ασθενών με μέσο όρο συγκέντρωσης $1,77 \pm 0,52$ ng/ml και σε 15 δείγματα μαρτύρων με μέσο όρο συγκέντρωσης ίσο με $2,23 \pm 0,72$ ng/ml. Η διάμεσος, η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή του 13-cis ρετινοϊκού οξέος στους μάρτυρες είναι $2,27$ ng/ml, $1,12$ ng/ml και $3,88$ ng/ml αντίστοιχα. Στο δείγμα των ασθενών η διάμεσος, η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή του 13-cis ρετινοϊκού οξέος είναι $1,69$ ng/ml, 1 ng/ml, $3,08$ αντίστοιχα. Το all trans ρετινοϊκό οξύ βρέθηκε σε 12 δείγματα ασθενών με μέσο όρο συγκέντρωσης ίσο με $1,44 \pm 0,33$ ng/ml και σε 15 δείγματα μαρτύρων με μέσο όρο συγκέντρωσης $1,43 \pm 0,21$ ng/ml. Η διάμεσος, η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή του all trans ρετινοϊκού οξέος στους μάρτυρες είναι $1,41$ ng/ml, $0,98$ ng/ml και $1,83$ ng/ml αντίστοιχα και στους ασθενείς είναι $1,46$ ng/ml, $0,76$ ng/ml και $2,05$ ng/ml αντίστοιχα (πίνακας 1,2,3). Το 9-cis ρετινοϊκό οξύ δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα.

	n (ασθενών)	Ασθενείς (ng/ml)	n (μαρτύρων)	Μάρτυρες (ng/ml)
ρετινόλη	30	$327,08 \pm 129,09$	31	$406,1 \pm 126,78$
13-cis ρετινοϊκό οξύ	17	$1,77 \pm 0,52$	15	$2,23 \pm 0,72$
all trans ρετινοϊκό οξύ	12	$1,44 \pm 0,33$	15	$1,43 \pm 0,21$

Πίνακας 1: οι μέσοι όροι, η τυπική απόκλιση και το μέγεθος (n) των δειγμάτων των ασθενών και των μαρτύρων.

	ρετινόλη	13-cis ρετινοϊκό οξύ	all trans ρετινοϊκό οξύ
Ελάχιστη τιμή	$223,8$ ng/ml	$1,12$ ng/ml	$0,98$ ng/ml
Μέγιστη τιμή	$764,32$ ng/ml	$3,88$ ng/ml	$1,83$ ng/ml
Διάμεσος	$381,44$ ng/ml	$2,27$ ng/ml	$1,41$ ng/ml

Πίνακας 2: η ελάχιστη τιμή, η μέγιστη τιμή και η διάμεσος των ρετινοϊκών οξέων και της ρετινόλης στο δείγμα των μαρτύρων.

	ρετινόλη	13-cis ρετινοϊκό οξύ	all trans ρετινοϊκό οξύ
Ελάχιστη τιμή	$111,17$ ng/ml	1 ng/ml	$0,76$ ng/ml
Μέγιστη τιμή	$606,66$ ng/ml	$3,08$ ng/ml	$2,05$ ng/ml
Διάμεσος	$291,35$ ng/ml	$1,69$ ng/ml	$1,46$ ng/ml

Πίνακας 3: η ελάχιστη τιμή, η μέγιστη τιμή και η διάμεσος των ρετινοϊκών οξέων και της ρετινόλης στο δείγμα των ασθενών.

Στον πληθυσμό των ασθενών, οι ασθενείς με ιογενή ηπατίτιδα Β είναι 21 έχουν μέσο όρο συγκέντρωσης ρετινόλης ($n=21$), 13-cis ρετινοϊκού οξέος ($n=12$) και all trans ρετινοϊκού οξέος ($n=8$) $333,930 \pm 136,37$ ng/ml, $1,8 \pm 0,58$ ng/ml και $1,41 \pm 0,4$ ng/ml αντίστοιχα. Οι ασθενείς με ιογενή ηπατίτιδα C είναι 6 και έχουν μέσο όρο

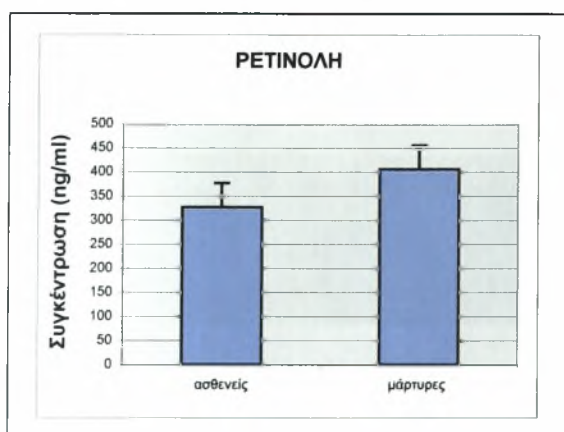
συγκέντρωσης ρετινόλης (n=6), 13-cis ρετινοϊκού οξέος (n=4) και all trans ρετινοϊκού οξέος (n=3) $290,97 \pm 129,79$ ng/m, $1,78 \pm 0,41$ ng/ml και $1,48 \pm 0,16$ ng/ml αντιστοίχα. Οι ασθενείς με D και B ηπατίτιδα είναι δύο και έχουν μέσο όρο ρετινόλης $325,1 \pm 111,48$ ng/ml, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν ρετινοϊκά οξέα στα δείγματά τους. Τέλος, υπάρχει ένας ασθενής με B και C ηπατίτιδα και έχει ρετινόλη ίση με 404 ng/ml, 13-cis ρετινοϊκό οξύ ίσο με 1,46 ng/ml και all trans ρετινοϊκό οξύ ίσο με 2,08 ng/ml (πίνακας 4).

