

ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΤΟ ΗΠΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΙΑΤΡΕΙΟ
ΚΑΙ ΤΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Δ/ντής: Καθηγητής Γ.Ν. Νταλέκος

**ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ
ΛΙΠΙΔΙΩΝ, DNA ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
ΣΕ ΧΡΟΝΙΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ**

**Ελεάννα Θ. Καφφέ
Βιοχημικός**

**Διδακτορική Διατριβή που υποβλήθηκε στην Ιατρική Σχολή του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

Λάρισα 2010

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Νόμος 5343, άρθρο 202, παράγραφος 2).

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Γεώργιος Νταλέκος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

Ανάργυρος Μουλάς, Καθηγητής Τ.Ε.Ι Λάρισας

Ειρήνη Ρηγοπούλου, Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γεώργιος Νταλέκος , Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ανάργυρος Μουλάς, Καθηγητής Χημείας-Βιοχημείας Τ.Ε.Ι Λάρισας

Ειρήνη Ρηγοπούλου, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Κουρέτας, Καθηγητής Φυσιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Νικόλαος Σακκελαρίδης, Καθηγητής Φαρμακολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γεώργιος Κουκούλης, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κων/νος Μακαρίτσης, Λέκτορας Παθολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Στην Οικογένεια μου...

Πίνακας Περιεχομένων

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	11
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	14
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	18
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	19
I. ΤΟ ΗΠΑΡ.....	20
1.Ανατομία-Φυσιολογία ήπατος-Χοληφόρων.....	20
2.Λειτουργίες ήπατος.....	23
3.Παρακλινικές Μέθοδοι Ελέγχου Ήπατος-Χοληφόρων.....	24
3.1.Βιοχημικές δοκιμασίες.....	24
3.2.Απεικονιστικές δοκιμασίες.....	30
3.3.Άλλες διαγνωστικές δοκιμασίες.....	30
II. ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΗΠΑΤΟΣ.....	31
1.ΙΟΓΕΝΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ.....	31
1.1.Ηπατίτιδα Α.....	33
1.3.Ηπατίτιδα C.....	40
1.4.Ηπατίτιδα D.....	44
2.ΧΡΟΝΙΑ ΙΟΓΕΝΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ.....	45
2.1.ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β.....	45
2.1.1.Αιτιοπαθογένεια νόσου.....	46
2.1.2.Κλινική Εικόνα.....	47
2.1.3.Κλινική εξέλιξη.....	48
2.1.4.Φυσική ιστορία της χρόνιας ηπατίτιδας Β.....	49
2.1.5.Εργαστηριακά ευρήματα.....	53
2.1.6.Θεραπεία και παρακολούθηση ασθενών.....	54
2.2.1.Αιτιοπαθογένεια νόσου.....	58
2.2.2.Διάγνωση-Συμπτώματα.....	59
2.2.3.Εργαστηριακά-Ιστολογικά ευρήματα.....	59
2.2.4.Κλινικές μορφές.....	61
2.2.5.Φυσική εξέλιξη.....	62
2.2.6.Θεραπεία και παρακολούθηση.....	64
3. ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΑ.....	66
3.1.Μεταβολισμός της αιθανόλης.....	67

3.2.Αιτιοπαθογένεια νόσου	68
3.3.Ιστοπαθολογικές μορφές	70
3.3.1 Λιπώδες ήπαρ του αλκοολισμού	71
3.3.2.Αλκοολική ηπατίτιδα.....	72
3.4.Κλινική εικόνα.....	73
3.5.Εργαστηριακά ευρήματα.....	73
3.6.Επιπλοκές	74
3.7.Πρόγνωση.....	75
3.8.Θεραπεία.....	75
4.ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΣΤΕΑΤΟΗΠΑΤΙΤΙΔΑ.....	76
4.1.Αιτιοπαθογένεια νόσου	77
4.2.Ιστολογικά ευρήματα	80
4.3.Κλινική εικόνα και εργαστηριακά ευρήματα.....	81
4.4.Διάγνωση	81
4.5.Θεραπεία και πρόγνωση	82
5.ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΗΠΑΤΟΣ.....	82
5.1.ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ (ΑΗ)	83
5.1.1.Αιτιοπαθογένεια νόσου	84
5.1.2.Εργαστηριακά ευρήματα	85
5.1.3.Ιστολογική εικόνα	90
5.1.4.Ορολογικοί τύποι ΑΗ.....	90
5.1.5.Μορφες κλινικής εκδήλωσης.....	91
5.1.6.Διάγνωση.....	92
5.1.7.Θεραπεία.....	93
5.2.ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ (ΠΧΚ).....	95
5.1.2.Εργαστηριακά ευρήματα	96
5.1.3.Ιστολογικά ευρήματα	99
5.2.4.Κλινικές Εκδηλώσεις	100
5.2.5.Διαφορική διάγνωση	102
5.2.6.Φυσική Ιστορία	102
5.2.7.Θεραπεία.....	103
5.3.ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΤΙΚΗ ΧΟΛΑΓΕΙΤΙΔΑ (ΠΣΧ)	105
5.3.1.Αιτιοπαθογένεια νόσου	105
5.3.2.Εργαστηριακά ευρήματα	106
5.3.3.Ιστολογικά ευρήματα.....	107

5.3.4.Κλινική εικόνα.....	107
5.3.5.Θεραπεία και πρόγνωση.....	108
6. ΚΙΡΡΩΣΗ.....	109
6.1.Παθογένεια και μορφές της κίρρωσης.....	110
6.2.Ταξινόμηση της κίρρωσης.....	112
6.3.Κλινική εικόνα κίρρωσης.....	113
6.4.Εργαστηριακά ευρήματα κίρρωσης.....	115
6.5.Θεραπεία.....	116
6.6.Επιπλοκές.....	116
6.6.1.Πυλαία υπέρταση.....	117
III ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	118
1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ.....	119
1.1.Κατηγορίες.....	119
1.2.Δυναμική της δημιουργίας των ελευθέρων ριζών.....	121
1.3.Αντιδράσεις δημιουργίας ελευθέρων ριζών.....	124
1.4.Τύποι οξυγονούχων ελευθέρων ριζών.....	125
1.5.Τα Μεταλλικά στοιχεία.....	134
1.6.Πηγές ελευθέρων ριζών.....	136
1.6.1.Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών.....	136
1.6.3.Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών.....	144
2. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ.....	152
2.1.Προϊόντα οξειδωτικής βλάβης λιπιδίων.....	152
2.1.1.Τα Ισοπροστάνια.....	154
2.1.2.Μηλονική διαλδεϋδη.....	156
2.1.3.4-ύδροξυνοενάλη.....	157
2.2.Προϊόντα βλάβης πρωτεϊνών.....	159
2.2.1.3-Νιτροτυροσίνη.....	160
2.2.2.Πρωτεϊνικά καρβονύλια.....	161
2.3.Προϊόντα οξειδωτικής βλάβης του DNA.....	162
2.3.1.8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνη.....	163
3. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ.....	165
3.1.Ορισμός και χαρακτηριστικά.....	166
3.2.Ενζυμικοί παράγοντες.....	167
3.3.Μη ενζυμικοί παράγοντες.....	172
4.ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.....	188

4.1.Επίδραση στο κύτταρο	188
4.2.Επίδραση στον οργανισμό	191
4.3.Οξειδωτικό στρες και ηπατική βλάβη	192
4.4.Βιβλιογραφική ανασκόπηση της εμπλοκής του οξειδωτικού στρες στα νοσήματα του ήπατος...	197
IV. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	210
1.Ασθενείς.....	210
2.Μέθοδοι.....	223
2.1.Φασματοφωτομετρικές τεχνικές.....	223
2.2.Ενζυμικές μέθοδοι	228
2.3.Ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί	231
2.4.Χρωματογραφία	233
3.Ανάλυση δεικτών οξειδωτικού στρες.....	237
3.1.Κατεργασία δειγμάτων	238
3.2.Μέθοδοι ανάλυσης δεικτών οξειδωτικού στρες	240
3.2.1.Γλουταθειόνη.....	240
3.2.2.Αναγωγή της γλουταθειόνης.....	244
3.2.3.Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης.....	246
3.2.4.Κατάλαση	249
3.2.5.Υπεροξειδική δισμουτάση	251
3.2.6.Μυελοϋπεροξειδάση	253
3.2.7.Πρωτεϊνικά Καρβονύλια	256
3.2.8.3-Νιτροτυροσίνη	258
3.2.9.8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνη	262
3.2.10.Αλδεϋδες	269
3.2.11.Ισοπροστάνια	274
IV ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	280
1.Επίπεδα προϊόντων οξειδωτικής βλάβης στα νοσήματα του ήπατος και στους μάρτυρες.....	280
2.Επίπεδα αντιοξειδωτικών παραγόντων στα νοσήματα του ήπατος και στους μάρτυρες.	292
3.Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τα κλινικοεργαστηριακά δεδομένα.....	301
4.Δείκτες οξειδωτικού στρες στις Ιογενείς ηπατίτιδες.	321
5.Δείκτες οξειδωτικού στρες στην Ηπατίτιδα C.	3366
6.Δείκτες οξειδωτικού στρες στην Ηπατίτιδα B.	348
7.Δείκτες οξειδωτικού στρες στην Αλκοολική ηπατοπάθεια.....	352
8.Δείκτες οξειδωτικού στρες στη Μη Αλκοολική Στεατοηπατίτιδα.....	356
9.Δείκτες οξειδωτικού στρες στην Αυτοάνοση Ηπατίτιδα	361
10.Επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες στα αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα.....	371

V.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	382
VI.ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	411
VII.SYMMARY.....	412
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	413
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	487
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	488

Βιογραφικό Σημείωμα

Κακφέ Ελεάννα

Ημερομηνία Γέννησης	12/2/1982
Σπουδές	<p>2006-2010: Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στην Ιατρική με θέμα: << Δείκτες οξειδωτικού στρες πρωτεϊνών, λιπιδίων και DNA στις χρόνιες ασθένειες του ήπατος>>.</p> <p>2000- 2004: Πτυχίο Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Βαθμός [7,77]. Η διπλωματική διεξήχθη στο τμήμα Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Algarve της Πορτογαλίας. Θέμα διπλωματικής: Έκφραση της Ελαφριάς Αλυσίδας 2 της μωσίνης στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του τελεόστεου ψαριού <i>Sparus Aurata</i> (Τσιπούρα). Χρήση βασικών ιστολογικών μεθόδων, μεθόδων μοριακής βιολογίας και υβριδοποίησης <i>in situ</i>.</p> <p>1999-2000: Εισαγωγή στη Φαρμακευτική Θεσσαλονίκης. Παρακολούθηση των μαθημάτων του πρώτου έτους.</p>
Επιμόρφωση ή Ειδικές γνώσεις	<ul style="list-style-type: none">* Γνώση χειρισμού Η/Υ, internet, φύλλων εργασίας excel, word, PowerPoint. Πτυχίο ECDL.* Γνώση Αγγλικών: Πτυχία First Certificate of Cambridge & Advanced Communication in English.* Εμπειρία στη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και των ανιχνευτών της (Ηλεκτροχημικός ανιχνευτής, φασματογράφος μάζας, φθορισμομετρικός ανιχνευτής). Εμπειρία στη δημιουργία χρωματογραφικών μεθόδων ανάλυσης. Γνώση ενζυμικών, ανοσοενζυμικών μεθόδων, ιστολογικών μεθόδων και μεθόδων μοριακής βιολογίας. Χρήση αυτόματων βιοχημικών και αιματολογικών αναλυτών.
Επαγγελματική Εμπειρία	<p>2009-2010: Εργασία ως ερευνήτρια στο ΚΤΕ (Κέντρο Τεχνολογικής Έρευνας).</p> <p>2006-2009: Τριετής απασχόληση ως εργαστηριακή συνεργάτιδα στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής.</p> <p>2005: Εξάμηνη εργασία στο ιδιωτικό διαγνωστικό εργαστήριο ΒΙΟΑΝΑΛΥΣΗ στη Λάρισα.</p> <p>2004-2006: Διετής εργασία στο ερευνητικό πρόγραμμα Αρχιμήδης.</p> <p>2003: Δίμηνη πρακτική άσκηση στο αιματολογικό τμήμα του Εργαστηρίου Βιοπαθολογίας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.</p>

**Συμμετοχή σε
Ανακοινώσεις
Συνεδρίων**

- × 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Στρες. “Μέθοδος προσδιορισμού ισομερών του ρετινοϊκού οξέος και ρετινόλης στον ορό, με HPLC και ηλεκτροχημική ανίχνευση”. Λάρισα, Οκτώβριος 2004.
- × Oxidants and Antioxidants in Biology. “Simultaneous determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 3-nitrotyrosine in urine by HPLC”. Alba, Italy. September 2005.
- × Nutrition oxygen biology and medicine. “Serum retinol and retinoic acid levels in patients with chronic viral hepatitis”. Paris, March 2005.
- × International Interdisciplinary Conference on Vitamins Coenzymes, and Biofactors. “Serum retinol and retinol binding protein in patients with chronic viral hepatitis”. Awaji, Japan. November 2005.
- × 13th European Meeting on Fat Soluble Vitamins. “Retinol and retinoic acid isomers concentrations in follicular fluid of cows”. Jena, Germany, 2006.
- × 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Στρες. “Απέκκριση της 8-υδροξυ-δεοξυγουανοσίνης στα ούρα σε σχέση με την ηλικία, το φύλο και το κάπνισμα”. Καρδαμύλη, Σεπτέμβριος 2006.
- × Free radical summer school. “Rapid determination of 8-OHdG in urine by HPLC”. Σπέτσες Οκτώβριος 2006.
- × 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας. “Ταχύς προσδιορισμός της 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνης στα ούρα με HPLC και ηλεκτροχημική ανίχνευση”. Αθήνα, Νοέμβριος 2006.
- × 4th International Conference on oxidative stress in skin medicine and biology. “Exposure to sunlight: risk of skin cancer protection by vitamin D synthesis”. Άνδρος, Σεπτέμβριος 2008.
- × 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Στρες. “Αντιοξειδωτικά ένζυμα και προϊόντα οξειδωτικής βλάβης σε υγιή πληθυσμό. Συσχέτιση με την ηλικία, φύλλο, κάπνισμα”. Πράμαντα Ιωαννίνων, Σεπτέμβριος 2008.
- × 14th European Meeting on Fat-soluble Vitamins. “Production of Yogurt Fortified with Vitamin D”. Potsdam, Germany. Οκτώβριος 2009.
- × 14th Workshop on Vitamin D. “Production and Bioavailability of Yogurt Fortified with Vitamin D”. Brugge, Belgium. Οκτώβριος 2009.
- × 1st International Vitamin conference. “Design, study and production of vitamin D₃ fortified yogurt”. Κοπενχάγη, Μαΐος 2010.

Συνέδρια

52^ο , 53^ο ,54^ο , 55^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας.

First international symposium on "Integrated Research Approach for clinical Applications and Practices" 27/02/2003 - 2/03/2003.

26^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών 27/05/2004.

4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού στρες 7/10/2004-10/10/2004.

"Food & Environmental Safety Seminar".30/11/2006.

Επιστημονική εκδήλωση <<Χρόνιες ιογενείς Ηπατοπάθειες B & C>> 29/3/2007.

Ενημερωτικό-Επιστημονικό Σεμινάριο Θερμικής Ανάλυσης. 27/02/2008.

Ενημερωτικό-Επιστημονικό Σεμινάριο Υγρής Χρωματογραφίας. 8/04/2009.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μεγάλη σημασία των ελευθέρων ριζών στη φυσιολογική λειτουργία των βιολογικών συστημάτων προτάθηκε πριν από 50 χρόνια με την υπόθεση που ανέπτυξε ο D.Harman για το ρόλο των ριζών στη γήρανση των έμβιων όντων. Η υπόθεση αυτή όμως πήρε μια νέα διάσταση, με την ανακάλυψη το 1969 του ενζυμικού ρόλου της υπεροξειδικής δισμουτάσης και του υπεροξειδικού ανιόντος στους βιολογικούς οργανισμούς. Οι ελεύθερες ρίζες και οι διάφορες οξυγονούχες και αζωτούχες δραστικές ενώσεις συμμετέχουν ενεργά σε διάφορες ενζυμικές και μη ενζυμικές διεργασίες, στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης καθώς και στη μεταβίβαση σημάτων μέσω της οξειδοαναγωγικής χημείας, που καλείται οξειδοαναγωγική μεταβίβαση σημάτων (Harman 1956).

Οι βιολογικοί οργανισμοί χρειάζονται τις ελεύθερες ρίζες για φυσιολογικές λειτουργίες (Allen 2000), αλλά από την άλλη χρειάζονται και τους αντιοξειδωτικούς προστατευτικούς μηχανισμούς για την εξισορρόπηση της κατάστασης. Όταν οι ελεύθερες ρίζες παράγονται σε υπέρμετρο βαθμό και υπερβαίνουν την ικανότητα του οργανισμού να τις αντιμετωπίσει, τότε προκαλούν διάφορες βλάβες σε βιομόρια, ασθένειες και παθολογικές καταστάσεις (Cadenas 2002). Έχουν αναφερθεί περισσότερες από 100 παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπου οι αντιδράσεις ελευθέρων ριζών λαμβάνουν χώρα (Halliwell 1999).

Οι πηγές ελευθέρων ριζών στο ήπαρ είναι τα μιτοχόνδρια, τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, τα ουδετερόφιλα, τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και η NADPH οξειδάση. Οι μελέτες επιβεβαιώνουν ότι το ήπαρ φυσιολογικά εκτίθεται συνεχώς στο οξειδωτικό στρες, καθώς μεταβολίζει τα αρωματικά συστατικά, τα καρκινογόνα, τα φάρμακα, καταλήγοντας έτσι στη δημιουργία ελευθέρων ριζών (Jones 1998A). Λόγω αυτού περιέχει και τις μεγαλύτερες ποσότητες αντιοξειδωτικών σε σχέση με τα υπόλοιπα μέρη του σώματος. Η χημική τοξικότητα στο ήπαρ συμβαίνει όταν μειώνονται τα αντιοξειδωτικά στον ηπατικό ιστό και όταν αυξάνονται παραπάνω από το φυσιολογικό οι ελεύθερες ρίζες. Βλέπουμε λοιπόν πως για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες πρέπει να αναλύεται τόσο η αντιοξειδωτική άμυνα όσο και οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (ΔΜΟ/ΔΜΑ). Οι ΔΜΟ/ΔΜΑ έχουν πολύ μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, για αυτό στην

εκτίμηση του οξειδωτικού στρες μετρώνται τα προϊόντα αντίδρασης τους με τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA (Halliwell 1999).

Η ηπατική βλάβη ποικίλει από οξεία ηπατίτιδα σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο μέσω απόπτωσης, νέκρωσης, φλεγμονής, ανοσιακής απάντησης, ίνωσης, ισχαιμίας, τροποποιημένης γονιδιακής έκφρασης και αναγέννησης. Όλες οι διεργασίες εμπριέχουν τα ηπατοκύτταρα, τα κύτταρα Kupffer, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα Ito καθώς και την παραγωγή των ελευθέρων ριζών. Οι δραστικές μορφές αζώτου και οξυγόνου εμπλέκονται στη μεταγραφή και ενεργοποίηση ενός μεγάλου αριθμού κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων, που με τη σειρά τους συνεισφέρουν στην περαιτέρω παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου (Carmela 2003). Μέχρι τώρα έχει μελετηθεί το οξειδωτικό στρες στην οξεία και χρόνια Ηπατίτιδα C, στην Αλκοολική και στη Μη Αλκοολική Στεατοηπατίτιδα. Ελάχιστες μελέτες έχουν γίνει στα υπόλοιπα χρόνια νοσήματα του ήπατος. Επίσης, στα νοσήματα που έχουν ήδη μελετηθεί πολύ λίγες μελέτες ανέλυσαν ταυτόχρονα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης πρωτεϊνών, λιπιδίων και DNA με την κύρια γραμμή αντιοξειδωτικής άμυνας και ελάχιστες κλινικές μελέτες συσχέτισαν τους δείκτες οξειδωτικού στρες με τα ιστοπαθολογοανατομικά ευρήματα και τη θεραπεία.

Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκαν οι βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες στα παρακάτω χρόνια νοσήματα του ήπατος: α) Αυτοάνοση ηπατίτιδα, β) Αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα (πρωτοπαθής χολική κίρρωση, πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα), γ) Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, δ) Αλκοολική Ηπατοπάθεια, ε) Ηπατίτιδα Β και ζ) Ηπατίτιδα C. Ο σκοπός ήταν, να ελεγχθεί ο βαθμός οξειδωτικής βλάβης στην κάθε νόσο ξεχωριστά και να ελεγχθεί το κατά πόσο επηρεάζει η οξειδωτική βλάβη την πρόοδο των χρόνιων ηπατικών νοσημάτων.

Πιο αναλυτικά στο γενικό μέρος αναλύονται α) το ήπαρ και οι λειτουργίες του, β) οι ιογενείς ηπατίτιδες, γ) οι στεατοηπατίτιδες (αλκοολική και μη αλκοολική), δ) τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (αυτοάνοση ηπατίτιδα, πρωτοπαθής χολική κίρρωση, πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα), ε) η βιοχημεία των ελευθέρων ριζών, ζ) οι πηγές παραγωγής των ελευθέρων ριζών, η) η επίδραση των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά βιομόρια, θ) η αντιοξειδωτική άμυνα, ι) η εμπλοκή του οξειδωτικού στρες στην ηπατική βλάβη και γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση της εμπλοκής του οξειδωτικού στρες στα χρόνια ηπατικά νοσήματα. Επίσης, στην κάθε χρόνια

ηπατοπάθεια αναλύονται τα επιδημιολογικά δεδομένα, η γενετική οργάνωση των ιών στις ιογενείς ηπατίτιδες, η αιτιοπαθογένεια, οι κλινικές εκδηλώσεις, τα εργαστηριακά και ιστολογικά ευρήματα καθώς και οι θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Στο ειδικό μέρος αναλύονται οι ομάδες των ασθενών με τα χαρακτηριστικά τους καθώς και οι μέθοδοι μέτρησης των βιοδείκτων της οξειδωτικής βλάβης και της αντιοξειδωτικής άμυνας. Αυτοί οι βιοδείκτες συσχετίστηκαν με το στάδιο της κάθε νόσου, με ιστολογικά και βιοχημικά ευρήματα, με τη θεραπεία και με άλλα κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Τα παραπάνω αναμένεται να συμβάλλουν στην κατανόηση του μηχανισμού, με τον οποίο το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια και στην εξέλιξη των χρόνιων ηπατικών νοσημάτων. Η εμπλοκή του στην επιδείνωση των νοσημάτων του ήπατος μπορεί να στρέψει τις στρατηγικές θεραπείας προς την κατεύθυνση της αναστολής της δημιουργίας του οξειδωτικού στρες.

Το πειραματικό κομμάτι της παρούσης διατριβής διεξήχθη στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τ.Ζ.Π του Τ.Ε.Ι Λάρισας με υπεύθυνο εργαστηρίου τον Καθηγητή κ.Μουλά Ανάργυρο. Η συλλογή των δειγμάτων και των κλινικοεργαστηριακών δεδομένων των ασθενών διεξήχθη στο Ηπατολογικό Ιατρείο της Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Θα ήθελα να αναγνωρίσω τη βοήθεια όλων αυτών που είχαν σημαντική συνεισφορά στην εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής. Ιδιαίτερα ευγνώμων είμαι στον Καθηγητή κ. Νταλέκο Γεώργιο, κατά κύριο λόγο για την ανάθεση του θέματος της παρούσης διατριβής καθώς επίσης και για τη συμμετοχή του στην οργάνωση και στην ολοκλήρωση της. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την κριτική ανάγνωση και διόρθωση του συγγράμματος. Ιδιαίτερα ευγνώμων είμαι επίσης στον Καθηγητή κ.Μουλά Ανάργυρο που με δέχτηκε στο εργαστήριο του για την διεξαγωγή των πειραμάτων, με μύησε στη σημασία της εργαστηριακής έρευνας και μου δίδαξε την τεχνογνωσία του. Η αμέριστη υποστήριξη του και η βοήθεια του τόσο σε θεωρητικό όσο και σε εργαστηριακό επίπεδο καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής ήταν σημαντική και πολύτιμη για τη διετελεσή της. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω την υποστήριξη του σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα.

Ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ρηγοπούλου Ειρήνη για την κριτική ανάγνωση του συγγράμματος, τις διορθώσεις που υποσημείωσε, τη σημαντική βοήθεια της στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και στη συλλογή των κλινικοεργαστηριακών δεδομένων των ασθενών. Η βοήθεια της στη διόρθωση της διατριβής ήταν πολύτιμη και καθοριστική για το αποτέλεσμα.

Ευχαριστώ τους ιατρούς του Ηπατολογικού Ιατρείου κ. Ρηγοπούλου Ειρήνη, κ. Ζάχου Καλλιόπη, κ Παπαδάμου Γεωργία και ιδιαίτερα τον επισκέπτη υγείας κ. Γαλάνη Κώστα για τη βοήθεια τους στη συλλογή των δειγμάτων των ασθενών και την αυστηρή τήρηση του πρωτοκόλου.

Ευχαριστώ τον Ακτινοφυσικό κ. Βαλάκη Στράτο για τη βοήθεια του στην εφαρμογή των κατάλληλων στατιστικών μεθόδων επεξεργασίας των δεδομένων της παρούσης μελέτης.

Τελειώνοντας, ευχαριστώ την οικογένεια μου που με στήριξε ώστε να πετύχω τους στόχους μου.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- AH:** Αυτοάνοση ηπατίτιδα
- AMH:** Αντίστροφη μεταφορά ηλεκτρονίων
- ANH:** Αλκοολική ηπατοπάθεια
- αντι-ASGP-R:** Αντισώματα έναντι Υποδοχέα της Ασιαλογλυκοπρωτεΐνης
- αντι-LKM-1:** Αντισώματα έναντι μικροσωμίων, ήπατος νεφρών
- αντι-LKM-1:** Αντισώματα έναντι μικροσωμίων, ήπατος νεφρών
- αντι-SLA/LP:** Αντισώματα κατά Διαλυτών Αντιγόνων Ήπατος/Παγκρέατος
- ΔMO:** Δραστικές μορφές οξυγόνου
- ΔMA:** Δραστικές μορφές αζώτου
- ΕΑΦ:** Έμμεσος ανοσοφθορισμός
- ΚΥΤΡ2Ε1:** Κυτοχρώμα P450 2E1
- ΜΑΛΔ:** Μη αλκοολική λιπώδης διήθηση
- ΜΑΣΗ:** Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα
- ΠΣΧ:** Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα
- ΠΧΚ:** Πρωτοπαθή χολική κίρρωση
- ΣΕΛ:** Συστηματικός ερυθματώδης λύκος
- 3-NT:** 3-Νιτροτυροσίνη
- 4-HNE:** 4-Υδροξυνοεννάλη
- 8-OHdG:** 8-Υδροξυ-δεοξυγουανোসίνη
- γ-GT:** γ-γλουταμική τρανσπεπτιδάση
- aCL:** Αντισώματα έναντι Καρδιολιπίνης
- ADH:** Αλκοολική δεϋδρογονάση
- ALP:** Αλκαλική φωσφατάση
- ALT:** Τρανσαμινάση της αλανίνης
- ANA:** Αντιπυρηνικά αντισώματα
- ANCA:** Αντισώματα κατά Κυτταροπλάσματος των Ουδετερόφιλων

AST: Τρανσαμινάση του ασπαραγινικού

CAT: Καταλάση

dTF: αποσιαλωμένη τρανσφερίνη

GPx: Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

GR: Αναγωγάση της γλουταθειόνης

GSH: Ανηγγμένη γλουταθειόνη

GSSG: Οξειδωμένη γλουταθειόνη

HBV: Ηπατίτιδα Β

HCV: Ηπατίτιδα C

IL: Ιντερλευκίνη

INF: Ιντερφερόνη

IR: Insulin Resistanse (Αντίσταση στην ινσουλίνη)

LDH: Γαλακτική δεϋδρογονάση

MAA: MalonaldeydeAcetaldeydeAdducts

MDA: Μηλονική διαλδεϋδη

MPO: Μυελοϋπεροξειδάση

NADH: Νικοτινάμιδο αδένινο δινουκλεοτιδίο

NAFLD: Μη αλκοολική νόσος του λιπώδους ήπατος

NASH: Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα

NFkB: Πυρηνικός παράγοντας κάππα

NK: Κύτταρα φυσικοί φονείς

NOS: Συνθάση του NO

Peg-INF-α: Πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη

RA: Ρευματοειδής αρθρίτιδα

RF: Ρευματοειδής παράγοντας

SAMe: S-Αδενοσυλική μεθειονίνη

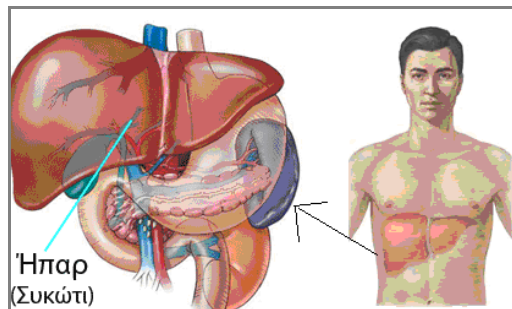
SMA: Αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών και

SOD: Υπεροξειδική δισμουτάση, **TGF-a:** Παράγοντας νέκρωσης όγκων-α

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ανατομία-Φυσιολογία ήπατος-Χοληφόρων

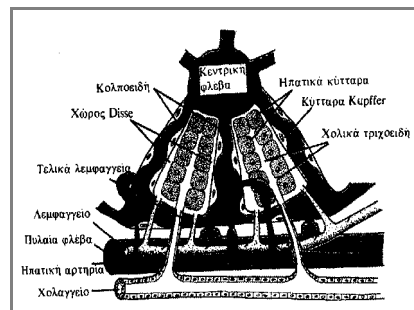
Το **ήπαρ** είναι το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος. Βρίσκεται στο δεξιό και άνω μέρος της κοιλιάς που ονομάζεται δεξιό υποχόνδριο και επεκτείνεται και στο κεντρικό και άνω μέρος της κοιλιάς που ονομάζεται επιγάστριο (Εικόνα 1). Μεγάλο τμήμα του ήπατος καλύπτεται από το δεξιό πλευρικό τόξο. Μεταξύ του ήπατος και της κοιλότητας του θώρακα μεσολαβεί το διάφραγμα, ο κυριότερος αναπνευστικός μυς. Με τη σύσπαση του διαφράγματος σε κάθε αναπνευστική κίνηση το ήπαρ κατέρχεται και αποκαλύπτεται το μεγαλύτερο μέρος του κάτω από το δεξιό πλευρικό τόξο.



Εικόνα 1: Ανατομική θέση ήπατος στον οργανισμό.

Στο ήπαρ διακρίνουμε έναν μεγάλο **δεξιό λοβό** και έναν μικρότερο **αριστερό λοβό**. Διακρίνονται και δύο μικρότεροι λοβοί, ο **τετράπλευρος** και ο **κερκοφόρος**, οι οποίοι ανατομικά ανήκουν στο δεξιό λοβό, αλλά λειτουργικά αιματώνονται από τους αριστερούς κλάδους της ηπατικής αρτηρίας και της πυλαίας φλέβας. Μεταξύ του κερκοφόρου και του τετραπλεύρου λοβού διακρίνεται περιοχή που υποδέχεται την ηπατική αρτηρία, την πυλαία φλέβα και τα νεύρα του ήπατος. Η περιοχή αυτή καλείται **πύλη του ήπατος**. Εξωτερικά το ήπαρ περιβάλλεται από ινώδη κάψα. Το ήπαρ έχει δυο προσαγωγούς αιμοφόρους οδούς (πυλαία φλέβα και ηπατική αρτηρία). Η απαγωγός οδός σχηματίζεται από της ηπατικές φλέβες. Η ηπατική αρτηρία αποτελεί κλάδο της κοιλιακής αρτηρίας ενώ η πυλαία φλέβα σχηματίζεται κύρια από τις παρακάτω φλέβες: σπληνική, άνω και κάτω μεσεντέριο, βραχείες γαστρικές, την αριστερή γαστρική και την ομφαλική φλέβα.

Η βασική λειτουργική μονάδα του ήπατος είναι το ηπατικό λοβίο που αποτελεί κυλινδρική κατασκευή μήκους λίγων χιλιοστωμέτρων και με διάμετρο 0,8 ως 2 χιλιοστόμετρα (mm). Στο ήπαρ του ανθρώπου περιέχονται 50.000 ως 100.000 ηπατικά λοβία. Το ηπατικό λοβίο δομείται γύρω από μια κεντρική φλέβα, η οποία αποχετεύεται προς τις ηπατικές φλέβες και στη συνέχεια προς την κάτω κοίλη φλέβα. Το ίδιο το ηπατικό λοβίο αποτελείται κυρίως από πολλά πετάλια από ηπατοκύτταρα τα οποία διατάσσονται ακτινοειδώς γύρω από την κεντρική φλέβα, σαν σε ακτίνες σε τροχό. Το κάθε πετάλιο έχει πάχος ένα έως δύο κύτταρα ανάμεσα δε στα γειτονικά κύτταρα υπάρχουν τα χοληφόρα τριχοειδή, τα οποία εκβάλουν στα χολαγγεία που βρίσκονται στα ινώδη διαφράγματα μεταξύ των ηπατικών λοβίων (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Μορφολογία ήπατος.

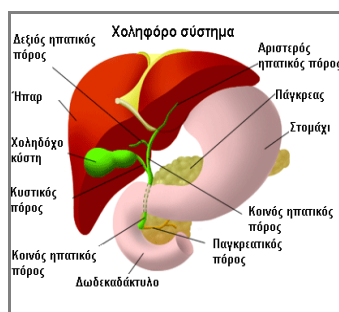
Επίσης, στα διαφράγματα υπάρχουν μικρά πυλαία φλεβίδια, η αιμάτωση των οποίων προέρχεται κατά κύριο λόγο από τις φλέβες της γαστρεντερικής οδού μέσα από την πυλαία φλέβα. Από αυτά τα φλεβίδια το αίμα φέρεται σε επίπεδα, διακλαδιζόμενα ηπατικά κολποειδή, τα οποία βρίσκονται ανάμεσα στα ηπατικά πετάλια και από εκεί προς την κεντρική φλέβα. Με αυτό τον τρόπο τα ηπατικά κύτταρα εκτίθενται συνεχώς στο φλεβικό αίμα της πυλαίας (Guyton 1998).