ασθενείς	n _{ρετινόλη}	Ρετινόλη(ng/ml)	n _{13-cis}	13-cis ρετινοϊκό οξύ(ng/ml)	n _{alltrans}	All trans ρετινοϊκό οξύ (ng/ml)
B	21	$333,93 \pm 136,37$	12	$1,8 \pm 0,58$	8	$1,41 \pm 0,4$
C	6	$290,97 \pm 129,79$	4	$1,78 \pm 0,41$	3	$1,48 \pm 0,16$
D+B	2	$325,1 \pm 111,48$	–	–	–	–
B+C	1	404	1	1,46	1	2,08

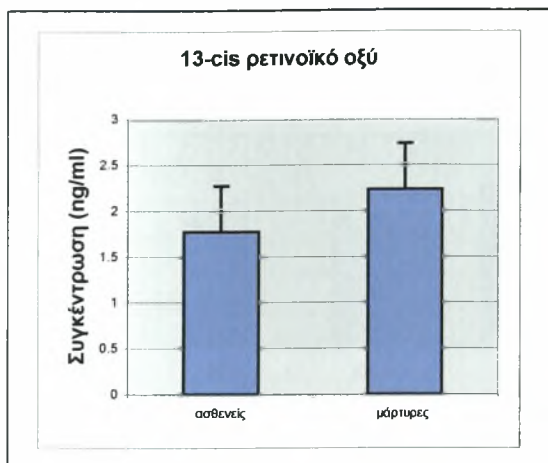
Πίνακας 4: οι μέσοι όροι, η τυπική απόκλιση και το μέγεθος (n) των δειγμάτων των ασθενών με ιογενή ηπατίτιδα B, με ιογενή ηπατίτιδα C, με ιογενή ηπατίτιδα D και B και με ιογενή ηπατίτιδα C και B.

Με σκοπό τη στατιστική αξιολόγηση των δειγμάτων των ασθενών και των μαρτύρων και τη σύγκριση των επιπέδων των ρετινοϊκών οξέων και της ρετινόλης μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων, εξετάστηκαν τα δείγματα με μη παραμετρική δοκιμή. Η συγκέντρωση της ρετινόλης και των ρετινοϊκών οξέων είναι ποσοτικό χαρακτηριστικό και συνεχές μέγεθος και δεν υφίσταται αντιστοιχία των παρατηρήσεων των συγκρίσιμων ομάδων (των ασθενών και των μαρτύρων) επομένως είναι δυνατή η αξιολόγησή της με τη μη παραμετρική μέθοδο Mann-Whitney U τεστ.

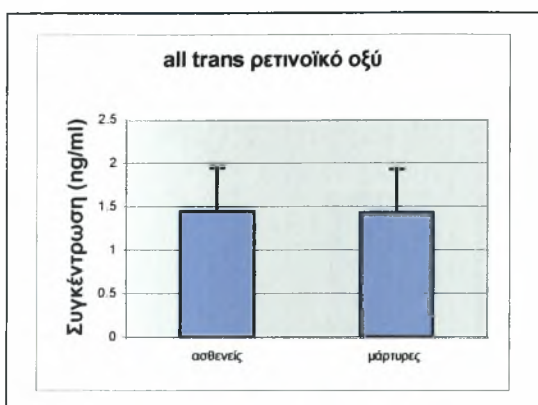
Τα δύο δείγματα της ρετινόλης (ασθενείς και μάρτυρες) αξιολογήθηκαν με το Mann-Whitney U τεστ ($Z = -2,034$, $U = 606$, $P = 0,0419$) και βρέθηκαν διαφορετικά σε βαθμό στατιστικής σημαντικότητας 5% ($p = 0,02 < 0,05$) (διάγραμμα 1). Ομοίως, αξιολογήθηκαν στατιστικά τα δύο δείγματα του 13-cis ρετινοϊκού οξέος ($Z = -1,737$, $P = 0,824$, $U = 173,5$), τα οποία δεν βρέθηκαν διαφορετικά με στατιστική σημαντικότητα σε επίπεδο 5% ($p = 0,0824 > 0,05$). Ωστόσο, παρατηρείται μια τάση μείωσης της συγκέντρωσης του 13-cis ρετινοϊκού οξέος στον πληθυσμό των ασθενών (διάγραμμα 2). Τέλος, με την εφαρμογή του Mann-Whitney U τεστ για το all trans ρετινοϊκό οξύ ($Z = -0,317$, $P = 0,7511$, $U = 96,5$) οι δύο πληθυσμοί δεν βρέθηκαν διαφορετικοί με στατιστική σημαντικότητα 0,05 ($p = 0,7511 > 0,05$) (διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 1: Τα δύο δείγματα είναι διαφορετικά σε βαθμό στατιστικής σημαντικότητας 5% ($p = 0,02 < 0,05$). Τα επίπεδα της ρετινόλης στον ορό των μαρτύρων είναι μεγαλύτερα σε σχέση με αυτά των ασθενών.

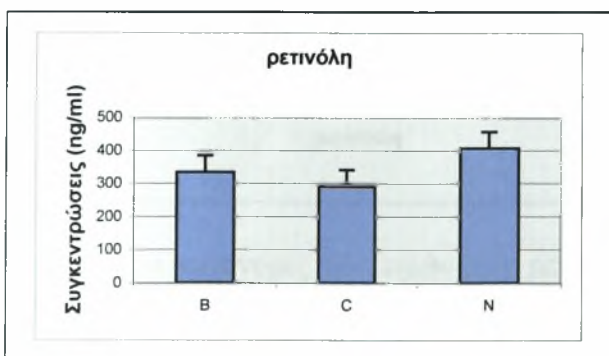


Διάγραμμα 2: Τα δείγματα του 13-cis ρετινοϊκού οξέος δεν είναι διαφορετικά σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 0,05 ($p=0,0824>0,05$), ωστόσο παρατηρείται τάση μείωσης της συγκέντρωσης του ρετινοϊκού οξέος στους ασθενείς.

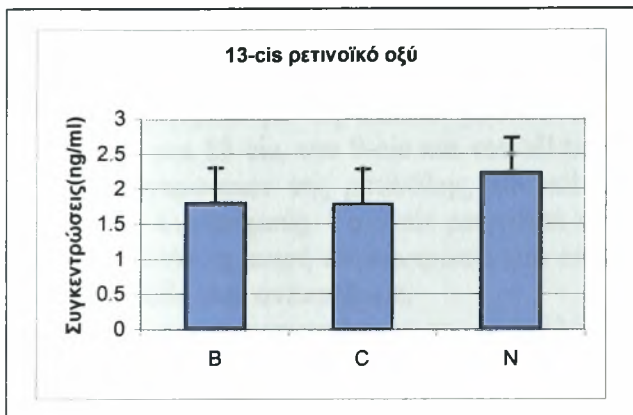


Διάγραμμα 3: Διαγραμματική απεικόνιση των μέσων όρων των δύο δειγμάτων για το all trans ρετινοϊκό οξύ. Τα δύο δείγματα δεν διαφέρουν σε βαθμό στατιστικής σημαντικότητας 0,05 ($p=0,7511>0,05$).