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

Τα φλεβικά κολποειδή επενδύονται από δύο τύπους κυττάρων: α) Τα τυπικά ενδοθηλιακά κύτταρα και β) τα μεγάλα κύτταρα Kupffer τα οποία είναι μακροφάγα των ιστών και έχουν την ικανότητα της φαγοκυττάρωσης μικροβίων και άλλων ξένων ουσιών που κυκλοφορούν στο αίμα. Η ενδοθηλιακή αυτή επένδυση των φλεβικών κολποειδών εμφανίζει εξαιρετικά μεγάλους πόρους,

μερικοί από τους οποίους έχουν διάμετρο σχεδόν ενός μικρού (μm). Κάτω από αυτή την επένδυση μεταξύ των ενδοθηλιακών και των ηπατικών κυττάρων υπάρχει ένας πολύ στενός χώρος που ονομάζεται χώρος του Disse. Με τη σειρά τους, τα εκατομμύρια των χώρων Disse συνδέονται με τα λεμφαγγεία των μεσολόβιων διαφραγμάτων. Κατά συνέπεια, η περίσσεια υγρού από τα διαστήματα αυτά απομακρύνεται με τα λεμφαγγεία. Εξαιτίας της παρουσίας των μεγάλων πόρων στο ενδοθήλιο, ουσίες από το πλάσμα διακινούνται ελεύθερα προς το χώρο του Disse. Ακόμα και μεγάλο μέρος των πρωτεϊνών του πλάσματος διαχέονται προς αυτό το χώρο (Guyton 1998).

Η **χοληδόχος κύστη**, η οποία φιλοξενείται στην κάτω επιφάνεια του ήπατος, είναι όργανο σε σχήμα αχλαδιού, το οποίο ανατομικά χωρίζεται σε πυθμένα, σώμα και αυχένα. Συνέχεια του αυχένα αποτελεί ο **κυστικός πόρος**, ο οποίος ενώνεται με τον κοινό ηπατικό πόρο, για να σχηματιστεί ο **χοληδόχος πόρος**. Αυτός εκβάλλει στον αυλό του δωδεκαδακτύλου σε μια περιοχή που χαρακτηρίζεται ως **λήκυθος του Vater**. Στο κατώτερο άκρο του χοληδόχου πόρου οι κυκλωτερείς μυϊκές ίνες του τοιχώματος του σχηματίζουν το **σφιγκτήρα του Oddi**. Η απελευθέρωση της χολής στον εντερικό αυλό προϋποθέτει τη χάλαση του σφιγκτήρα του Oddi. Στη λήκυθο του Vater εκβάλλει και ο μείζων παγκρεατικός πόρος (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Ανατομία ήπατος, χοληφόρων, παγκρέατος.

2. Λειτουργίες ήπατος

Το ήπαρ είναι ζωτικής σπουδαιότητας στο ενδιάμεσο μεταβολισμό και στην αποτοξίνωση και απομάκρυνση των τοξικών ουσιών. Η μεταβολική δραστηριότητα του ήπατος επιτελείται από παρεγχυματώδη κύτταρα, τα οποία αποτελούν το 80% του όγκου του οργάνου. Οι κύριες λειτουργίες του ήπατος είναι οι παρακάτω:

1.Μεταβολισμός υδατανθράκων: Το ήπαρ αποτελεί θέση εναποθήκευσης γλυκογόνου και την κύρια πηγή γλυκόζης του πλάσματος (σύνθεση και αποικοδόμηση γλυκογόνου).

2.Μεταβολισμός λίπους: Το ήπαρ κατέχει κεντρική θέση στην επεξεργασία των διαιτητικών λιπών προς λιποπρωτεΐνες, οι οποίες εισέρχονται στο αίμα για τον περιφερικό μεταβολισμό. Επίσης συντελεί στη σύνθεση λιπαρών οξέων, στη σύνθεση και απέκκριση της χοληστερόλης, στην κετογένεση, στη σύνθεση χολικών οξέων και στην 25-υδροξυλίωση της βιταμίνης D.

3.Μεταβολισμός πρωτεϊνών: Το ήπαρ αποτελεί τη μείζονα θέση σύνθεσης πρωτεϊνών (και ιδίως παραγόντων πήξης καθώς και πρωτεϊνών του πλάσματος εκτός των ανοσοσφαιρινών) και αποικοδόμησης των πρωτεϊνών, με την αναπαραγωγή της ουρίας.

4.Μεταβολισμός ορμονών: Το ήπαρ συμβάλλει στο μεταβολισμό και στην έκκριση των στεροειδών ορμονών καθώς και στο μεταβολισμό των πολυπεπτιδικών ορμονών.

5.Σύνθεση χολής: Καθημερινά το ήπαρ εκκρίνει 500-600 ml υγρού με σχεδόν ουδέτερο pH (χολή) που περιέχει 85-90% νερό καθώς και ηλεκτρολύτες, χοληστερόλη, φωσφολιπίδια, χολικά άλατα, χολερυθρίνη και μικρές ποσότητες πρωτεϊνών. Παρά την απουσία ενζύμων, η χολή είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική πέψη αφού χωρίς αυτήν δεν γίνεται η γαλακτωματοποίηση του λίπους αλλά ούτε και η απορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών (A,D,E,K).

6.Αποθήκευση: Στο ήπαρ αποθηκεύονται γλυκογόνο, σίδηρος, χαλκός και λιποδιαλυτές βιταμίνες, οι οποίες μπορεί να αυξηθούν υπερβολικά σε περιπτώσεις νόσου.

7.Αποτοξίνωση: Στο ήπαρ αποτοξινώνονται πολλοί μεταβολίτες, ιδίως νιτρώδη στοιχεία, ορμόνες και φάρμακα (Marshall 1998).

3. Παρακλινικές Μέθοδοι Ελέγχου Ήπατος-Χοληφόρων

3.1. Βιοχημικές δοκιμασίες

A. Δοκιμασίες Ελέγχου Ικανότητας Μεταφοράς Οργανικών Ανιόντων

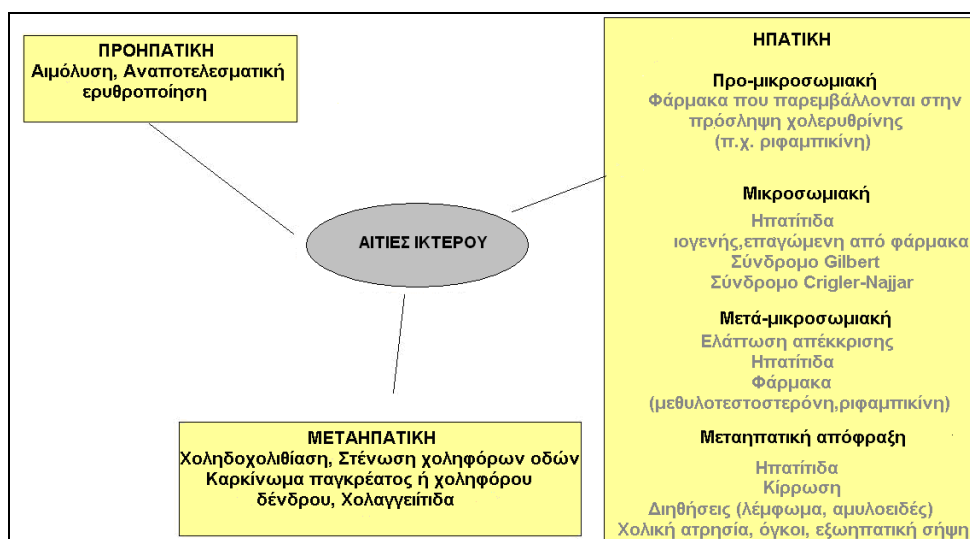
Αφορούν σχεδόν αποκλειστικά στη καθημερινή πρακτική τη μέτρηση της χολερυθρίνης. Η χολερυθρίνη προέρχεται κυρίως από την αίμη του μορίου της αιμοσφαιρίνης και απελευθερώνεται όταν τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται από τη κυκλοφορία μέσω του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Ο σίδηρος στην αίμη επαναχρησιμοποιείται, αλλά ο τετραπυρρολικός δακτύλιος αποικοδομείται σε χολερυθρίνη. Άλλες πηγές χολερυθρίνης περιλαμβάνουν τη μυοσφαιρίνη και τα κυτοχρώματα. Η μη συζευγμένη χολερυθρίνη δεν είναι υδατοδιαλυτή και μεταφέρεται στο κυκλοφορούν αίμα προσδεμένη στην αλβουμίνη. Στο ήπαρ η αλβουμίνη προσλαμβάνεται από τα ηπατοκύτταρα με μια διαδικασία που περιλαμβάνει ειδικές μεταφορικές πρωτεΐνες. Η χολερυθρίνη κατόπιν μεταφέρεται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου υφίσταται σύζευξη κυρίως με το γλυκουρονικό οξύ για να σχηματίσει διγλυκουρονίδιο. Η διαδικασία αυτή καταλύεται από το ένζυμο χολερύθρινο-UDP-γλυκουρύνυλο-τρανσφεράση.

Η συζευγμένη χολερυθρίνη είναι υδατοδιαλυτή και εκκρίνεται στα χοληφόρα τριχοειδή και τελικά φθάνει στο λεπτό έντερο, διαμέσου των πόρων του χοληφόρου συστήματος. Η έκκριση στα χοληφόρα τριχοειδή είναι το καθοριστικό στάδιο στο μεταβολισμό της χολερυθρίνης. Στο έντερο, η χολερυθρίνη μετατρέπεται από τη βακτηριακή δράση σε ουροχολινογόνο. Μέρος του ουροχολινογόνου απορροφάται από το έντερο στην πυλαία κυκλοφορία. Η ηπατική πρόσληψη αυτού είναι ατελής και μια μικρή ποσότητα φθάνει στη συστηματική κυκλοφορία και εκκρίνεται στα ούρα. Το μεγαλύτερο ποσό του ουροχολινογόνου του εντέρου οξειδώνεται στο κόλον σε μια καφέ χρωστική, την ουροχολίνη που απεκκρίνεται στα κόπρανα.

Περίπου 300mgr χολερυθρίνης παράγονται ημερησίως, αλλά το υγιές ήπαρ μπορεί να μεταβολίζει και να εκκρίνει τη δεκαπλάσια ποσότητα. Επομένως, η μέτρηση της συγκέντρωσης της χολερυθρίνης του πλάσματος είναι μια μη ευαίσθητη εξέταση της λειτουργίας του ήπατος. Η χολερυθρίνη που φυσιολογικά βρίσκεται στο πλάσμα είναι κυρίως (περίπου 95%) μη συζευγμένη. Επειδή είναι προσδεμένη σε πρωτεΐνες δεν διηθείται στο νεφρικό σπείραμα και στον υγρή

άνθρωπο δεν ανιχνεύεται στα ούρα. Η εναπόθεση της χολερυθρίνης στους ιστούς, δίνει τη χαρακτηριστική κίτρινη χρώση (ίκτηρος).

Κλινικά, ο ίκτηρος μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμος, εκτός αν η συγκέντρωση της χολερυθρίνης του πλάσματος είναι κατά 2,5 φορές πάνω από τα ανώτατα όρια του φυσιολογικού (>50 $\mu\text{mole/L}$). Υπερχολερυθριναιμία μπορεί να προκληθεί από αύξηση της παραγωγής της χολερυθρίνης, λόγω βλάβης του μεταβολισμού, μειωμένης απέκκρισης ή ενός συνδυασμού αυτών. Οι κυριότερες αιτίες ίκτηρου αναγράφονται στην παρακάτω Εικόνα 4.



Εικόνα 4: Κύριες αιτίες ίκτηρου: Προηπατικές, ηπατικές και μεταηπατικές αιτίες ίκτηρου.

Η υπερχολερυθριναιμία μπορεί να οφείλεται σε περίσσεια συζευγμένης και μη συζευγμένης χολερυθρίνης.

1. Μη συζευγμένη υπερχολερυθριναιμία: Σε περίπτωση περίσσειας μη συζευγμένης χολερυθρίνης, η συγκέντρωση στους ενήλικες σπάνια υπερβαίνει τα 100 $\mu\text{mole/L}$. Απουσία ηπατικής νόσου, η συζευγμένη υπερχολερυθριναιμία συχνότερα οφείλεται είτε σε αιμόλυση είτε στο σύνδρομο Gilbert, μια κληρονομική διαταραχή του μεταβολισμού της χολερυθρίνης, η οποία υπερβαίνει την ικανότητα του ήπατος να απομακρύνει και να συζεύξει τη χρωστική. Στις περιπτώσεις αυτές το ποσό του ουροχολινογόνου αυξάνεται και αυξάνεται το ουροχολινογόνο των ούρων. Η δραστηριότητα των ηπατικών ενζύμων που εμπλέκονται στη σύζευξη είναι συνήθως χαμηλή κατά τη γέννηση, αλλά αμέσως μετά αυξάνεται ταχέως. Ο παροδικός «φυσιολογικός» ίκτηρος των νεογνών αντανακλά αυτό. Σε περίπτωση υπερβολικής αιμόλυσης, όπως στην ασυμβατότητα Rhesus ή στην έλλειψη ενζυμικής δραστηριότητας που συμβαίνει στα πρόωρα και

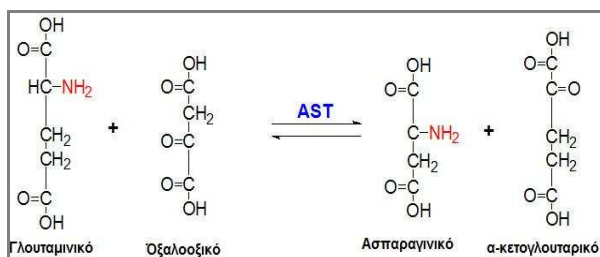
στο σύνδρομο Crigler-Najjar μπορεί να παρατηρηθεί μαζική αύξηση στη συγκέντρωση της μη συζευγμένης χολερυθρίνης. Εάν τα επίπεδα της χολερυθρίνης υπερβούν τα 340 $\mu\text{mole/L}$, η πρόσληψη της στον εγκέφαλο μπορεί να είναι αιτία βαριάς εγκεφαλικής βλάβης.

2.Συζευγμένη υπερχολερυθριναιμία: Η κατάσταση αυτή οφείλεται “στη διαρροή” της χολερυθρίνης είτε από τα ηπατοκύτταρα ή από το χοληφόρο σύστημα στη κυκλοφορία του αίματος σε περίπτωση που η φυσιολογική οδός έκκρισης παρεμποδίζεται. Η υδατοδιαλυτή συζευγμένη χολερυθρίνη που εισέρχεται στην κυκλοφορία εκκρίνεται στα ούρα δίνοντας σε αυτά ένα πορτοκαλόφαιο σκούρο χρώμα. Σε πλήρη απόφραξη των χοληφόρων οδών η χολερυθρίνη δεν φθάνει στο έντερο, επομένως δεν σχηματίζεται ουροχολίνη και τα κόπρανα έχουν σχεδόν πλήρη αποχρωματισμό. Τα επίπεδα της χολερυθρίνης δεν έχουν προγνωστική αξία στις οξείες ηπατίτιδες. Αντίθετα, έχουν στις χρόνιες ηπατοπάθειες και ιδιαίτερα στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση (τιμές ολικής χολερυθρίνης $>10 \text{ mgr/dl}$ αποτελούν απόλυτη ένδειξη μεταμόσχευσης ήπατος) (Marshall 1998).

B. Δοκιμασίες Ελέγχου Ακεραιότητας Ηπατοκυττάρων και Χοληφόρων

Περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό των αμινοτρανσφερασών, της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH), της αλκαλικής φωσφατάσης, της γ-γλουταμυλικής τρανσφεράσης (γGT) και της 5-νουκλεοτιδάσης.

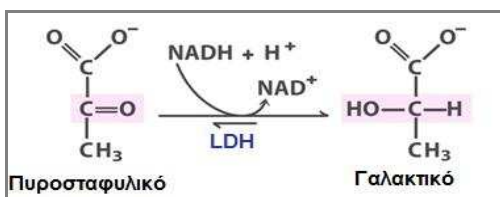
Οι αμινοτρανσφεράσες-ασπαραγική αμινοτρανσφεράση (AST) ή παλαιότερα γνωστή και ως οξαλοξική τρανσαμινάση (SGOT) και η αλανινοαμινοτρανσφεράση (ALT) ή παλαιότερα γνωστή και ως πυροσταφυλική τρανσαμινάση (SGPT) χρησιμεύουν στο μεταβολισμό των αμινοξέων (Εικόνα 5) και είναι οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι δείκτες ηπατικής βλάβης και αντανakλούν την ηπατοκυτταρική νέκρωση.



Εικόνα 5: Μεταφορά αμινομάδων από τις τρανσαμινάσες. Η AST καταλύει τη μεταφορά αμινομάδων από το ασπαραγινικό στο γλουταμινικό και αντίστροφα και η ALT καταλύει τη μεταφορά αμινομάδων από την αλανίνη στο γλουταμινικό και αντίστροφα.

Η ALT παράγεται στο ήπαρ. Η AST παράγεται και σε άλλα όργανα, όπως η καρδιά, οι μύες, οι νεφροί και ο εγκέφαλος και επομένως αυξάνει (εκτός των ηπατικών) και σε άλλες παθήσεις. Οι υψηλότερες τιμές AST και ALT παρατηρούνται σε οξεία ηπατική νέκρωση λόγω ιογενούς, φαρμακευτικής, τοξικής ή ισχαιμικής ηπατίτιδας. Μολονότι αντανακλούν την έκταση της νέκρωσης, τα επίπεδα τους δεν σχετίζονται με την έκβαση της νόσου. Μέτριες αυξήσεις (3-10 φορές πάνω από τις ανώτερες φυσιολογικές τιμές) των ενζύμων αυτών είναι τυπικές οξείας ή χρόνιας ηπατίτιδας, συμπεριλαμβανομένης και της αλκοολικής, ενώ μικρότερες αυξήσεις παρατηρούνται στη λιπώδη διήθηση, σε ορισμένες περιπτώσεις χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας, σε άτομα που πάσχουν από μυοσίτιδες ή υποβάλλονται σε έντονη μυϊκή άσκηση, σε κίρρωση και τέλος σε νεοπλασμάτα ή σε χολοστατικά νοσήματα του ήπατος.

Ο λόγος AST/ALT στις περιπτώσεις αλκοολικής ηπατοπάθειας είναι συνήθως μεγαλύτερος του 2 (>80% των ασθενών). Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό δεν είναι απόλυτα γνωστός. Πιθανολογείται αύξηση της AST από προσβολή και άλλων εκτός του ήπατος οργάνων από το οινόπνευμα όπως π.χ των μυών (αλκοολική μυοπάθεια) και της καρδιάς (αλκοολική καρδιομυοπάθεια). Αντίθετα, η ALT είναι φυσιολογική ή μέτρια αυξημένη λόγω μειωμένης σύνθεσης της από ανεπάρκεια της φωσφορικής 5-πυριδοξάλης, συνενζύμου της βιταμίνης B₆, που είναι απαραίτητη για τη σύνθεση των αμινοτρανσφερασών και κυρίως της ALT. Στην ιογενή ηπατίτιδα, ο λόγος AST/ALT είναι μικρότερος του 1, αλλά αυξάνει προοδευτικά καθώς αναπτύσσεται κίρρωση. Τέλος, ψευδώς χαμηλές τιμές αμινοτρανσφερασών παρατηρούνται συχνά σε ουραιμία ή σε ασθενείς που υποβάλλονται σε χρόνια αιμοκάθαρση (ανώτερες φυσιολογικές τιμές στους ασθενείς αυτούς είναι το ήμισυ των φυσιολογικών τιμών που υιοθετεί κάθε εργαστήριο). Η LDH καταλύει τη μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ (Εικόνα 6). Αυξάνεται σε περιπτώσεις ηπατοκυτταρικής νέκρωσης, βαριάς ισχαιμίας, καρκίνου ή αιμόλυσης.



Εικόνα 6: Μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ από τη γαλακτική δεϋδρογονάση (LDH).

Έχει χαμηλή διαγνωστική αξία για τα ηπατικά νοσήματα, λόγω παραγωγής της και σε άλλους ιστούς. Πρόσφατα, ο λόγος ALT/LDH δείχθηκε ότι μπορεί να διακρίνει την οξεία ιογενή ηπατίτιδα (>1,5) από την τοξική ηπατίτιδα από ακεταμινοφαίνη (<1,5) και από την ισχαιμική ηπατίτιδα (<1,5) με ευαισθησία και ειδικότητα 94% και 84% αντίστοιχα.

Η αλκαλική φωσφατάση (ALP) αποτελεί μια οικογένεια ισοενζύμων που κωδικοποιούνται από 4 γονίδια. Παράγεται στο ήπαρ, στα οστά, στο έντερο, στο πλακούντα, στους νεφρούς και στα λευκά αιμοσφαίρια. Στα φυσιολογικά άτομα, η ALP του ορού προέρχεται κυρίως από το ήπαρ και τα οστά. Όμως σε άτομα ομάδας αίματος A ή O ιδιαίτερα μετά από λιπαρό γεύμα αυξάνει το εντερικό κλάσμα. Αύξηση του εντερικού κλάσματος έχει παρατηρηθεί επίσης σε κίρρωτικούς ασθενείς ομάδας αίματος O. Οι φυσιολογικές τιμές σχετίζονται με την ηλικία (υψηλότερες στα παιδιά, τους εφήβους και τους ηλικιωμένους και χαμηλότερες στους μεσήλικες), αλλά και το ύψος, το βάρος και το κάπνισμα (χαμηλότερες στους υψηλούς και υψηλότερες στους παχύσαρκους και στους καπνιστές). Οι μεγαλύτερες αυξήσεις παρατηρούνται σε ασθενείς με χολοστατικά σύνδρομα, χωρίς το επίπεδο της αύξησης να διευκολύνει στη διάκριση μεταξύ ένδο- και έξω-ηπατικής απόφραξης. Άλλα αίτια αύξησης του ενζύμου είναι νοσήματα των οστών με οστεοβλαστική δραστηριότητα, η εγκυμοσύνη (αύξηση του πλακουντιακού κλάσματος ιδιαίτερα στον 3^ο μήνα) και πολύ σπάνια νοσήματα του εντέρου και των νεφρών. Σε ασθενείς με κακοήθη νεοπλασμάτα η αύξηση του ενζύμου είναι συνήθως αποτέλεσμα ηπατικών και οστικών μεταστάσεων.

Η γ-GT καταλύει τη μεταφορά πεπτιδίων. Βρίσκεται στο ήπαρ, στο πάγκρεας, στο σπλήνα, στην καρδιά, στη σπερματοδόχο κύστη, στους νεφρούς και στον εγκέφαλο. Στο ήπαρ εντοπίζεται σε ολόκληρο το χοληφόρο δένδρο. Οι φυσιολογικές τιμές της σχετίζονται με την ηλικία (5-8 φορές υψηλότερες στα νεογέννητα) και το φύλο (υψηλότερες στους άνδρες). Εκτός των νοσημάτων του ήπατος και των χοληφόρων, η γ-GT αυξάνει σε παθήσεις του παγκρέατος και σπανιότερα σε έμφραγμα μυοκαρδίου, νεφρική ανεπάρκεια, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και σακχαρώδη διαβήτη. Στα νοσήματα του ήπατος και των χοληφόρων με επίπεδα στον ορό κινούμενα παράλληλα με αυτά της ALP είναι ένας πολύ ευαίσθητος δείκτης. Έχει όμως χαμηλή

ειδικότητα επειδή είναι «πανταχού παρούσα» και συχνά η αξία της περιορίζεται στον αποκλεισμό νοσημάτων των οστών, σε ασθενείς με αυξημένη ALP.

Τέλος, η 5-νουκλεοτιδάση βρίσκεται στο ήπαρ (χοληφόρα τριχοειδή και κολποειδή), στο έντερο, στον εγκέφαλο, στη καρδιά και στα αγγεία καθώς και στο ενδοκρινές τμήμα του παγκρέατος. Η ειδικότητα της είναι πολύ υψηλή αφού τα αυξημένα επίπεδα της είναι σχεδόν πάντα ηπατικής προέλευσης (Νταλέκος 2001).

Γ. Δοκιμασίες Ελέγχου Μεταβολισμού Ουσιών (τοξίνες, φάρμακα, ορμόνες)

Περιλαμβάνουν τη δοκιμασία κάθαρσης της αντιπυρίνης, τη δοκιμασία αναπνοής αμινοπυρίνης, τη δοκιμασία κάθαρσης της καφεΐνης, τη δοκιμασία αποβολής γαλακτόζης, τη μελέτη του μέγιστου ρυθμού σύνθεσης ουρίας και τη μελέτη παραγωγής του μεταβολίτη της λιδοκαΐνης. Με τις δοκιμασίες αυτές εκτιμάται ποσοτικά η λειτουργική μάζα του ήπατος και η ηπατική μικροσωματική λειτουργία. Εντούτοις, οι περισσότερες από τις παραπάνω δοκιμασίες χρησιμοποιούνται για ερευνητικούς σκοπούς και λιγότερο στην κλινική πράξη.

Δ. Δοκιμασίες Ελέγχου της Βιοσυνθετικής Ικανότητας του Ήπατος

Περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό της λευκωματίνης ορού και του χρόνου προθρομβίνης. Τα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των περισσότερων πρωτεϊνών του πλάσματος, όπως της λευκωματίνης, του ινωδογόνου και άλλων παραγόντων πήξης καθώς και των περισσότερων α- και β-σφαιρινών, των πρωτεϊνών οξείας φάσης κ.α.

Ο προσδιορισμός της λευκωματίνης αποτελεί χρήσιμο δείκτη της ηπατικής λειτουργίας στις χρόνιες ηπατοπάθειες. Στην οξεία ηπατοκυτταρική βλάβη δεν αποτελεί πολύ καλό δείκτη γιατί ο χρόνος ημιζωής της φθάνει στις 20 ημέρες. Τιμές λευκωματίνης <3 gr/dl υποδηλώνουν σοβαρού βαθμού ηπατική βλάβη και μειωμένη σύνθεση της (εξαιρέση αποτελεί η ύπαρξη κίρρωτικού ασκίτη που λόγω αύξησης του συνολικού όγκου του πλάσματος μπορεί η υπολευκωματιναιμία να είναι πλασματική). Η υπολευκωματιναιμία δεν είναι ειδικό εύρημα ηπατοπάθειας. Μπορεί να εμφανισθεί σε υποσιτισμό, χρόνια αλκοολισμό (χωρίς ηπατική νόσο), γαστρεντεροπάθεια με απώλεια λευκώματος, σύνδρομα δυσαππορόφησης, χρόνιες λοιμώξεις και νεφρωσικό σύνδρομο. Η ελάττωση ή η έλλειψη των παραγόντων πήξης αντανακλά σημαντική επιδείνωση της ηπατικής

λειτουργίας αφού συνήθως η σύνθεση τους από το ήπαρ γίνεται σε περίσσεια. Ο χρόνος προθρομβίνης αποτελεί χρήσιμο προγνωστικό δείκτη (η παράταση του αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης κεραυνοβόλου ηπατίτιδας). Επειδή η παράταση του χρόνου προθρομβίνης μπορεί να οφείλεται και σε έλλειψη βιταμίνης Κ, λήψη φαρμάκων που ανταγωνίζονται την προθρομβίνη κ.λ.π, η διαπίστωση προϋποθέτει κατάλληλη διαφορική διάγνωση.

Ε. Ανίχνευση Χρόνιων Φλεγμονώδων Ηπατικών Παθήσεων

Οι δοκιμασίες αυτές περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό ανοσοσφαιρινών, διαφόρων αυτοαντισωμάτων, ορολογικών και ιολογικών δεικτών καθώς και την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών. Εκτελούνται συνήθως στη διερεύνηση αυτοάνοσων ή ιογενών νοσημάτων του ήπατος (Νταλέκος 2001).

3.2. Απεικονιστικές δοκιμασίες

Οι απεικονιστικές δοκιμασίες ήπατος και χοληφόρων είναι η απλή ακτινογραφία κοιλιάς, ο ακτινολογικός έλεγχος του γαστρεντερικού σωλήνα, το υπερηχοτομογράφημα ήπατος και χοληφόρων, το doppler σπληνοπυλαίου άξονα και ηπατικών φλεβών, η ραδιοσοτοπική χολαγγειογραφία, η αξονική τομογραφία, η ενδοσκοπική παλίνδρομη χολάγγειοπαγκρεατογραφία, η μαγνητική τομογραφία και η μαγνητική χολάγγειοπαγκρεατογραφία.

3.3. Άλλες διαγνωστικές δοκιμασίες

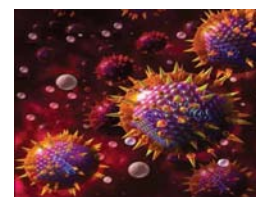
Προσδιορισμός νεοπλασματικών δεικτών και βιοψία ήπατος. Η τελευταία είναι σημαντικότερη εξέταση για το προσδιορισμό και την έκταση της ηπατοκυτταρικής δυσλειτουργίας ή διηθητικών ηπατικών νόσων, απαιτεί δε την απόλυτη στενή παρακολούθηση των ζωτικών σημείων του ασθενούς για τουλάχιστον 8 ώρες μετά την εκτέλεση της.

II. ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΗΠΑΤΟΣ

Οι πιο κοινές παθήσεις του ήπατος φαίνονται επιγραμματικά στην Εικόνα 7:

ΣΥΝΗΘΗ ΑΙΤΙΑ ΧΡΟΝΙΩΝ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΩΝ	ΣΥΝΗΘΗ ΑΙΤΙΑ ΟΞΕΙΩΝ ΗΠΑΤΙΤΙΔΩΝ
A.ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ Χρόνια ηπατίτιδα Β, χρόνια ηπατίτιδα C Χρόνια ηπατίτιδα D	A. ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ Ιός ηπατίτιδας Α, Β, C, D, Ε Αrbo-ιοί Ιός Epstein-Barr Κυταρομεγαλοϊός Ιός ερυθράς Ερπητοϊοί Εξωτικοί ιοί (Ιός Lassa, Ebola, Marburg)
B. ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ Αυτοάνοση ηπατίτιδα Πρωτοπαθής χολική κίρρωση Πρωτοπαθής σκлерηντική χολαγγειίτιδα	B.ΠΑΡΑΣΙΤΑ Αμοιβάδα, Λεισμανία Πλασμώδιο της ελονοσίας Σχιστόσωμα Εχινόκοκκος Λεπτόσπείρα Σύφιλη, Βρουκέλα
Γ.ΤΟΞΙΚΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΒΛΑΒΗ Κατανάλωση αλκοόλ Μη αλκοολική νόσος του ήπατος Φαρμακευτική ηπατοκυτταρική βλάβη Νόσος Wilson Αιμοχρωμάτωση Ανεπάρκεια α1-ανθρυσίνης Κυστική ίνωση Γλυκογέννεση τύπου IV	

Εικόνα 7: Καταστάσεις που σχετίζονται με χρόνια ή οξεία ηπατική νόσο.



1.ΙΟΓΕΝΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ

Πρόκειται για μια φλεγμονή του ήπατος από ιούς, η οποία χαρακτηρίζεται από νέκρωση των ηπατοκυττάρων καθώς και κυτταρικά διηθήματα από μονοπύρηνα κύτταρα λεμφοκύτταρα και ιστοκύτταρα κυρίως στο πυλαίο διάστημα και στα κολποειδή. Σπανιότερα, μπορεί να επικρατούν πολυμορφοπύρηνα. Τα σημαντικότερα αίτια των ιογενών ηπατιτιδών καθώς και οι χρόνοι επώασης και η πιθανότητα μετάπτωσης σε χρονιότητα φαίνονται στο παρακάτω Πίνακα 1:

Πίνακας 1: Αίτια και χρόνοι επώασης των ιογενών ηπατιτιδών.

Αίτια	Τύπος ιού	Επώαση	Χροσιότητα
Ιός της ηπατίτιδας A (HAV)	RNA	15-50 ημέρες	OXI
Ιός της ηπατίτιδας B (HBV)	DNA	28-180 ημέρες	NAI 3-5% των ενηλίκων 30% των παιδιών 90% των εογνών
Ιός της ηπατίτιδας C (HCV)	RNA	15-160 ημέρες	NAI (>80%)
Ιός της ηπατίτιδας D (HDV)	RNA απαιτεί την παρουσία του HBV	20-140 ημέρες	NAI Συνλοίμωξη: 2-3% Επιλοίμωξη: 70-80%
Ιός της ηπατίτιδας E (HEV)	RNA	15-65 ημέρες	OXI
Ιός της ηπατίτιδας G (HGV)	RNA	14-35 ημέρες	NAI Χρόνια αιμία OXI ΟΜΩΣ χρόνια ηπατίτιδα

Συμπτώματα: Εάν υπάρχουν είναι γενικά όπως: ανορεξία, ναυτία, εμετός, πυρετός, διόγκωση ήπατος με ήπιο άλγος στο δεξιό υποχόνδριο, ίκτερος και χαρακτηριστική απέχθεια στο καπνό και το οινόπνευμα.

Εργαστηριακά ευρήματα: Παρατηρείται φυσιολογικός ή μέτρια μειωμένος αριθμός λευκών και παθολογικές λειτουργικές ηπατικές δοκιμασίες.

Κλινική εικόνα: Σε γενικές γραμμές η κλινική εικόνα είναι η ίδια ανεξάρτητα από τον τύπο του ιού. Πάντως εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια από ανικτερική μέχρι βαριά, κεραυνοβόλο μορφή που μπορεί να οδηγήσει σε ηπατική εγκεφαλοπάθεια, ηπατικό κώμα και τελικά το θάνατο. Τα συμπτώματα αν υπάρχουν, συνήθως προηγούνται της εμφάνισης του ικτέρου 3 ημέρες έως 3 εβδομάδες. Στην ικτερική μορφή παρατηρείται υπέρχρωση ούρων και αποχρωματισμός κοπράνων λίγο πριν την εμφάνιση του ικτέρου. Ηπατομεγαλία υπάρχει στο 70% και σπληνομεγαλία στο 20% των περιπτώσεων.