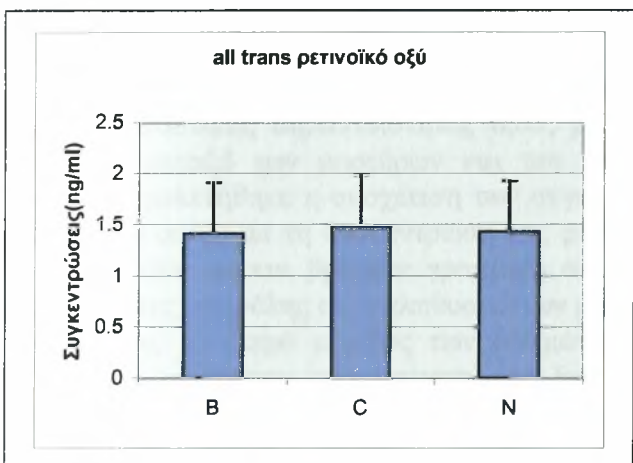
Πέρα από τη στατιστική αξιολόγηση των δειγμάτων των ασθενών και των μαρτύρων με τη μη παραμετρική μέθοδο Mann-Whitney U τεστ, έγινε και η στατιστική ανάλυση του δείγματος των ασθενών με ιογενή ηπατίτιδα Β, του δείγματος των ασθενών με ιογενή ηπατίτιδα C και του δείγματος των μαρτύρων για τη σύγκριση των επιπέδων των ρετινοϊκών οξέων και της ρετινόλης. Η στατιστική αξιολόγηση των τριών πληθυσμών έγινε με τη μη παραμετρική μέθοδο Kruskal-Wallis. Τα τρία δείγματα της ρετινόλης, που αξιολογήθηκαν με τη Kruskal-Wallis μέθοδο ($P=0,0419$) δεν βρέθηκαν διαφορετικά σε βαθμό στατιστικής σημαντικότητας 5% ($p=0,10>0,05$). Ομοίως, τα τρία δείγματα του 13-cis ρετινοϊκού οξέος ($p=0,26>0,05$) και του all trans ρετινοϊκού οξέος ($p=0,9>0,05$) δεν βρέθηκαν διαφορετικά με στατιστική σημαντικότητα 0,05 (διάγραμμα 4,5,6).



Διάγραμμα 4: Διαγραμματική απεικόνιση των τριών πληθυσμών της ρετινόλης. B=ασθενείς με ηπατίτιδα Β ($n=21$), C=ασθενείς με ηπατίτιδα C ($n=6$), N=μάρτυρες της ρετινόλης ($n=31$). Οι πληθυσμοί αναλύθηκαν με τη μέθοδο Kruskal-Wallis και δεν βρέθηκαν διαφορετικοί με στατιστική σημαντικότητα 0,05 ($p=0,10>0,05$).

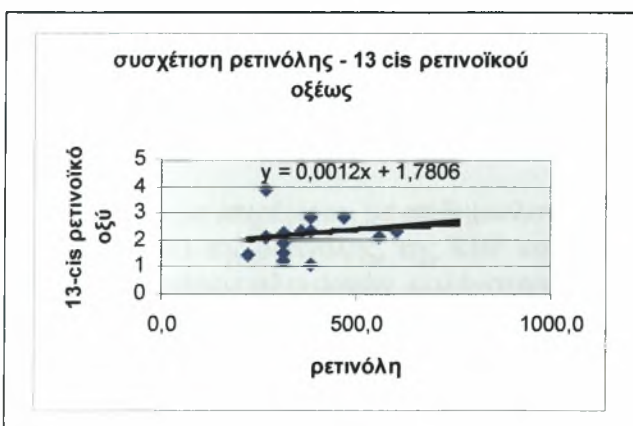


Διάγραμμα 5: Διάγραμμα των τριών πληθυσμών του 13-cis ρετινοϊκού οξέος. B=ασθενείς με ηπατίτιδα B (n=12), C= ασθενείς με ηπατίτιδα C (n=4), N=μάρτυρες (n=15). Οι πληθυσμοί αναλύθηκαν με τη μέθοδο Kruskal-Wallis και δεν βρέθηκαν διαφορετικοί με στατιστική σημαντικότητα 0,05 ($p=0,26 > 0,05$).



Διάγραμμα 6: Διαγραμματική απεικόνιση των τριών πληθυσμών του all trans ρετινοϊκού οξέος. B=ασθενείς με ηπατίτιδα B (n=8), C=ασθενείς με ηπατίτιδα C (n=3), N=μάρτυρες (n=15). Οι πληθυσμοί αναλύθηκαν με τη μέθοδο Kruskal-Wallis και δεν βρέθηκαν διαφορετικοί με στατιστική σημαντικότητα 0,05 ($p=0,9 > 0,05$).

Επιπλέον, μελετήθηκε η συσχέτιση του 13-cis ρετινοϊκού οξέος με τη ρετινόλη στον πληθυσμό των ασθενών και στον πληθυσμό των μαρτύρων. Το ίδιο έγινε και για το all trans ρετινοϊκό οξύ στους δύο πληθυσμούς. Τελικά, βρέθηκε ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση μόνο μεταξύ του 13-cis ρετινοϊκού οξέος με τη ρετινόλη στον πληθυσμό των μαρτύρων με βαθμό συσχέτισης $p=0,0304$ και $R^2=0,312$ (διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4: Διαγραμματική απεικόνιση της γραμμικής συσχέτισης του 13-cis ρετινοϊκού οξέος με τη ρετινόλη στο πληθυσμό των μαρτύρων. ($R^2=0,312, p=0,0304, y=0,0012x+1,7806$)

Τέλος, οι κατανομές των τιμών των ρετινοϊκών οξέων και της ρετινόλης για τα δείγματα των μαρτύρων και των ασθενών είναι επικαλυπτόμενες σε μεγάλο βαθμό, με αποτέλεσμα να μην είναι κατάλληλες για την αναζήτηση της ευαισθησίας και της απόδοσης της μεθόδου.

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μετά την ανάλυση των δειγμάτων ασθενών με ιογενή ηπατίτιδα και υγιών απόμων-μαρτύρων με τη HPLC μέθοδο διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης της ρετινόλης, του 13-cis, του 9-cis και του all trans ρετινοϊκού οξέος, βρέθηκαν οι τιμές των συγκεντρώσεων της ρετινόλης, του all trans και του 13-cis ρετινοϊκού οξέος στους δύο πληθυσμούς. Το 9-cis ρετινοϊκό οξύ δεν ήταν ανιχνεύσιμο στα δείγματα ορού. Πιθανόν, η μικρή συγκέντρωσή του στον ορό, να εμποδίζει την ανίχνευσή του από τη μέθοδο που αναπτύξαμε.

Οι τιμές των συγκεντρώσεων της ρετινόλης, του 13-cis και του all trans ρετινοϊκού οξέος στους δύο πληθυσμούς (ασθενείς, μάρτυρες) αξιολογήθηκαν στατιστικά με τις μη παραμετρικές μεθόδους Mann-Whitney U τεστ και Kruskal-Wallis. Τελικά στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 5% βρέθηκε μόνο η διαφορά μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων για τη ρετινόλη και σύμφωνα με τους μέσους όρους των τιμών παρατηρείται σχετική μείωση της συγκέντρωσης της ρετινόλης στους ασθενείς. Τα δείγματα του 13-cis και του all trans ρετινοϊκού οξέος δεν βρέθηκαν διαφορετικά σε βαθμό στατιστικής σημαντικότητας 0,05, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η σύγκριση μεταξύ των μαρτύρων και των ασθενών για αυτά τα ρετινοϊκά οξέα. Επιπλέον, μελετήθηκε η συσχέτιση των συγκεντρώσεων του 13-cis και του all trans ρετινοϊκού οξέος με τη συγκέντρωση της ρετινόλης στον πληθυσμό των μαρτύρων και των ασθενών και βρέθηκε γραμμική συσχέτιση μεταξύ του 13-cis ρετινοϊκού οξέος και της ρετινόλης στον πληθυσμό των μαρτύρων.

Πιθανόν, το μικρό μέγεθος των δειγμάτων της ρετινόλης και των ρετινοϊκών οξέων δεν επέτρεψαν τη σύγκριση των δειγμάτων των ρετινοϊκών οξέων και τη μελέτη της συσχέτισης της συγκέντρωσης των ρετινοειδών μεταξύ τους στους δυο πληθυσμούς και την αξιολόγηση της μεθόδου. Η ανάλυση μεγαλύτερων σε αριθμό δειγμάτων που θα γίνει στο μέλλον, σε συνδυασμό με τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της μεθόδου, ίσως θα μπορέσουν να κάνουν δυνατή τη στατιστική αξιολόγηση και σύγκριση των ρετινοϊκών οξέων και της ρετινόλης σε δείγματα ασθενών και μαρτύρων.

Σύμφωνα με τη στατιστική αξιολόγηση των δειγμάτων βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της ρετινόλης είναι χαμηλότερη στους ασθενείς. Παρόμοιο αποτέλεσμα έχει παρατηρηθεί και σε άλλες πειραματικές μελέτες. Παράδειγμα, χαμηλά επίπεδα ρετινόλης και άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών (όπως η β-κρυπτοξανθίνη, η α, β-καροτένια και η α,γ-τοκοφερόλη), έχουν βρεθεί σε δείγματα ορού ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα και κίρρωση και η μείωση αυτή των επιπέδων των αντιοξειδωτικών ουσιών υποδεικνύουν την ανάπτυξη οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με ηπατίτιδα. [28,29,63]

Σύμφωνα με πειράματα, με επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα της ρετινόλης, της RBP και της τρανσθυρετίνης μειώνονται σημαντικά σε περιπτώσεις φλεγμονών, μολύνσεων και τραυματισμού. Στις περιπτώσεις αυτές επάγεται η απόκριση οξείας φάσης και η παραγωγή των πρωτεϊνών της οξείας φάσης. Οι πρωτεΐνες αυτές παράγονται από τα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος και απελευθερώνονται στη κυκλοφορία του αίματος, με σκοπό την προστασία της ομοιόστασης του οργανισμού. Κατά τη διάρκεια της απόκρισης οξείας φάσης παρατηρείται αυξημένη σύνθεση των πρωτεϊνών της οξείας φάσης στα ηπατοκύτταρα και μείωση της σύνθεσης πρωτεϊνών που δρουν ως μεταφορείς θρεπτικών ουσιών, όπως είναι η RBP, η τρανσθυρετίνη και η αλβουμίνη, με συνέπεια τη μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών αυτών στον ορό. Σε περιπτώσεις απόκρισης οξείας φάσης τα χαμηλά επίπεδα ρετινόλης που παρατηρούνται πιστεύεται ότι οφείλονται στην

περιορισμένη σύνθεση ή/και απελευθέρωση της RBP και της τρανθυρετίνης από τα ηπατοκύτταρα. Χαμηλά επίπεδα της RBP και της τρανθυρετίνης έχουν βρεθεί και σε αναλύσεις δειγμάτων ορού ασθενών με οξεία και χρόνια ηπατίτιδα και κίρρωση.[64,65,66]

Επιπλέον μια ακόμα περίπτωση μείωσης των επιπέδων της ρετινόλης αποτελεί η ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι σε περιπτώσεις ηπατικής βλάβης, που προκαλείται από οποιαδήποτε αιτία, τα αστεροειδή κύτταρα υποβάλλονται στη διαδικασία ενεργοποίησης. Η διαδικασία ενεργοποίησης των αστεροειδών κυττάρων περιλαμβάνει το συνεχή πολλαπλασιασμό των κυττάρων, το μετασχηματισμό τους σε ινοβλάστες, τη συσταλτικότητα τους, το χημειοτακτισμό των λευκοκυττάρων και την απώλεια των αποθεμάτων της βιταμίνης A. Συνεπώς, σε περιπτώσεις οποιασδήποτε ηπατικής βλάβης, που επάγει την ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων προκαλείται η μετατροπή των αποθηκευμένων ρετινυλικών εστέρων σε ρετινόλη, η οποία απελευθερώνεται από τα κύτταρα, με αποτέλεσμα την μείωση των αποθεμάτων της βιταμίνης A στο ήπαρ.[67] Επιπλέον, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η σχέση της συγκέντρωσης της ρετινόλης στο πλάσμα δεν είναι γραμμική σε σχέση με τη συγκέντρωσή της στο ήπαρ. Η συγκέντρωση της ρετινόλης στο πλάσμα αυξάνεται αναλογικά σε σχέση με τη συγκέντρωση στο ήπαρ όταν αυτή κυμαίνεται μεταξύ 10-30μg ανά γραμμάρια ιστού, ενώ παραμένει σχεδόν σταθερή σε συγκέντρωση ρετινόλης στο ήπαρ 30-300μg/g.[1,] Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα αυτά γίνεται φανερό ότι σε περιπτώσεις ηπατικής βλάβης π.χ ιογενής ηπατίτιδα, η ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων που επάγεται μπορεί να προκαλέσει σημαντική μείωση των αποθεμάτων της ρετινόλης στο ήπαρ, με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της ρετινόλης στο πλάσμα.