Επιπλοκές: Διακρίνονται στις ηπατικές και στις εξωηπατικές. Στις πρώτες περιλαμβάνονται η κατάληξη σε χρόνια ηπατίτιδα, η παρατεταμένη χολόσταση για διάστημα 8 έως 29 εβδομάδων (κυρίως στην οξεία ηπατίτιδα A), η κεραυνοβόλος μορφή, η οξεία ιογενής ηπατίτιδα και το μεταηπατιτιδικό σύνδρομο. Στις εξωηπατικές περιλαμβάνονται οι πρώιμες επιπλοκές όπως η απλαστική αναιμία, τα έλκη του γαστρεντερικού σωλήνα, η οξεία παγκρεατίτιδα, η οξεία μυοκαρδίτιδα και το σύνδρομο Guillian-Barre και οι όψιμες επιπλοκές όπως η οζώδης

πολυαρθρίτιδα, η ρευματική πολυμυαλγία, η μεμβρανώδης η μεμβρανουπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα και σπανιότερα η κρουσφαιριναιμία.

Τρόποι μετάδοσης: Οι ιογενείς ηπατίτιδες μπορούν να μεταδοθούν με τους παρακάτω τρόπους (Εικόνα 8).

ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΙΟΓΕΝΩΝ ΗΠΑΤΙΤΙΔΩΝ					
ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ	ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Α	ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β	ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C	ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Δ	ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Ε
ΑΠΟ ΤΡΟΦΙΜΑ	●	■	■	■	●
ΑΠΟ ΤΟ ΠΡΟΣΩΠΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΤΟΜΑ	●	■	■	■	●
ΑΠΟ ΤΟ ΝΕΡΟ	●	■	■	■	●
ΕΚΑΤΕΡΓΑΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	●	■	■	■	●
ΕΝΔΟΣΚΟΜΕΙΑΚΗ	●	●	●	●	●
ΕΝΕΣΗ-ΝΑΡΚΩΤΙΚΑ	▲	●	●	●	■
ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	▲	●	●	●	▲
ΑΙΜΟΔΙΑΛΥΣΗ	■	●	●	●	■
ΣΕΞΟΥΑΛΙΚΑ	▲	●	▲	●	▲
ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΑ	●	■	■	■	▲
ΣΤΟΜΑΤΙΚΗ ΕΠΑΦΗ	●	▲	■	■	●
ΕΝΔΟΣΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ	●	▲	▲	▲	●
ΑΠΟ ΜΗΤΕΡΑ ΣΤΟ ΕΜΒΡΥΟ	▲	●	▲	▲	▲

● ΚΟΙΝΟΣ
 ▲ ΟΧΙ ΣΥΧΝΑ
 ■ ΠΟΤΕ
 ● ΠΙΘΑΝΟΝ

Εικόνα 8: Απεικόνιση τρόπων μετάδοσης των ιών που προκαλούν ηπατίτιδα.

1.1. Ηπατίτιδα Α

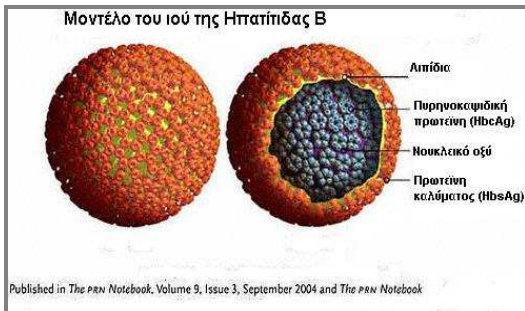
Πρόκειται για RNA ιό 27 nm που μεταδίδεται κυρίως με την κοπρονοστοματική οδό. Η βελτίωση των δικτύων ύδρευσης και αποχέτευσης έχει μειώσει σημαντικά τη συχνότητα της νόσου, στις αναπτυγμένες χώρες. Στο 90% των παιδιών που είναι κάτω από 5 ετών, η κλινική εικόνα είναι ανικτερική. Κεραυνοβόλος ηπατίτιδα από τον HAV είναι εξαιρετικά σπάνια.

Η αποβολή του ιού στα κόπρανα μειώνεται σημαντικά κατά την είσοδο των γενικών συμπτωμάτων. Η ορολογική διάγνωση γίνεται με την ανίχνευση των IgM anti HAV αντισωμάτων, αυτά αυξάνουν την πρώτη εβδομάδα του ικτέρου και διαρκούν 3 έως 6 μήνες. Στη διάρκεια της επώασης μπορεί να γίνει προφυλακτική χορήγηση ανοσοσφαιρίνης ενδομυϊκά. Ενεργητική ανοσοποίηση κατά του HAV είναι δυνατή σήμερα. Συνιστάται σε ταξιδιώτες σε ενδημικές περιοχές Ασία, Αφρική, Ανατολική Ευρώπη και Νότια Αμερική. Συνιστάται επίσης σε ειδικές ομάδες π.χ. εργαζόμενοι σε τρόφιμα, νοσηλευτές ειδικών τμημάτων, στρατιωτικό προσωπικό που υπηρετεί σε ενδημικές περιοχές και σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα C.

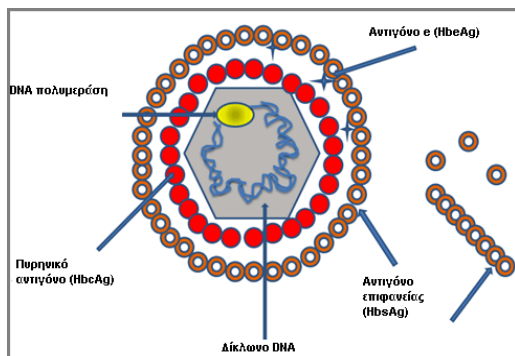
1.2. Ηπατίτιδα Β

Ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV) δεν είναι κυτταροπαθογόνος και ανήκει στους DNA ιούς.

Δομικά χαρακτηριστικά του ιού: Ο ιός φέρει εξωτερικό περίβλημα το οποίο αποτελείται από το επιφανειακό αντιγόνο του HBV και ένα εσωτερικό πυρηνοκαψίδιο. Το τελευταίο εκφράζει το πυρηνικό αντιγόνο του HBV και το αντιγόνο e, ενώ περιέχει επίσης το μερικά διπλής έλικας DNA του ιού και την DNA πολυμεράση (Εικόνα 9, 10).

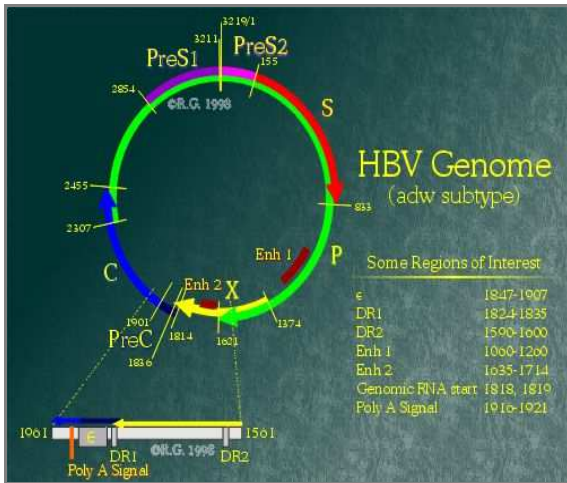


Εικόνα 9: Το μοντέλο του ιού της ηπατίτιδας Β. Στο αίμα είναι ορατά τα σωματίδια του ιού με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (σωμάτια Dane), αλλά υπάρχουν και σωληνίσκοι και σφαίρες, που αποτελούνται από τις πρωτεΐνες του περιβλήματος του ιού που παράγονται σε περίσσεια.



Εικόνα 10: Η δομή του ιού της ηπατίτιδας Β. Ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV) είναι ένας ηπατοτρόπος DNA ιός, με γονιδίωμα 3.2kb, εν μέρει δίκλωνο και εν μέρει μονόκλωνο. Έχει 4 τουλάχιστον γονίδια που κωδικογραφούν: α) την πρωτεΐνη φακέλου της επιφανείας (HBsAg), β) την πρωτεΐνη του πυρήνα (HbcAg), γ) την DNA-πολυμεράση και δ) την πρωτεΐνη X με ρόλο ρυθμιστικό.

Γενετικό υλικό: Το γονιδίωμα του HBV περιέχει 4 αλληλοεπικαλυπτόμενα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης. 1) το S για το επιφανειακό ή γονίδιο του περιβλήματος, β) το C για το πυρηνικό γονίδιο, γ) το X, για το X γονίδιο και δ) το P, για το γονίδιο της DNA πολυμεράσης. Τα παραπάνω γονίδια κωδικογραφούν στο σύνολο τους 7 δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες του ιού (Εικόνα 11). Το επιφανειακό ή γονίδιο του περιβλήματος (γονίδιο S), εκτός από τον επίτοπο του επιφανειακού αντιγόνου, κωδικογραφεί συγχρόνως και άλλες δυο μικρότερες πρωτεΐνες, που τις περισσότερες φορές είναι ενωμένες μαζί του και είναι γνωστές ως προ-επιφανειακή-1 και προ-επιφανειακή-2 πρωτεΐνες. Αυτές έχουν μεγάλη σημασία για την προσκόλληση των σωματιδίων του ιού στα ηπατικά κύτταρα, ενώ αποτελούν δυο από τις πιο ισχυρές από ανοσογονικής άποψης πρωτεΐνες του περιβλήματος του HBV.

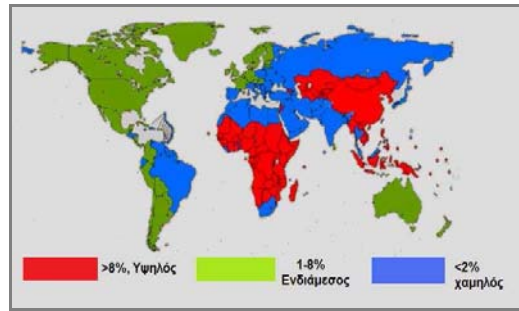


Εικόνα 11: Ο φυσικός χάρτης του γονιδιώματος της ηπατίτιδας Β: Το γονιδίωμα είναι ακριβώς 3200 νουκλεοτίδια στο μήκος. Τα ιογενή σωματίδια του HBV περιέχουν παράλληλα DNA και RNA. Ορισμένες περιοχές του πακεταρισμένου γενώματος μπορεί να είναι μονόκλωνες, δίκλωνες ή ακόμη τρίκλωνες (Anzola2004).

Μεταλλαγές του επιφανειακού αντιγόνου έχουν γίνει γνωστές ως αντιγονικοί καθοριστές d, y, w και r και η παρουσία τους καθόρισε τους υπότυπους D, Y, W και R του ιού της ηπατίτιδας Β. Κοινός αντιγονικός καθοριστής στους παραπάνω υπότυπους αποτελεί η περιοχή α της πρωτεΐνης του επιφανειακού αντιγόνου (μεταλλαγές στην α περιοχή ενοχοποιούνται για νόσηση από τον HBV παρά τον επιτυχή εμβολιασμό κατά του ιού καθώς και για μερική αδυναμία ανίχνευσης του επιφανειακού αντιγόνου με τις συνήθεις δοκιμασίες ανίχνευσης).

Το πυρηνικό γονίδιο (γονίδιο C) εκτός από τον αντιγονικό επίτοπο (HBcAg) κωδικογραφεί από τη λεγόμενη προπυρηνική περιοχή και το επιφανειακό αντιγόνο e (HBeAg) που αποτελεί δείκτη μολυσματικότητας και ενεργού πολλαπλασιασμού του ιού. Επιπλέον η θέση αυτή του γονιδιώματος του HBV αποτελεί εκείνη στην οποία γίνονται οι σημαντικότερες μεταλλαγές του ιού. Το γονίδιο P κωδικογραφεί την DNA πολυμεράση του ιού, η οποία λειτουργεί και ως αντίθετη μεταγραφάση αντιγράφοντας ένα αρχικό RNA προγονιδίωμα του HBV σε μονής έλικας DNA και στη συνέχεια λειτουργώντας ως κανονική DNA πολυμεράση το μετατρέπει σε διπλής έλικας. Το γονίδιο X κωδικογραφεί μια ή περισσότερες πρωτεΐνες, οι οποίες φαίνεται να ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων του ιού και τον ιικό πολλαπλασιασμό του, δρώντας με μηχανισμούς μεταγραφικής διενεργοποίησης, ενώ ενδέχεται να αποτελούν και προαγωγείς που εμπλέκονται στην παθογένεια του ηπατοκυτταρικού καρκίνου (Anzola 2004).

Επιδημιολογία-Τρόποι μετάδοσης: Σε παγκόσμιο επίπεδο υπολογίζεται ότι υπάρχουν >300.000.000 φορείς του ιού και ότι 2.000.000 άτομα πεθαίνουν κάθε χρόνο λόγω οξείας ή χρόνιας ηπατικής ανεπάρκειας (Lavanchy 2008)(Εικόνα 12):



Εικόνα 12: Γεωγραφική κατανομή HBV λοίμωξης. Τα ποσοστά απεικονίζουν τον επιπολασμό της νόσου.

Η μετάδοση του HBV γίνεται κυρίως παρεντερικά ή διαδερμικά είτε άμεσα (π.χ. μετάγγιση μολυσμένου αίματος ή παραγώγων αυτού) είτε έμμεσα μετά από επαφή με μολυσμένο αίμα ή άλλα βιολογικά υγρά ή με χρήση κοινών συσκευών (π.χ. ξυραφάκια, οδοντόβουρτσες, κοινές σύριγγες, μη καλά αποστειρωμένα χειρουργικά ή οδοντιατρικά εργαλεία, κλπ). Άλλοι κύριοι τρόποι μετάδοσης αποτελούν η σεξουαλική επαφή, η ενδοοικογενειακή (Zervou 2005A) και η κάθετη μετάδοση από μητέρα φορέα στο νεογνό (κατά τη διάρκεια του τοκετού ή πολύ πιο πιθανά κατά την περιγεννητική περίοδο) (Dodd 2000). Οι ομάδες υψηλού κινδύνου για λοίμωξη από τον HBV αναγράφονται στον Πίνακα 2.

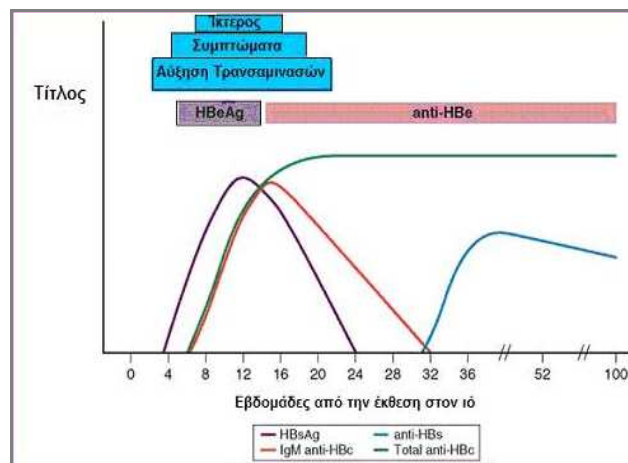
Πίνακας 2: Ομάδες υψηλού κινδύνου από τον HBV (Dalekos 1993A, Dalekos 1995A, Dalekos 1996, Zervou 2001, Zervou 2005A, Stefos 2009).

Ενδοφλέβιοι χρήστες τοξικών ουσιών και αλκοολικοί
Μεταμοσχευθέντες
Άτομα χαμηλού κοινωνικό-οικονομικού επιπέδου
Ετεροφυλόφιλοι και ερωτικοί σύντροφοι φορέων του ιού
Άτομα με πολλαπλές (αιματηρές) οδοντιατρικές εργασίες/έτος
Μέλη οικογενειών φορέων του ιού και νεογνά θετικών μητέρων
Εργαζόμενοι σε επαγγέλματα υγείας
Ιδρυματικοί ασθενείς, μειονοτικοί πληθυσμοί, προσωπικό των φυλακών
Ετεροφυλόφιλοι και ερωτικοί σύντροφοι φορέων του ιού
Άτομα με πολλαπλές (αιματηρές) οδοντιατρικές εργασίες/έτος

Συμπτώματα: Στο 2/3 των ασθενών (και κυρίως στα παιδιά > 5 ετών) η οξεία νόσος είναι ασυμπτωματική (ανικτερική). Στα παιδιά μπορεί να εκδηλωθεί μόνο ως ηπατομεγαλία, με συνοδό βλατιδώδες εξάνθημα κυρίως στο πρόσωπο και τα άκρα (βλατιδώδης ακροδερματίτιδα) που διαρκεί 2-3 εβδομάδες. Στη συμπτωματική (ικτερική) μορφή, η κλινική εικόνα δεν διαφέρει από εκείνη που παρατηρείται σε οποιαδήποτε άλλο τύπο ιογενούς ηπατίτιδας.