Η ενεργοποίηση αυτή των αστεροειδών κυττάρων σε περιπτώσεις ηπατικής βλάβης, με αποτέλεσμα την απώλεια αποθηκευμένης ρετινόλης, πιθανόν θα μπορούσε να δικαιολογήσει τη διαταραχή της συσχέτισης του 13-cis ρετινοϊκού οξέος με τη ρετινόλη σε περιπτώσεις ιογενής ηπατίτιδας. Το 13-cis ρετινοϊκό οξύ είναι φυσικός ενδογενής μεταβολίτης της ρετινόλης, γεγονός που μπορεί να δικαιολογήσει τη συσχέτιση των συγκεντρώσεών τους σε ένα φυσιολογικό άτομο. Πιθανόν, η απώλεια της αποθηκευμένης ρετινόλης από το ήπαρ σε περιπτώσεις ηπατοπάθειας να διαταράσσει αυτή τη συσχέτιση του ρετινοϊκού οξέος με τη ρετινόλη. Ωστόσο, το μικρό μέγεθος των δειγμάτων δυσκολεύει την στατιστική αξιολόγηση και τη συσχέτιση των ρετινοειδών μεταξύ τους, με συνέπεια τα συγκεκριμένα δεδομένα να περιορίζουν τη δυνατότητα διεξαγωγής συμπερασμάτων.

Μέχρι σήμερα υπάρχουν αρκετές έρευνες που φανερώνουν τη χαμηλή συγκέντρωση της ρετινόλης στο πλάσμα σε διάφορες περιπτώσεις ηπατοπάθειας. Παρόλο αυτά ακόμα δεν είναι απόλυτα σαφές ποιος ή ποίοι μηχανισμοί μπορεί να ευθύνονται για τη μείωση της ρετινόλης στον ορό σε περιπτώσεις ηπατοπαθειών. Μία πιθανή απάντηση σε αυτό το ερώτημα θα μπορούσε να δοθεί μέσω της μελέτης των επιπέδων της ρετινόλης στο πλάσμα σε κάθε περίπτωση ηπατοπάθειας ξεχωριστά. Η παρούσα πειραματική μελέτη βρίσκεται σε εξέλιξη, με σκοπό τη μελέτη της πιθανής διαφοροποίησης των επιπέδων των ρετινοειδών της βιταμίνης A σε διάφορες περιπτώσεις ηπατοπάθειας, όπως ιογενής ηπατίτιδα και κίρρωση και ίσως τη δυνατότητα ανάπτυξης μιας κλινικής μεθόδου παρακολούθησης των ηπατοπαθειών.

Παράρτημα 1

Χημικά αναλώσιμα	Εταιρία
13-cis ρετινοϊκό οξύ	Sigma, St. Louis, MO
all trans ρετινοϊκό οξύ	Sigma, St. Louis, MO
9-cis ρετινοϊκό οξύ	Sigma, St. Louis, MO
ρετινόλη	Fluka (Buchs, Switzerland)
CH ₃ COH	J.T.Baker HPLC Analyzed, Holland
CH ₃ CN	Merck KGaA Darmstadt, Germany
HClO ₄	E.Merk, D-6100 Darmstadt, F.R.Germany
C ₁₆ H ₃₆ ClNO ₄	Fluka, Switzerland
NaClO ₄	A Cros Organics, New Jersey, USA
CH ₃ COOH	Fluka Chemie AG, CH-9470 Buchs
CH ₃ COONa	PA Paureac, Barcelona, Espana
H ₃ PO ₄	J.T. Baker, Holland
HNaO	Merk KGaA, Germany

Παράρτημα 2

Παρασκευή πρότυπων βιταμίνης A

Η παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων έγινε στο εργαστήριο υπό τον φωτισμό αμυδρού κίτρινου φωτός, με σκοπό την προστασία των ρετινοειδών από την φωτοϊσομερείωση και το φωτοεκφυλισμό. Τα πρότυπα διαλύματα φυλάχθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες, οι οποίες πριν τη χρήση τους είχαν πλυθεί πολύ καλά ώστε να μην επηρεαστεί η καθαρότητα των πρότυπων διαλυμάτων. Το στόμιο της κάθε ογκομετρικής φιάλης, που περιείχε πρότυπο διάλυμα, σφραγίστηκε με καθαρό καπάκι, το οποίο έπειτα περιβάλλαμε με ταινία παραφίνης. Τα πρότυπα διαλύματα μετά την παραγωγή τους φυλάχθηκαν στους -40°C .

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων ρετινόλης.

1. Ζύγισμα 11,1 ng ρετινόλης σε ογκομετρική των 100ml
 2. Προσθήκη λίγων σταγόνων CH_3OH για να διαλυθεί η ρετινόλη
 3. Προσθήκη ρετινόλης με μεθανόλη ως τα 100ml
- ⇒ Παρασκευή διαλύματος stock ρετινόλης με συγκέντρωση 111.000 ng/ml

1. Σε ογκομετρική των 10ml προσθέσαμε 5ml CH_3OH
 2. Προσθήκη 1ml από το stock ρετινόλης στην ογκομετρική
 3. Προσθήκη CH_3OH μέχρι τα 10ml.
- ⇒ Παρασκευή διαλύματος spike ρετινόλης με συγκέντρωση 10.000 ng/ml

1. Σε ογκομετρική των 10ml προσθέσαμε 5ml CH_3OH
 2. Προσθήκη 0,1ml από το stock ρετινόλης
 3. Προσθήκη 4,5ml CH_3CN
 4. Προσθήκη H_2O μέχρι τα 10ml
- ⇒ Παρασκευή διαλύματος test ρετινόλης με συγκέντρωση 1000 ng/ml

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων 13-cis ρετινοϊκού οξέως

1. Ζύγισμα 9,8mg 13-cis ρετινοϊκού οξέως σε ογκομετρική 100ml
 2. Προσθήκη λίγων σταγόνων $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ για να διαλυθεί το οξύ
 3. Προσθήκη CH_3OH ως τα 100ml
- ⇒ Παρασκευή διαλύματος stock 13-cis ρετινοϊκού οξέως με συγκέντρωση 98.000 ng/ml