Διάγνωση: Οι ορολογικοί και ιολογικοί δείκτες που θέτουν τη διάγνωση περιλαμβάνουν την ανίχνευση στον ορό του επιφανειακού αντιγόνου S, (HBsAg) του αντιγόνου e (HBeAg), των αντισωμάτων έναντι στο πυρηνικό αντιγόνο (IgM antiHBcAg) και του HBV-DNA (Kao 2008, Elgouhari 2008). Το HBsAg ανιχνεύεται με σύγχρονες τρίτης γενεάς ανοσοενζυμικές η ραδιοανοσομετρικές μεθόδους που έχουν πολύ μεγάλη ευαισθησία. Ο τίτλος του προοδευτικά υποχωρεί καθώς η οξεία λοίμωξη οδεύει προς ίαση, ενώ παραμένει υψηλός σε εκείνους που θα μεταπέσουν σε χρόνια ηπατίτιδα (προγνωστικός δείκτης). Η απουσία του δεν αποκλείει όμως την οξεία ηπατίτιδα Β. Τέτοιες περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθούν όταν: 1) Ο έλεγχος γίνει πριν τη θετικοποίηση του HBsAg, το HBsAg «κρύβεται» σε ανοσοσυμπλέγματα π.χ σε περιπτώσεις ιδιοπαθούς μεικτής κρυσφαιριναιμίας υπάρχει πειραματικό ή μεθοδολογικό λάθος. 2) Το HBsAg εκφράζεται αλλά δεν εκκρίνεται ή δεν εκφράζεται καθόλου λόγω μεταλλαγών στην περιοχή του φακέλου του ιικού γονιδιώματος (π.χ αντικατάσταση του αμινοξέος γλυκίνη στη θέση 145 του αντιγονικού καθοριστή α της πρωτεΐνης HBsAg με το αμινοξύ αργινίνη). 3) Έχει γίνει ανοσολογική κάθαρση από τον ιό πριν από τον πρώτο ορολογικό έλεγχο ή πρόκειται για κεραυνοβόλο ηπατίτιδα Β (στο 15-20% των περιπτώσεων κεραυνοβόλου Β ηπατίτιδας το HBsAg είναι αρνητικό). Στις περιπτώσεις αυτές (εκτός ίσως της πρώτης) ο μόνος ορολογικός δείκτης οξείας λοίμωξης από τον HBV είναι οι υψηλοί τίτλοι του IgM antiHBc αντισώματος. Το HBeAg ανιχνεύεται με ανοσοενζυμικές η ραδιοανοσομετρικές μεθόδους σχεδόν ταυτόχρονα με την ανίχνευση του HBsAg. Σχετίζεται με ενεργό πολλαπλασιασμό του ιού και αυξημένη μολυσματικότητα, εξαφανίζεται περίπου κατά το χρόνο που το HBsAg φθάνει τις μέγιστες συγκεντρώσεις του. Το HBeAg δεν ανιχνεύεται σε ορό με αρνητικό HBsAg. Το HBV-DNA ανιχνεύεται στον ορό στην αρχική φάση της οξείας λοίμωξης. Εξαφανίζεται πριν από την

ορομετατροπή του HBeAg σε antiHBe. Σχετίζεται με ενεργό πολλαπλασιασμό του ιού και αυξημένη μολυσματικότητα, ενώ η μείωση του τίτλου του αποτελεί το πρώτο σημείο υποχώρησης της οξείας λοίμωξης. Το IgM antiHBe αντισώμα ανιχνεύεται σε πολύ υψηλούς τίτλους με ανοσοενζυμικές ή ραδιοανοσομετρικές μεθόδους λίγο μετά την εμφάνιση του HBsAg και του HBeAg και για διάστημα 3-12 μηνών από την προσβολή. Σε περίπτωση ταχείας κάθαρσης του αντιγόνου επιφανείας το IgM αντι-HBe αποτελεί το μοναδικό ορολογικό δείκτη οξείας ηπατίτιδας Β (περίοδος παραθύρου του πυρήνα). Οι υπόλοιποι ορολογικοί δείκτες που ανιχνεύονται σε μια κλασσικής διαδρομής οξείας ηπατίτιδας Β αφορούν τα IgG αντισώματα κατά πρωτεϊνών του HBV (κατά σειρά εμφάνισής: antiHBe, antiHBs και antiHBc). Τα IgG antiHBe (δεν είναι προστατευτικά αντισώματα) εμφανίζονται σχετικά νωρίς μετά από την αρχική ανίχνευση των HBeAg και των HBsAg, βαίνουν αυξανόμενα, ενώ αντίθετα τα IgM antiHBe αντισώματα μειώνονται. Τα antiHBe (μη προστατευτικά επίσης αντισώματα) και τα antiHBs (τα μόνα προστατευτικά αντισώματα που εμφανίζονται επίσης και μετά από επιτυχή εμβολιασμό κατά του HBV) ανιχνεύονται μετά την εξαφάνιση των αντίστοιχων αντιγόνων, αν και για μικρό σχετικά χρονικό διάστημα μπορεί να ανιχνεύονται ταυτόχρονα με αυτά (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Κλινική πορεία και ορολογική διάγνωση της οξείας ηπατίτιδας Β.

Πρόληψη: Τα σημαντικότερα από τα γενικά μέτρα αποτελούν η χρήση γαντιών σε οποιαδήποτε αιματηρή ιατρική πράξη, η άριστη αποστείρωση χειρουργικών και οδοντιατρικών εργαλείων, η χρήση προφυλακτικού, ο υποχρεωτικός έλεγχος όλων των εγκύων, ο εκτενής έλεγχος όλων των αιμοδοτών, η χρήση συρίγγων μιας χρήσης, η παθητική ανοσοποίηση και η ενεργητική

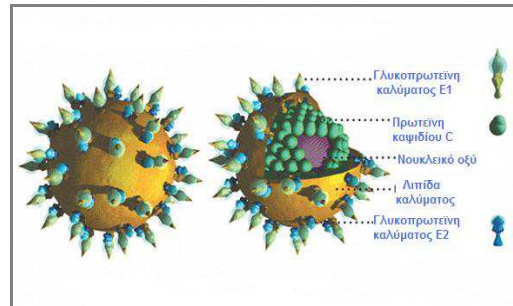
ανοσοποίηση. Η παθητική ανοσοποίηση περιλαμβάνει τη χορήγηση γ-σφαιρίνης (έτοιμα antiHBs αντισώματα). Η ενεργητική ανοσοποίηση περιλαμβάνει τη χορήγηση εμβολίου.

Τα άτομα υψηλού κινδύνου πρέπει να ελέγχονται 12 μήνες μετά το πέρας του εμβολιασμού ως προς την αντισωματική τους ανταπόκριση (μέτρηση antiHBs). Τίτλος αντισωμάτων antiHBs \geq 10 IU/L μετά από εμβολιασμό θεωρείται προστατευτικός έναντι του ιού της ηπατίτιδας Β. Σε όσους δεν ανταποκρίθηκαν στον εμβολιασμό (antiHBs $<$ 10 IU/L) πρέπει να χορηγούνται άλλες τρεις δόσεις εμβολίου (2^{ος} κύκλος) και να ελέγχεται ξανά ο τίτλος antiHBs. Η πιθανότητα απάντησης στο δεύτερο σχήμα εμβολιασμού είναι 30-50%. Οι μη ανταποκριθέντες μετά το δεύτερο κύκλο είναι επίνοσοι σε HBV λοίμωξη και θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα προσεκτικοί στην εφαρμογή των μέτρων πρόληψης της λοίμωξης.

Ο προστατευτικός τίτλος αντισωμάτων μειώνεται προοδευτικά σε χαμηλά ή ακόμη και σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στο 30% των εμβολιασθέντων 15 χρόνια μετά από τον εμβολιασμό. Ωστόσο, μελέτες μακράς παρακολούθησης σε επαγγελματίες υγείας και σε άλλες ομάδες υψηλού κινδύνου έδειξαν ότι η ανοσιακή μνήμη παραμένει άθικτη, ακόμη και με μη ανιχνεύσιμους τίτλους αντισωμάτων, εξασφαλίζοντας 100% προστασία έναντι του ιού της ηπατίτιδας Β σε άτομα που ανέπτυξαν αρχικά τίτλο αντισωμάτων antiHBs \geq 10 IU/L μετά από εμβολιασμό. Στα τόσα χρόνια κυκλοφορίας του εμβολίου καμία οξεία HBV λοίμωξη δεν έχει τεκμηριωθεί σε άτομα ανταποκριθέντα στον εμβολιασμό (Ravanfar 2009).

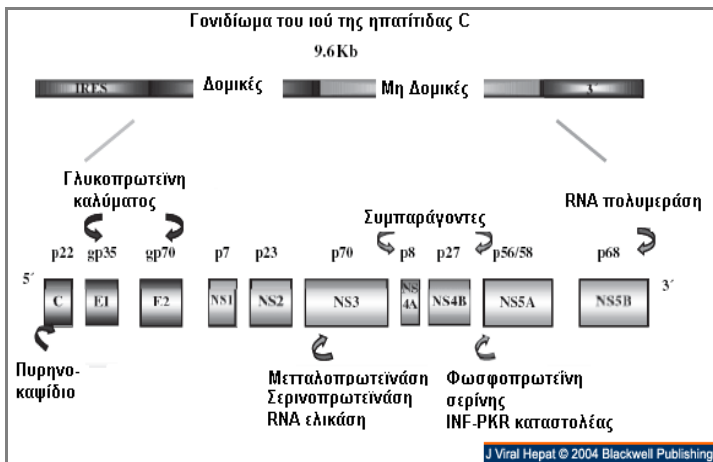
1.3. Ηπατίτιδα C (HCV)

Δομικά χαρακτηριστικά ιού : Είναι RNA ιός με περίβλημα (45 nm) που απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε πριν από μερικά χρόνια (1989) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Εξωτερικό περίβλημα και τρισδιάστατη δομή του ιού της ηπατίτιδας C.

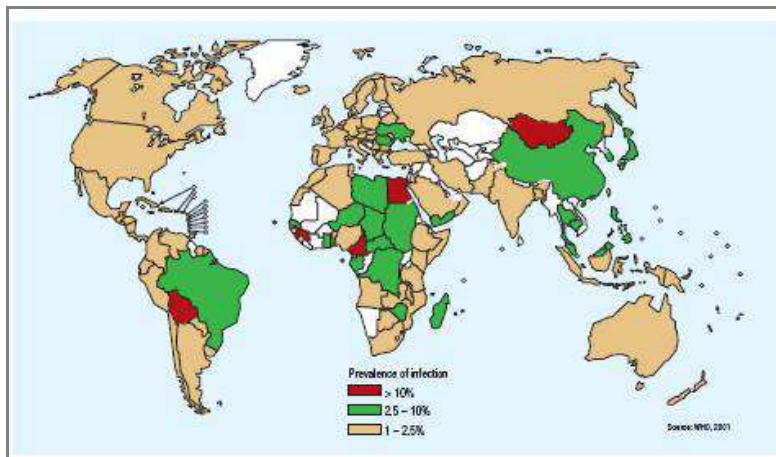
Γενετικό υλικό: Το γονιδίωμα του αποτελείται από ένα μονόκλωνο θετικής κατεύθυνσης RNA με ένα και μοναδικό ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που συνίσταται από 9500 περίπου νουκλεοτίδια. Στην αρχή κωδικογραφούν μια πολύπρωτεΐνη από την οποία αποσπώνται μετά από πρωτεολυτική επεξεργασία οι δομικές και μη-δομικές περιοχές του ιού. Η πρωτεΐνη του πυρηνοκαψιδίου και οι δύο γλυκοπρωτεΐνες του περιβλήματος E1(gp35) και E2(gp72) που συνιστούν τις δομικές πρωτεΐνες του ιού (Εικόνα 15) κωδικογραφούνται από τη δομική περιοχή που βρίσκεται στο αμινικό άκρο του γονιδιώματος και αποσπώνται από την πολύ πρωτεΐνη μετά από δράση πεπτιδασών του ξενιστή, που είναι γνωστές ως «σηματάσες». Οι μη δομικές πρωτεΐνες (Εικόνα 15) που κωδικογραφούνται από το καρβοξυλικό άκρο του γονιδιώματος αποσπώνται από την πολύ-πρωτεΐνη μετά από τη δράση πρωτεάσης της σερίνης και είναι γνωστές ως NS2 (p23) , NS3 (p70), NS4 (p35) και NS5 (p124). Καθεμία από τις περιοχές NS4 και NS5 αποτελείται από δυο μικρότερες πρωτεΐνες, την NS4A και NS4B καθώς και την NS5A και NS5B. Στο 5' άκρο του γονιδιώματος υπάρχει μια μη κωδικογραφούσα περιοχή αποτελούμενη από 342 βάσεις (μη μεταφραζόμενη) που θεωρείται αναγκαία για τη μετάφραση της πολυπρωτεΐνης, ενώ στο 3' άκρο του γονιδιώματος υπάρχει μια άλλη UTR περιοχή αποτελούμενη από 27 βάσεις, η οποία ακολουθείται από πολύ-αδενυλική ή πολύ-ουριδιλική «ουρά» καθώς και 98 επιπλέον βάσεις που θεωρούνται απόλυτα αναγκαίες για τον πολλαπλασιασμό του ιού (Kato 2001A).



Εικόνα 15: Το γένωμα μεταφέρει ένα μονό μακρύ ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη, που αποκόβεται πρωτεολυτικά σε ένα αριθμό ευδιάκριτων προϊόντων. Η πολυπρωτεΐνη του HCV αποκόβεται συν- και μεταμεταγραφικά από κυτταρικές και ιογενείς πρωτεϊνάσες σε 10 διαφορετικά προϊόντα, με δομικές πρωτεΐνες (Από: Kato N. Molecular Virology of hepatitis C virus. Acta Med Okayama 2001, 55 σελ. 136).

Γενετική Ετερογένεια: Όπως και όλοι οι RNA ιοί, ο HCV χαρακτηρίζεται από υψηλό ρυθμό μεταβολής πιθανότατα λόγω απουσίας επιδιορθωτικών μηχανισμών κατά την αντιγραφή του. Υπάρχουν περιοχές που είναι αρκετά σταθερές, περιοχές με ενδιάμεση μεταβλητότητα και περιοχές με υψηλή μεταβλητότητα. Η μεγάλη αυτή γενετική ετερογένεια του HCV έχει χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση του ιού σε γονότυπους και υπότυπους (Bréchet 1996). Γονότυποι ενός ιού αποτελούν στελέχη του ιού που παρουσιάζουν γενικώς ετερογένεια νουκλεοτιδίων >10%. Ορότυποι ενός ιού αποτελούν στελέχη του ιού με φαινοτυπικές ορολογικές μεταβολές (μεταβολές της αλληλουχίας αμινοξέων και επομένως αντιγονικές διαφοροποιήσεις). Ο όρος “σχεδόν είδη” ή “παρόμοια γονιδιώματα του HCV” (quasi species) αναφέρεται σε “δεξαμενές” γενετικών παραλλαγών με ελάχιστες διαφορές στις αλληλουχίες νουκλεοτιδίων (<5% του γονιδιώματος του ιού). Σύμφωνα με την επικρατούσα ταξινόμηση κατά Simmonds, οι 6 γονότυποι συμβολίζονται με αραβικούς αριθμούς κατά σειρά ανακαλύψεως (1, 2, 3, 4, 5, 6), ενώ οι υπότυποι με μικρά λατινικά γράμματα, επίσης κατά σειρά ανακαλύψεως (a, b, c κλπ) (Simmonds 1993). Εάν ο γονότυπος επηρεάζει τη φυσική ιστορία και την κλινική συμπεριφορά της ηπατίτιδας C έχει αποτελέσει αντικείμενο διαμάχης στη βιβλιογραφία από τη στιγμή που διαπιστώθηκαν διαφορές στη γονοτυπική κατανομή του ιού. Πολλές μελέτες έχουν γίνει και είναι πλέον βέβαιο ότι διαφορετικός γονότυπος σημαίνει και διαφορετική ανταπόκριση στη θεραπεία (McHutchison 1998). Η γνώση του γονότυπου του ιού της ηπατίτιδας C έχει θεωρητική και πρακτική σημασία στη διάγνωση, στην προσπάθεια παρασκευής εμβολίων, στην κλινική ετερογένεια και πρόγνωση καθώς και στη θεραπεία της λοίμωξης.

Επιδημιολογία-Τρόποι μετάδοσης: Η λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) αποτελεί ένα κοινό παγκόσμιο πρόβλημα υγείας (Εικόνα 16). Ο ιός απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά στις ΗΠΑ το 1989 ως το κύριο αίτιο για τη μετά από μετάγγιση μη-A, μη-B ηπατίτιδα.

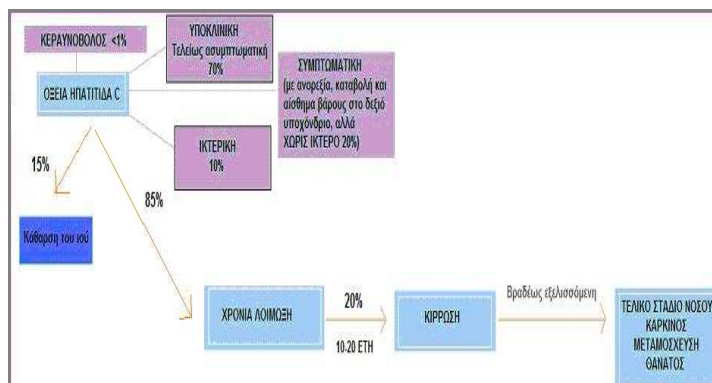


Εικόνα 16: Παγκόσμια κατανομή του ιού της ηπατίτιδας C (World Health Organization. Hepatitis C - Global Surveillance Update. Weekly Epidemiological Record 2000, 75:17-28).

Ο HCV μεταδίδεται όπως και ο HBV, αλλά η μολυσματική του δύναμη είναι κατά πολύ χαμηλότερη σε σχέση με τον HBV. Μεταδίδεται με το αίμα και τα προϊόντα του αίματος μέσω της κλασσικής παρεντερικής έκθεσης ή μετά από ενδοφλέβια χρήση ουσιών (Εικόνα 8). Οι πιθανότητες όμως μετάδοσης με τους παραπάνω τρόπους είναι κατά πολύ χαμηλότερες σε σχέση με τον HBV (δεν ξεπερνούν το 3-5%) (Gordon 1993, Dalekos 1993A). Οι ομάδες υψηλού κινδύνου για νόσηση από τον HCV είναι ίδιες με αυτές που αναγράφονται για την ηπατίτιδα B (Πίνακας 2). Επιπλέον οι νοσηλευόμενοι ασθενείς αποτελούν ξεχωριστή ομάδα κινδύνου. Σήμερα πάνω από το 70% των ασθενών δεν αναφέρει γνωστό αιτιολογικό παράγοντα συσχέτισης με μόλυνση από τον HCV (σποραδική ή κρυψιγενής μετάδοση λοίμωξης) (Gatselis 2007B, Zervou 2003).

Συμπτώματα: Είναι συνήθως μια ύπουλη, σιωπηλή και ασυμπτωματική νόσος (στο 80-90% των περιπτώσεων) που καταλήγει σε χρονιότητα σε πολύ μεγάλο ποσοστό (80-85% των κρουσμάτων). Στο 10-20% των περιπτώσεων είναι συμπτωματική (ανορεξία, καταβολή, αίσθημα βάρους στο δεξιό υποχόνδριο αλλά χωρίς ίκτερο) ενώ στο 10% είναι ικτερική. Κεραυνοβόλος μορφή είναι σπάνια (<1%) (Εικόνα 17). Οι παράγοντες που ευνοούν την εξέλιξη της οξείας ηπατίτιδας C σε χρονιότητα είναι η μεγάλη ηλικία προσβολής (>40 έτη), το φύλλο (άνδρες), η

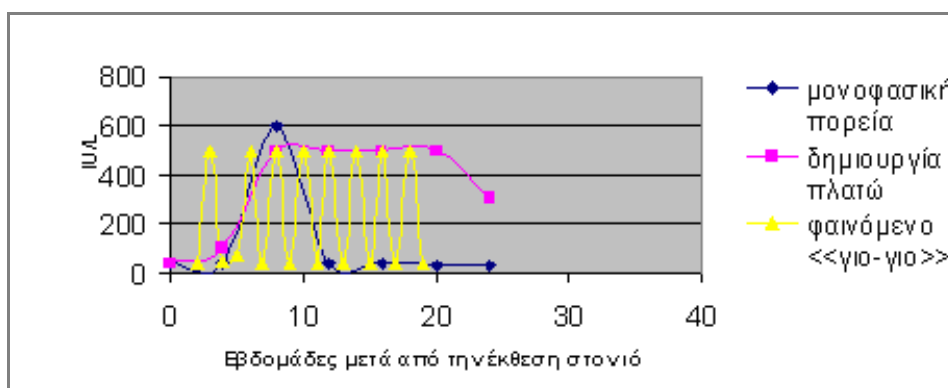
ύπαρξη ανοσοανεπάρκειας (π.χ. μεταμοσχευθέντες, HIV λοίμωξη), η παρουσία των «σχεδών ειδών» (quasi species), η επιμονή της ιαιμίας και η παρουσία πολυφασικής κλινικής ή βιοχημικής μεταβολής (Hino 1994A).



Εικόνα 17: Κλινική εξέλιξη της οξείας ηπατίτιδας C και Φυσική Ιστορία της λοίμωξης από τον HCV.

Στο 15% των περιπτώσεων επιτυγχάνεται η ίαση, πιθανώς λόγω της ισχυρής Th1 CD4+ κυτταρικής ανοσολογικής απάντησης κατά της μη δομικής πρωτεΐνης NS3 του HCV.

Εργαστηριακά ευρήματα: Τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών κυμαίνονται συνήθως από 200-600 IU/L χωρίς να αποκλείεται όμως αύξηση μεγαλύτερη των 1000 IU/L. Οι αμινοτρανσφεράσες είναι δυνατόν να αυξάνουν γρήγορα και στη συνέχεια να εμφανίσουν απότομη πτώση (μονοφασική πορεία που σχετίζεται με τη μικρότερη σχετικά πιθανότητα εξέλιξης σε χρονιότητα), να παραμένουν υψηλά (δημιουργία πλατώ) ή να εμφανίσουν ταχείες (ανά εβδομάδα) και σημαντικές διακυμάνσεις (κατά αρκετές εκατοντάδες IU/L), που θεωρούνται και το τυπικό χαρακτηριστικό της νόσου (παρομοιάζεται με το παιδικό παιχνίδι «γιο-γιο») (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Διακύμανση των αμινοτρανσφερασών στην οξεία ηπατίτιδα C.

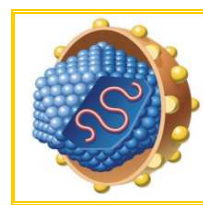
Η περίοδος επώασης που ορίζεται ως ο μέσος χρόνος από την έκθεση ως την έναρξη των συμπτωμάτων είναι περίπου 6-8 εβδομάδες. Η μέση περίοδος από την έκθεση στον ιό ως την εμφάνιση των αντισωμάτων έναντι του ιού (antiHCV) είναι περίπου 8-9 εβδομάδες. Αντίθετα η ανίχνευση του HCV-RNA με RT- διπλή PCR ή με την τεχνική του cDNA είναι δυνατή ακόμα και από την πρώτη εβδομάδα της μόλυνσης (Alter 1995) γεγονός που την κατατάσσει ως την πιο αξιόπιστη εξέταση για τη διάγνωση της οξείας ηπατίτιδας C. Η παρουσία φυσιολογικών τιμών των αμινοτρανσφερασών δεν υποδηλώνουν με βεβαιότητα την ίαση της νόσου παρά μόνο αν αρνητικοποιηθεί το HCV-RNA (Hoofnagle 1997).

1.4. Ηπατίτιδα D

Ο HDV είναι ελλειμματικός RNA ιός (36 nm) που απαιτεί την παρουσία του HBV για την αναπαραγωγή του. Μεταδίδεται με τους ίδιους τρόπους όπως ο HBV (εκτός από την περιγεννητική που είναι σπάνια). Μολύνει μόνο ασθενείς οι οποίοι είτε είναι ήδη φορείς (οξεία επιλοίμωξη), είτε μολύνονται ταυτόχρονα με τους δύο ιούς (οξεία συν-λοίμωξη). Υπολογίζεται ότι το 5% του συνόλου των φορέων του HBV είναι μολυσμένοι από τον HDV. Στην Ελλάδα, ο επιπολασμός της λοίμωξης σε ασυμπτωματικούς φορείς του HBsAg κυμαίνεται από 0-2,4% αν και σε μετανάστες έχει αναφερθεί έως και 15% (Dalekos 1995A). Χαρακτηριστικό της οξείας συνλοίμωξης αποτελεί η διφασική αύξηση των τρανσαμινασών και το πολύ μικρό ποσοστό μετάπτωσης σε χρόνια ηπατίτιδα D. Η οξεία επιλοίμωξη αντίθετα οδηγεί σε χρονιότητα (70-80%) (Fonseca 2002). Προφύλαξη κατά του HDV μπορεί να γίνει μόνο μετά από επιτυχή εμβολιασμό κατά του HBV.

2.ΧΡΟΝΙΑ ΙΟΓΕΝΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ

Αποτελεί νοσολογική οντότητα που χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση του ήπατος (διάρκεια >6 μήνες) όπως διαπιστώνεται από α) την παθολογική αύξηση των αμινοτρανσφερασών β) τις χαρακτηριστικές αλλοιώσεις στη βιοψία ήπατος και γ) την απομόνωση του αιτιολογικού παράγοντα (ιού) με τις ορολογικές και ιολογικές δοκιμασίες. Η χρόνια ηπατίτιδα πρέπει σήμερα να βαθμοποιείται και να σταδιοποιείται σύμφωνα με ένα παγκόσμιο σύστημα βαθμοποίησης και σταδιοποίησης που έχει γίνει αποδεκτό από το 1981 και τροποποιήθηκε το 1995. Σύμφωνα με αυτό εκτιμάται ο βαθμός δραστηριότητας και το στάδιο της νόσου. Ο όρος «βαθμός δραστηριότητας» αφορά την εκτίμηση της βαρύτητας της ηπατοκυτταρικής νέκρωσης και της φλεγμονής. Με τον όρο «στάδιο» εννοούμε την έκταση της ίνωσης, τη διαταραχή της αρχιτεκτονικής και την πιθανή ανάπτυξη κίρρωσης. Πλέον χρησιμοποιούνται οι όροι χρόνια ηπατίτιδα ήπιας, μέτριας ή έντονης δραστηριότητας με ή χωρίς συνοδό ίνωση (ήπια, μέτρια ή έντονη) και/ή κίρρωση (Νταλέκος 2001).

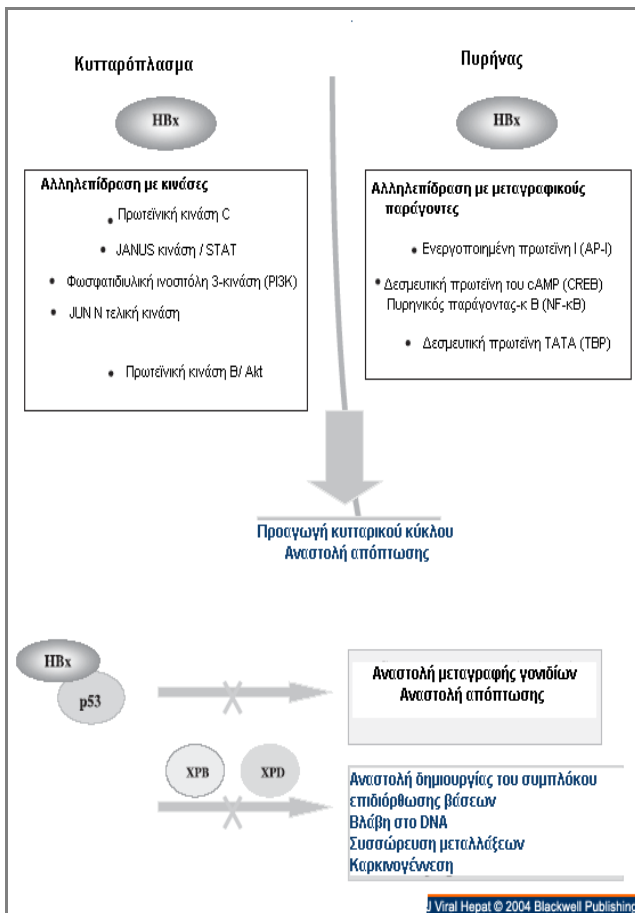


2.1. ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β

Οι ασθενείς που δεν “καθαρίζουν” το HBsAg από τον ορό τους σε 6 μήνες από την οξεία λοίμωξη θεωρούνται χρόνιοι φορείς του HBV. Παράγοντες κινδύνου μετάπτωσης σε χρονιότητα θεωρούνται το φύλο (συχνότερα στους άνδρες, αναλογία 6:1), η κλινική έκφραση της οξείας ηπατίτιδας Β (η οξεία ικτερική ηπατίτιδα Β σπάνια μεταπίπτει σε χρόνια λοίμωξη), η παρουσία θετικού HBsAg στις μητέρες φορείς και η ηλικία νόσησης (το 90-95% των νεογνών, 30% των μεγαλύτερων παιδιών και μόλις το 3-5% των εφήβων και ενηλίκων που μολύνονται θα οδηγηθούν σε χρονιότητα) (Stefos 2009). Στις περιπτώσεις αυτές ο οργανισμός δεν είναι σε θέση να απαλλαγεί από τον ιό, αν και προοπτικές μελέτες έχουν δείξει ότι κάθε χρόνο περίπου 1% των φορέων χάνουν αυτόματα το αντιγόνο επιφανείας χωρίς καμία θεραπευτική παρέμβαση.

2.1.1. Αιτιοπαθογένεια νόσου

Ο HBV εισέρχεται στο σώμα και στοχεύει στα ηπατοκύτταρα, αφού ο υποδοχέας του βρίσκεται σε αυτά τα κύτταρα. Μέχρι εδώ έχει μικρή κυτταροπαθητική επίδραση και ο ρυθμός με τον οποίον εμφανίζονται τα συμπτώματα εξαρτάται από την αρχική δόση του ιού. Ο HBV αναπαράγεται στα ηπατοκύτταρα για να παράγει τα σωματίδια HBsAg και τα ιογενή σωματίδια (HBV cores). Και τα 2 είδη σωματιδίων προσλαμβάνονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, που αποικοδομούν τις ιογενείς πρωτεΐνες σε πεπτίδια και τις παρουσιάζουν στην επιφάνεια τους συνδεδεμένες με τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (MHC τάξης II). Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μπορούν επίσης να επεξεργαστούν και να παρουσιάσουν τα ιικά αντιγόνα που τα προσλαμβάνουν μέσω φαγοκυττάρωσης των κατεστραμμένων ηπατοκυττάρων. Αυτά τα πεπτιδικά αντιγόνα αναγνωρίζονται από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CD8⁺Tcell) και από τα T βοηθητικά (CD4⁺Tcells) που ευαισθητοποιούνται. Τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα με τη βοήθεια των CD4⁺ αναγνωρίζουν τα ιικά αντιγόνα που παρουσιάζονται μέσω των MHC I μορίων στην επιφάνεια των μολυσμένων ηπατοκυττάρων και συνδέονται μαζί τους. Αυτήν η σύνδεση οδηγεί στην άμεση λύση των μολυσμένων ηπατοκυττάρων ή στην απελευθέρωση της ιντερφερόνης γ και του παράγοντα νέκρωσης των όγκων, οι οποίοι μπορούν να ρυθμίσουν αρνητικά τον ιικό πολλαπλασιασμό στα γειτονικά ηπατοκύτταρα χωρίς άμεση κυτταρική λύση. Όπως και οι άλλοι ηπατοτρόποι ιοί, τα συμπτώματα σχετίζονται με την αντίδραση του ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή που καταλήγει στη φλεγμονή και στη κυτταροτοξική απάντηση στο HBsAg στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων. Εάν η κυτταροδιαμεσολαβούμενη ανοσιακή απάντηση είναι ασθενής, τότε τα συμπτώματα είναι ήπια. Ο HBV είναι επίσης και ογκογόνος ιός (Εικόνα 19) συμβάλλοντας στη δημιουργία ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Ο HBV μετά το κάπνισμα θεωρείται η δεύτερη πιο συχνή αιτία καρκινογένεσης (Anzola 2004, Gatselis 2007A).



Εικόνα 19: Εμπλοκή της πρωτεΐνης HBx στην ηπατοκαρκινογένεση: Η HBx πρωτεΐνη συνενεργοποιεί τη μεταγραφή ιικών και κυτταρικών γονιδίων και επίσης εξισορροπεί την ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Η HBx είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που μπορεί να αλληλεπιδρά με το p53 αλλά επίσης επηρεάζει μια ποικιλία σηματοδοτικών μονοπατιών μέσα στο κύτταρο. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτήν η μικρή ιογενής πρωτεΐνη ενισχύει την κυτταρική επιβίωση. Ρυθμίζει θετικά τη δραστικότητα ενός αριθμού μεταγραφικών παραγόντων στον πυρήνα. Όμως, η πλειοψηφία των HBx εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα όπου αλληλεπιδρά με διάφορες κινάσες που της ενεργοποιεί (Από Anzola M. Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. J Viral Hepat 2004, 11: σελ 385).