1. Σε ογκομετρική των 10ml προσθέτουμε 5ml CH_3OH
 2. Προσθήκη 0,1ml από το stock 13-cis ρετινοϊκού οξέως
 3. Προσθήκη 4,5ml CH_3CN
 4. Προσθήκη H_2O μέχρι τα 10ml
- ⇒ Παρασκευή διαλύματος spike 13-cis ρετινοϊκού οξέως με συγκέντρωση 1000 ng/ml

1. Σε ογκομετρική των 10ml προσθέσαμε 5ml CH_3OH
 2. Προσθήκη 0,1ml από το spike 13-cis ρετινοϊκού οξέως
 3. Προσθήκη 4,5ml CH_3CN
 4. Προσθήκη H_2O μέχρι τα 10ml
- ⇒ Παρασκευή διαλύματος test 13-cis ρετινοϊκού οξέως με συγκέντρωση 10 ng/ml

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων 9-cis ρετινοϊκού οξέως
(Το 9-cis ρετινοϊκό οξύ βρίσκεται σε φιαλίδιο)

1. Σε ογκομετρική 50ml προσθέτουμε 25ml CH₃OH
2. Καλός καθαρισμός εξωτερικά του φιαλιδίου και προσθήκη του φιαλιδίου στην ογκομετρική
3. Προσθήκη CH₃OH μέχρι τα 50ml

⇨ Παρασκευή διαλύματος stock 9-cis ρετινοϊκού οξέως με συγκέντρωση 10.000 ng/ml

1. Σε ογκομετρική των 10ml προσθέτουμε 5ml CH₃OH
2. Προσθήκη 1ml από το stock 9-cis ρετινοϊκού οξέως
3. Προσθήκη CH₃OH μέχρι τα 10ml

⇨ Παρασκευή διαλύματος spike 9-cis ρετινοϊκού οξέως με συγκέντρωση 1000 ng/ml

1. Σε ογκομετρική των 10ml προσθέτουμε 5ml CH₃OH
2. Προσθήκη 0,1ml από το spike 9-cis ρετινοϊκού οξέως
3. Προσθήκη CH₃OH μέχρι τα 10ml

⇨ Παρασκευή διαλύματος test 9-cis ρετινοϊκού οξέως με συγκέντρωση 10 ng/ml

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων all trans ρετινοϊκού οξέως

1. Ζύγισμα 14,4 mg all trans ρετινοϊκού οξέως σε ογκομετρική 100ml
2. Προσθήκη λίγων σταγόνων C₂H₅OH για να διαλυθεί το οξύ
3. Προσθήκη CH₃OH ως τα 100ml

⇨ Παρασκευή διαλύματος stock all trans ρετινοϊκού οξέως με συγκέντρωση 144.000 ng/ml

1. Σε ογκομετρική των 10ml προσθέτουμε 5ml CH₃OH
2. Προσθήκη 0,1ml από το stock all trans ρετινοϊκού οξέως
3. Προσθήκη 4,5ml CH₃CN
4. Προσθήκη H₂O μέχρι τα 10ml

⇨ Παρασκευή διαλύματος spike all trans ρετινοϊκού οξέως με συγκέντρωση 1000 ng/ml

1. Σε ογκομετρική των 10ml προσθέσαμε 5ml CH₃OH
2. Προσθήκη 0,1ml από το spike all trans ρετινοϊκού οξέως
3. Προσθήκη 4,5ml CH₃CN
4. Προσθήκη H₂O μέχρι τα 10ml

⇨ Παρασκευή διαλύματος test all trans ρετινοϊκού οξέως με συγκέντρωση 10 ng/ml

Βιβλιογραφία

1. David Zakim, Thoma D. Boyer: Hepatology a textbook of liver disease. Part 7: 215-243 (1996)
2. Heinz Nau and William S. Blaner: Retinoids the biochemical and molecular basis of Vitamin A and retinoid action. Volume 139 (1999)
3. Joseph L. Napoli: Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism and signal transduction. *J. Clinical Immunology and Immunopathology* Vol.80, No. 3, September 1996, pp S52-S62,
4. D. Bellovino,, M. Apreda, S. Gragnoli, M. Massimi b, S. Gaetani: Vitamin A transport: in vitro models for the study of RBP secretion. *J. Molecular Aspects of Medicine*. Vol. 24, Issue 6, December 2003, pp 411-420
5. Hugo L. Monaco: The transthyretin-retinol-binding protein complex. *J. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. Vol. 1482, Issue 1-2, October 2000, p.p. 65-72,
6. Folli C, Calderone V, Ottonello S, Bolchi A, Zanotti G, Stoppini M, Berni R.: Identification, retinoid binding, and x-ray analysis of a human retinol-binding protein. *J. Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 2001, 27;98(7):3710-5.
7. Lorella Franzoni, Christian Lücke, Carlos Pérez, Davide Cavazzini, Martin Rademacher, Christian Ludwig, Alberto Spisni, Gian Luigi Rossi, and Heinz Rüterjans : Structure and Backbone Dynamics of Apo- and Holo-cellular Retinol-binding Protein in Solution. *J. Biol. Chem.*, Vol. 277, Issue 24, June 2002, pp 21983-21997,
8. Julie Bastien and Cécile Rochette-Egly: Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *J. Gene* Vol. 328, March 2004, pp 1-16
9. M. Narita, D. M. Holtzman, A. M. Fagan, M. J. LaDu, L. Yu, X. Han, R. W. Gross, G. Bu and A. L. Schwartz: Cellular Catabolism of Lipid Poor Apolipoprotein E via Cell Surface LDL Receptor-Related Protein. *J. Biochemistry*, Vol.132, Issue 5 743-749 (2002)
10. Mary V. Gamble, Enyuan Shang^c, Roseann Piantedosi Zott, James R. Mertz, Debra J. Wolgemuth, and William S. Blaner: Biochemical properties, tissue expression, and gene structure of a short chain dehydrogenase/ reductase able to catalyze *cis*-retinol oxidation. *J. Lipid Research*, Vol. 40, December 1999, pp2279-2292
11. Tzu-Wen Shih, Tsu-Han Lin, Y. Fulmer Shealy, and Donald L. Hill: Nonenzymatic Isomerization of 9-*cis* retinoid acid catalyzed by sulfhydryl compounds. *J. Drug metabolism and Disposition* Vol.25, No.1 (1997)
12. Jisun Paik, Silke Vogel, Roseann Piantedosis, Angela Sykes, William S. Blaner, and Karen Swisshelm: 9-*cis* retinoids: biosynthesis of 9-*cis* retinoid acid. June 2000, Vol.39, pp 8073-8084
13. Gregg Duester: Involvement of Alcohol Dehydrogenase, Short-Chain Dehydrogenase/Reductase, Aldehyde Dehydrogenase, and Cytochrome P450 in the Control of Retinoid Signaling by Activation of Retinoic Acid Synthesis. *J. New Concepts in Biochemistry*, September 24 (1996), Vol. 35, pp 12222-12227
14. Dan Li and Scott L Friedman: Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: New insights and prospects for therapy. *J. Gastroenterology and Hepatology* (1999), Vol.14, pp 618-633
15. Goodman DS, Huang HS: Biosynthesis of vitamin A with rat intestinal enzymes. *J. Science*, Vol.149, pp 879-880 (1965)
16. Felding P. and Fex G.: Rates of synthesis of plealbumin and retinal binding protein during acute inflammation in the rat. *J. Acta Physiol Scand* 123:477(1985)
17. Wang X-D, Russell R. M., Marini R.P.: Intestinal perfusion of β -carotene in the ferret raises retinoid acid level in portal blood. *J. Biochim. Biophys. Acta*. 1167:159 (1993)
18. Wang X-D, Krinskly N.I., Tang G.: Retinoid acid can produced from excentric cleavage of β -carotene in human intestinal mucosa. *J. Arch. Biochem. Biophys*. 293:298(1992)
19. Peter Jacobs and Lucille Wood : Vitamin A. *J. Deseases-a-Month*, Vol.49, 11:677-684 (Nov.2003)

20. Engene R. Schiff, Michael F. Sorrell and Willis C. Maddrey: Schiff's Diseases of the liver. Part IV: Viral Hepatitis 8th edition
21. Arie J. Zuckerman Howard C. Thomas: Viral Hepatitis. 2nd edition
22. Truant R., Antunovic J, Greenblat J., Prives C., Cromlish J.A.: Direct interaction of hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 element-directed transactivation. *J. Virol*, Vol.69, pp 1851-1859(1995)
23. Feitelson M., Zhu M., Duan L.X., London W.T.: Hepatitis BX antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *J. Oncogene*, Vol.8, pp 1109-1117 (1993)
24. Anthony R. Mawson and Timothy A. Steele: Possible role of retinoids in Hepatitis B virus-associated liver damage. *J. Experimental Biology and Medicine* Vol.226, pp 734-739 (2001)
25. B Human and A Siddiqui: Retinoid X receptor RXRa Binds to and transactivates the Hepatitis B virus enhancer. *J. Proc. Natl. Sci.* Vol.89, pp 9059-9063, Octob.(1992)
26. Akihiro Obora et al : Yoshimune Shiratory, Masataka Okuno, Seiji Adachi, Yukihiko Takano, Rie Matsushima-Nishiwaki, Ichiro Yasuda, Yasuhiro Yamada, Kuniharu Akita, Tetsuro Sano, Jun Shimada, Soichi Kojima, Yukio Okano, Scott L. Friedman and Hisataka Moriwaki : Synergistic induction of apoptosis by acyclic retinoid and interferon- β in human hepatocellular carcinoma cells. *J. Hepatology* Vol.36, pp1115-1123 (November 2002)
27. Marison Ganslamayer, Matthias Ocker, Gabi Kraemer, Steffen Zopf, Eckhart G. Hahn, Detlef Schuppan and Christoph Herold: The combination of tamoxifen and 9-cis retinoid acid exerts overadditive anti-tumoral efficacy in rat hepatocellular carcinoma. *J. Hepatology*, Vol. 40, Issue 6, pp 952-956, (June 2004)
28. Yang-Yen H-F, Zhang X-K, Graupner G., Tzukerman M., Sakamoto B., Karin M., Pfahl M.: Antagonism between retinoic acid receptors and AP-1: implication for tumor promotion and inflammation. *J. New Biol.* Vol. 3, pp 1206-1219 (1991)
29. Chrisari FV, Klopehin K, Mpriyama T: Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *J. Cell*, Vol.59, pp 1145-1156 (1989)
30. Onishi S, Saibara T, Ito K.: Hepatitis B surface antigen specific cytotoxic T lymphocyte activity in hepatitis B virus infection. *J. Gastroenterol Jpn*, Vol.20, pp 330-337, (1985)
31. Hijikata M., Shimizu Y.K., Kato H.: Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus : evidence for immune complexes. *J. Virol*, Vol.67, pp1953-1958, (1993)
32. Smmonds P., Smith D.B.: Investigation of pattern of diversity of hepatitis C virus relation to time of transmission. *J. Viral Hepatitis*, Vol.4, pp 69-74 (1997)
33. Smith D.B., Pathirana S., Davidson F: The origin of Hepatitis C virus genotypes. *J. Gen. Virol.*, Vol. 78, pp 321-328 (1997)
34. Jean-Michel Pawlotsky: Diagnostic tests for hepatitis C. *J. Hepatology*, Vol. 31, pp 71-79 (1999)
35. Detmer J, Lagier R, Flynn J, Zayati C, Kolberg J, Collins M: Accurate quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA from all HCV genotypes by using branched DNA technology. *J. Clin. Microbial*, Vol. 34, pp 901-907 (1996)
36. Bamber M., Murray A.K., Weller I.V.D.: Clinical and histological features of a group of patients with sporadic non-A, non-B hepatitis. *J. Clin. Pathol* 34:1175, (1981)
37. Dienes H.P., Popper H., Arnold W.: Histological observations in human non-A, non-B hepatitis. *J. Hepatology*, 2:552 (1982)
38. Benvegnu L., Fattovich G., Noventa F.: Concurrent hepatitis B and C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis : a prospective study. *J. Cancer* Vol.74, pp 2442-2448 (1994)
39. Liaw Y.F., Tsai S.L., Chang J.J.: Displacement of hepatitis B virus by hepatitis C virus as the cause of continuing chronic hepatitis. *J. Gastroenterology* Vol.106, pp 1048-1053 (1994)
40. Jenkins P.J., Cromie S.L., Roberts S.K. : Chronic hepatitis C, alcohol and hepatic fibrosis. *J. Hepatology* 24:153A (1996)

41. Noda K., Yoshihara H., Suzuki K.: Progression of type C chronic hepatitis to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma its relationship to alcohol, drinking and the age of transfusion. *J. Alcohol Cli Exp Res*, 20[Suppl]:95A-100A, (1996)
42. Sachithanandan S., Kay E., Leader M., Fielding J.F.: The effect of light drinking on HCV liver diseases: the injury is still out. *J. Biomed Pharmacother*, Vol.51, pp 295-297 (1997)
43. Koichi Watashi and Kunitada Shimotohno: The roles of hepatitis C virus proteins in modulation of cellular functions: A novel action mechanism of the HCV core protein on gene regulation by nuclear hormone receptors. *J. Cell Biol*, Vol.23, pp937-943, (Nov 2003)
44. Yadav D, Hertan HI, Schweitzer P, Norkus EP, Pitchumoni Cs: Serum and liver micronutrient antioxidants and serum oxidative stress in patient with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*, Vol 97, pp 2634-2639 (Oct.2002)
45. Panda, S.K. and Jameel, S.:Hepatitis E virus: from epidemiology to molecular biology. *J.Vir Hep Rev* 3, 227-251(1997)
46. Par A., Roth E., Rumi G. Jr., Kovacs Z., Nemes J., Mozsik G.: Oxidative stress and antioxidants defense in alcoholic liver diseases and chronic hepatitis C. *J. Orv Hetil* 23;141(30):1655-1659, (Jun 2000)
47. Tacke M., Kiyosawa K., Stark K.: Detection of antibodies to a putative hepatitis G virus envelope protein. *J. Lancet* 349:318-320(1997)
48. Lou S., Qui X., Tegtmeier G. : Immunoassays to study prevalence of antibody against GB virus in blood donors. *J.Virol Methods*, 68:45-55 (1997)
49. Tacke M., Schmolke S., Schlueter V.: Humoral immune response to the E2 protein of hepatitis G virus is associated with long-term recovery from infection and reveals a high frequency of hepatitis G virus exposure among healthy blood donors. *J. Hepatology* 26:1626-1633 (1997)
50. Thomas D.L., Vlahov D., Alter H.J.: Association of antibody to GB virus C (hepatitis G virus) with viral clearance and protection from reinfection. *J. Infect Dis* 177:539-542 (1998)
51. Pawlowsky J.M, Roudot-Thoraval F., Muerhoff A.S: GB virus C (GBV-C) infection in patient with chronic hepatitis C. Influence on liver diseases and on hepatitis virus behaviour:effect of interferon alfa therapy. *J. Med Virol* 54:26-37 (1998)
52. Marrone A, Shih J.W., Nakatsuji Y.: Serum hepatitis G virus RNA in patient with viral hepatitis. *Am J Gastroenterol* 92:1992-1996 (1997)
53. Colombatto P, Randone A, Civitico G: Hepatitis G virus RNA in the serum of patient with elevated gamma glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase: a specific liver disease? *J. Viral Hepat.* 3:301-306 (1996)
54. Lai J.Y., Qian K., Detmer J. : Effect of interferon-alpha and ribavirin therapy on serum GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV) RNA levels in patient chronically infected with hepatitis C virus and GBV-/HGV. *J. Infect Dis* 176:421-426 (1997)
55. Inoue T, Sakamoto M., Akahane Y., Okamoto H., Miyakawa Y., Mayumi M.: Resonse to interferon of GB virus C and hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis. *Am J Gastroenterology* 92:11981-1985 (1997)
56. Takeya Tsutsumi,Tetsuro Suzuki,1 Takashi Shimoike, Ryosuke Suzuki,Kyoji Moriya,Yoshizumi Shintani,Hajime Fujie,2 Yoshiharu Matsuura, Kazuhiko Koike, and Tatsuo Miyamura: Interaction of Hepatitis C Virus Core Protein With Retinoid X Receptor Modulates ItsTranscriptional Activity. *J. Hepatology* 35:937-946 (2002)
57. He J., Hoffman SL, Hayes CG.: DNA inoculation with a plasmid vector carrying the hepatitis E virus structural protein gene induces immune response in mice. *J. Vaccine* 15:357-362 (1997)
58. Tsarev SA, Tsavera TS, Emerson SU: Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *J. Proc Natl Acad Sci USA* 91:10198-10202 (1994)
59. Newsome P.N., Beldon I., Moussa Y., Delahooke T.E, Pouloupoulos G., Hayes P.C., Plevris N.: Low serum retinal levelas are associated with hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver diseases. *J. Aliment Pharmacol Ther.* 14:1295-1301

60. Dan LI and Scott L Friedman. : Liver fibrogenesis and the role of hepatitis stellate cells:New insights and prospects for therapy. *J. Gastroenterology and Hepatology*, 14,618-633(1999)
61. Rocchi E., Casalgrandi G., Ronzoni A., Rosa C., Cioni G., Marazzi A., Manenti A, Marchini S., Ventura E. : Antioxidant liposoluble vitamins and carotenoids in chronic hepatitis. *European J. Of Internal Medicine*, Vol.12, Issue 2, pp116-121 (April 2001)
62. Felding P. and Fex G.: Rates of synthesis of prealbumin and retinol-binding protein acute inflammation in the rat. *J. Acta Physiol Scand*, Vol.123, Issue 4, pp477-483(Apr 1985)
63. Rocchi E., Gasalgrandi G., Ronzoni A., Rosa M.C., Cioni G., Marazzi A., Maneanti A., Marchini S., Vetura E. : Antioxidant liposoluble vitamins and carotenoids in chronic hepatitis. *European J. Internal Medicine*, Vol.12, 2:116-121 (April 2001)
64. A Catharine Ross : Addressing research question with national survey data-the relation of vitamin A status to infection and inflammation. *Am J Clin Nutr* 72: 1069-10670 (2000)
65. Cavanna A., Giovine G., Tappero R., Torchio M., Avagnina P., Molino G.: Diagnostic value of prealbumin and retinol-binding protein in acute and chronic liver diseases, *Ric Clin Lab*, 1985 Jan-Mar;15(1):71-7.
66. Yasmin M.Y, Aziz B., Nazim M, Madhavan RK: Prealbumin rather than albumin is a more sensitive indicator of acute liver diseases. Department of Chemical Pathology, School of Medical Sciences, University Sains Malaysia, Kubang Kerian, Kelantan
67. Dan Li and Scott L Friedman : Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: New insights and prospects for therapy. *J. Gastroenterology and Hepatology* 14:618-633 (1999)
68. William Marshal: Κλινική Βιοχημεία. Κεφ.5 Ήπαρ 3^η έκδοση
69. Δ.Α. Σπαντίδος : Κλινική Ιολογία : αρχές-κλινικά και μοριακά στοιχεία.Κεφ.5: Ιοί της ηπατίτιδας 1998