2.1.2. Κλινική Εικόνα

Στους περισσότερους ασθενείς η νόσος είναι ασυμπτωματική και η διάγνωση γίνεται τυχαία κατά τον έλεγχο εξετάσεων ρουτίνας είτε κατά τον έλεγχο στον οποίο υποβάλλονται οι υποψήφιοι αιμοδότες (Stefos 2009, Zervou 2001, Zervou 2005B). Εκτός από την ασυμπτωματική μορφή, η χρόνια ηπατίτιδα Β μπορεί να εκδηλωθεί με μη ειδικά γενικά συμπτώματα όπως κόπωση, αδυναμία, γενική κακουχία, αρθραλγίες και εμφάνιση εξανθημάτων (συνηθέστερα στις γυναίκες). Η ναυτία, η απώλεια βάρους και η ανορεξία παρουσιάζονται μόνο σε ασθενείς με σοβαρότερης μορφή ηπατική νόσο ή κατά τη διάρκεια περιόδων παρόξυνσης της νόσου. Οι ασυμπτωματικοί ασθενείς μπορεί να διαγνωσθούν στο στάδιο της κίρρωσης (σκουρόχρωμα ούρα, ίκτερος, σημαντική απώλεια βάρους/απίσχυση, αραχνοειδείς τηλεαγγειεκτασίες, θηλεοποίηση άρρενος κ.α) στο στάδιο των επακόλουθων της κίρρωσης (σημειολογία πυλαίας υπέρτασης) ή κατά την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Κάποιοι που θα κάνουν ρήξη της αντιρρόπησης της

κίρρωσης θα διαγνωσθούν με ένα ή περισσότερα από τα κάτωθι: ανάπτυξη ασκίτικης συλλογής, ρήξη κιστών οισοφάγου, εμφάνιση ηπατικής εγκεφαλοπάθειας, αύξηση των επιπέδων της χολερυθρίνης. Η διάγνωση του ηπατοκυτταρικού καρκίνου βασίζεται στο συνδυασμό της α-φετοπρωτεΐνης και των ευρημάτων των απεικονιστικών μεθόδων. Ένα μικρό ποσοστό ασθενών μπορεί να διαγνωσθεί με αφορμή κάποιες από τις εξωηπατικές εκδηλώσεις των ιογενών ηπατίτιδων και ιδιαίτερα της οζώδους πολυαρτηρίτιδας (40% αυτών έχουν λοίμωξη από τον HBV) της μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας (συχνότερη στις τροπικές περιοχές) ή της εμφάνισης κρουσφαιριναιμίας (Christodoulou 2001).

2.1.3. Κλινική εξέλιξη

Η κλινική εξέλιξη της χρόνιας ηπατίτιδας B φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα 20. Το 3-5% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα από τον HBV θα αναπτύξει κίρρωση ετησίως (Fattovich 2002). Προγνωστικοί παράγοντες εξέλιξης και ανάπτυξης ίνωσης-κίρρωσης είναι η ηλικία, η δραστηριότητα του ιού, η παρουσία γεφυροποιού νέκρωσης στον ηπατικό ιστό, η συλλοίμωξη με τον HDV ή τον HCV και η κατανάλωση οινόπνεύματος (Dalekos 1996, De Jongh 1992, Stefos 2009).



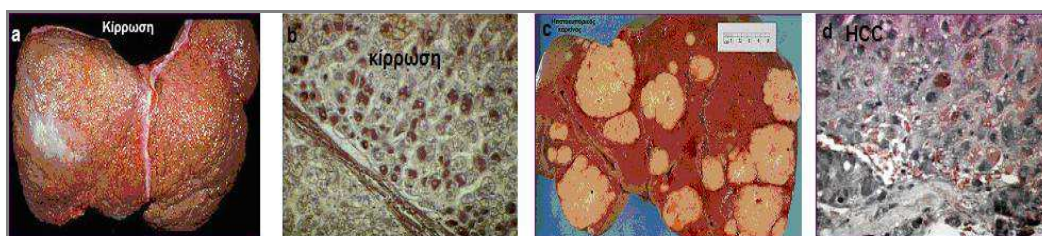
Εικόνα 20: Η κλινική εξέλιξη της χρόνιας ηπατίτιδας B.

Το 2-10% των ασθενών με κίρρωση θα εκδηλώσει ρήξη της αντιρρόπησης ετησίως. Η 5ετής επιβίωση ασθενών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση είναι 14-35%, σε αντίθεση με την επιβίωση ασθενών με καλώς αντιρροπούμενη κίρρωση που είναι 70-80% (Kao 2000). Ο κίνδυνος ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου είναι 200 φορές μεγαλύτερος στους φορείς HBsAg σε σχέση με τους υγιείς και 800 φορές μεγαλύτερος σε όσους έχουν ήδη αναπτύξει κίρρωση (Fattovich 1995, Hsu 2001, Stefos 2009). Παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού

καρκίνου φαίνονται στον Πίνακα 3 και η ιστολογική μορφολογία της κίρρωσης και του ηπατοκυτταρικού καρκίνου φαίνονται στην Εικόνα 21.

Πίνακας 3: Παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου.

Πρώτου βαθμού συγγενείς με ασθενή με ηπατοκυτταρικό καρκίνο
Φύλλο (Άνδρες 6 φορές περισσότερο από τις γυναίκες)
Ηλικία (>45 χρονών)
Κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά: ΗΒεΑg θετικό, ΗΒV DNA θετικό, κίρρωση
Συλλοίμωξη με ΗCV, χρήση οινόπνεύματος, αφλατοξίνες στη διατροφή
Ιολογικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες



Εικόνα 21: Μορφολογία κίρρωσης και ηπατοκυτταρικού καρκίνου. α) Μακροσκοπική εικόνα κίρρωτικού ήπατος β) τμήμα κίρρωτικού ήπατος (HES *100), γ) Μακροσκοπική εικόνα ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Τα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα μπορεί να είναι μονήρη ή πολυεστιακά δ) τμήμα ήπατος με ηπατοκυτταρικό καρκίνο (HES *200). Ο όγκος αποτελείται από κύτταρα που ομοιάζουν με τα ηπατοκύτταρα, αλλά έχουν άτυπους πυρήνες και ανώμαλη αρχιτεκτονική διάταξη.

2.1.4. Φυσική ιστορία της χρόνιας ηπατίτιδας Β

Υπάρχουν τρεις κύριες φάσεις ενώ στις Μεσογειακές χώρες (κυρίως Ιταλία, Ελλάδα, Τουρκία) και την Άπω Ανατολή διακρίνεται μια τέταρτη φάση που οφείλεται στην επικράτηση μεταλλαγμένου στελέχους του ΗΒV (Εικόνα 22). Οι φάσεις αυτές είναι διάρκειας μηνών έως αρκετών δεκαετιών (Marcellin 2005).

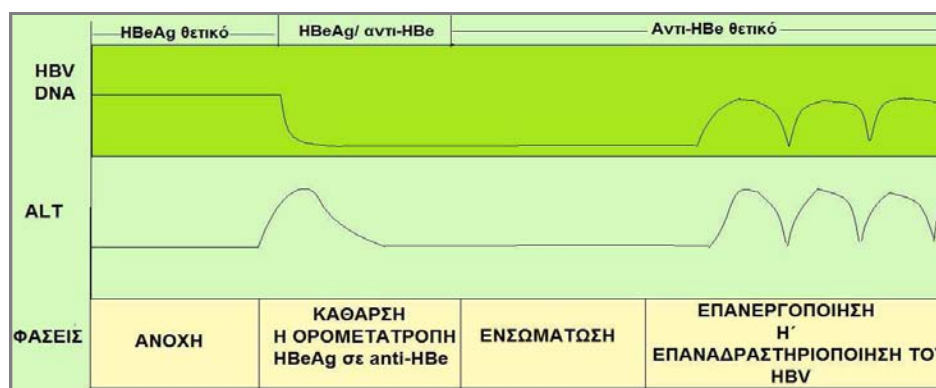
1^η) Φάση της ανοχής

Σε αυτή τη φάση ο ιός διαφεύγει του ανοσολογικού συστήματος με τη βοήθεια της δράσης της πρωτεΐνης ΗΒεΑg και πολλαπλασιάζεται ανενόχλητα. Στη φάση αυτή, οι αμινοτρανσφεράσες είναι σχεδόν φυσιολογικές, το ΗΒsΑg βρίσκεται θετικό σε υψηλούς τίτλους, το ΗΒV-DNA στον ορό ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα, το ΗΒεΑg είναι θετικό, το IgM antiΗBc είναι σχετικά χαμηλό με

θετικό το ολικό antiHBc και το HBcAg εκφράζεται ανοσοιστοχημικά στον πυρήνα των ηπατοκυττάρων. Παρατηρούνται ήπιες αλλοιώσεις στη βιοψία ήπατος. Στα νεογνά η φάση αυτή διαρκεί για δεκαετίες, ενώ στους ενήλικους είναι σημαντικά βραχύτερη. Στη φάση της ανοχής δεν αναπτύσσεται κίρρωση αφού η ηπατοκυτταρική νέκρωση είναι ασήμαντη.

2^η) Φάση κάθαρσης ή ορομετατροπής

Ο ιός συνεχίζει να πολλαπλασιάζεται αλλά αναγνωρίζεται από το ανοσολογικό σύστημα που επιδιώκει πλέον την εκρίζωση του. Στη φάση αυτή, που χαρακτηρίζεται από την ορομετατροπή του HBeAg σε antiHBe, οι αμινοτρανσφεράσες είναι αυξημένες, το αντιγόνο επιφανείας είναι θετικό, το HBV-DNA στον ορό είναι σχετικά χαμηλό, το IgM antiHBc είναι χαμηλό, ενώ το HBcAg εκφράζεται ανοσοιστοχημικά στον πυρήνα, αλλά και στο πρωτόπλασμα των ηπατοκυττάρων.

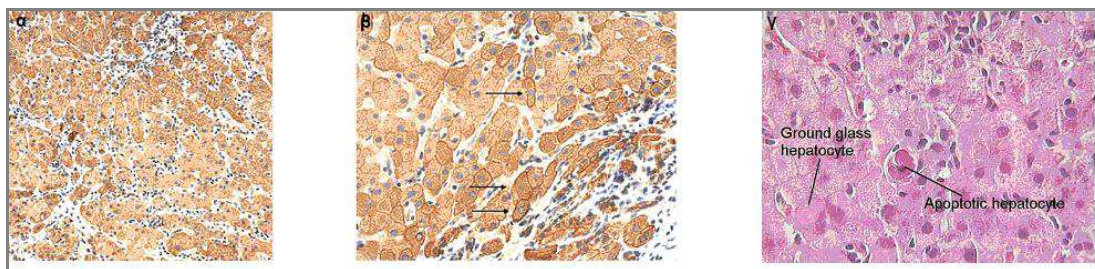


Εικόνα 22: Φυσική πορεία (φάσεις) της χρόνιας ηπατίτιδας Β.

3^η) Φάση της ενσωμάτωσης

Ο ιός είναι ενσωματωμένος στο γενετικό υλικό των χρωμοσωμάτων των ηπατοκυττάρων. Στην ήρεμη μακροχρόνια αυτή φάση οι αμινοτρανσφεράσες είναι φυσιολογικές, το HBsAg βρίσκεται θετικό αλλά σε χαμηλούς τίτλους, το HBV-DNA ανιχνεύεται σε χαμηλά επίπεδα, το HBeAg είναι αρνητικό, το antiHBe είναι θετικό, το IgM antiHBc μπορεί να ανιχνεύεται σε πολύ χαμηλούς τίτλους ή να είναι αρνητικό, το ολικό antiHBc είναι θετικό και το HBcAg δεν εκφράζεται στα ηπατοκύτταρα. Σε ένα μικρό ποσοστό ατόμων που βρίσκονται στη φάση αυτή επιτυγχάνεται εξαφάνιση και του αντιγόνου επιφανείας με παράλληλη ανάπτυξη antiHBs.

Ιστολογικά το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία ηπατοκυττάρων σαν «θαμπό τζάμι» ή κυττάρων «Χατζηγιάννη» (ground glass cells ή κύτταρα αδιαφανούς υάλου) που παρουσιάζουν πρωτόπλασμα πλούσιο σε πρωτεΐνες επιφανείας. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να αναδειχθούν ανοσοιστοχημικά με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου επιφανείας (Εικόνα 23). Το εύρημα αυτό είναι σχεδόν παθογνωμικό της μετάπτωσης της λοίμωξης από τον HBV σε χρονιότητα, καθώς σπάνια βρίσκεται στην οξεία ηπατίτιδα Β.



Εικόνα 23: Αντιπροσωπευτικές μικρογραφίες της ανοσοιστοχημείας του HBsAg στη χρόνια ηπατίτιδα. α) Ανοσοιστοχημική χρώση της HBsAg πρωτεΐνης αποκαλύπτει διάχυτη θετικότητα στα ηπατοκύτταρα μέσα στα ηπατικά λοβία (HES *100). β) Ανοσοιστοχημική χρώση της HBsAg πρωτεΐνης αποκαλύπτει διάχυτη θετικότητα στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων (HES *200). γ) Ανοσοιστοχημική χρώση της HBsAg πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη αυτή προσδίδει στα κύτταρα ομοιογενή ελαφροχρωματική υαλώδη εμφάνιση (κύτταρα ground glass ή κύτταρα αδιαφανούς υάλου).

Η επιβίωση των ατόμων που παραμένουν για μακρύ χρονικό διάστημα στη φάση της ενσωμάτωσης φαίνεται να είναι σε γενικές γραμμές πολύ καλή (“ανενεργοί φορείς”), αν και ο κίνδυνος ανάπτυξης κίρρωσης και ιδιαίτερα ηπατοκυτταρικού καρκίνου εξακολουθεί να υπάρχει, αφού ο ιός διατηρεί τη δυνατότητα επαναδραστηριοποίησης. Για να κατατάξουμε κάποιον στο στάδιο του ανενεργού φορέα πρέπει να έχει τα χαρακτηριστικά του Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Διαγνωστικά κριτήρια ανενεργού φορέα της Ηπατίτιδας Β.

HBsAg (+) > 6 μήνες
HBeAg (-), antiHBe (+)
ALT/AST: συνεχώς φυσιολογικές
IgM antiHBc < 0.200
HBV-DNA στο αίμα < 10 ⁵ copies/ml
Βιοψία ήπατος δεν απαιτείται

Η ιστολογική εικόνα του ήπατος δεν επιδεινώνεται στο στάδιο αυτό παρά μόνο εάν επαναδραστηριοποιηθεί ο HBV ή όταν προστεθεί άλλος βλαπτικός παράγοντας (Hoofnagle 2009). Δεν είναι γνωστές οι αιτίες επαναδραστηριοποίησης του HBV εκτός από τις περιπτώσεις ανοσοκαταστολής από τον HIV και της χορήγησης ανοσοκαταστολής λόγω νεοπλασίας. Άτομα με χρόνια ηπατίτιδα Β και νεόπλασμα που βρίσκονται στην ήρεμη από κλινική, βιοχημική και ιολογική σκοπιά, φάση ενσωμάτωσης του HBV μπορεί να παρουσιάσουν οξεία ηπατοκυτταρική βλάβη, συνήθως 3-4 εβδομάδες μετά από τη διακοπή του πρώτου έως του πέμπτου κύκλου χημειοθεραπείας, που συνήθως συμπεριλαμβάνει κορτικοειδή (διεγείρουν περιοχή του ιικού γονιδιώματος που δρα σαν υποδοχέας κορτικοειδούς). Κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας ο ιικός πολλαπλασιασμός αυξάνεται σημαντικά. Με τη διακοπή της, η ανοσολογική απάντηση κατά του έντονα πολλαπλασιασθέντος ιού είναι τόσο ισχυρή που ο ασθενής μπορεί να παρουσιάσει μεγάλη αύξηση αμινοτρασφερασών και ίκτερο που μπορεί να εξελιχθεί μέχρι και σε θανατηφόρο κεραυνοβόλο ηπατίτιδα.

4^η) Φάση της επανεργοποίησης ή επαναδραστηριοποίησης

Στις Μεσογειακές χώρες και στην Άπω Ανατολή, το 35-85% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β παρότι αρνητικοί στο HBeAg και θετικοί στο antiHBe, έχουν αυξημένες αμινοτρασφεράσες, θετικό HBV-DNA στον ορό, σχετικά υψηλά επίπεδα IgM antiHBc, ανοσοιστοχημική έκφραση του HBcAg στον πυρήνα και στο πρωτόπλασμα των μολυσμένων ηπατοκυττάρων και σοβαρή, προοδευτικά εξελισσόμενη ηπατοκυτταρική βλάβη. Οι ασθενείς αυτοί εντάσσονται στην τέταρτη φάση της φυσικής ιστορίας της χρόνιας ηπατίτιδας Β που είναι η χρόνια ενεργός ηπατίτιδα. Η πορεία της νόσου κατά τη φάση αυτή χωρίς θεραπεία είναι πολύ επιθετική, αφού το 75% των ασθενών καταλήγει σε μικρό χρονικό διάστημα σε κίρρωση (μέσος χρόνος: 6 χρόνια) και/ή ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Ιστολογικά παρατηρούνται λεμφοκυτταρικές φλεγμονώδεις διηθήσεις των πυλαίων διαστημάτων που επεκτείνονται σε όλο το παρέγχυμα. Η διαβρωτική νέκρωση των ηπατοκυττάρων επεκτείνεται από τα πυλαία διαστήματα και σχηματίζονται γεφυροποιά ινώδη διαφράγματα μεταξύ γειτονικών πυλαίων διαστημάτων (γεφυροποιός νέκρωση).

Η ενεργός λοίμωξη από τον HBV σε HBeAg αρνητικούς, antiHBe θετικούς ασθενείς αποδόθηκε σε μοριακό επίπεδο στην ύπαρξη μιας σημειακής μεταλλαγής στην προπυρηνική περιοχή του γονιδιώματος του ιού. Η μεταλλαγή περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1989 από τους καθηγητές C. Thomas και Σ. Χατζηγιάννη σε Έλληνες ασθενείς και στη συνέχεια παρατηρήθηκε και στην Ιταλία. Αφορά στην αντικατάσταση γουανίνης σε αδενίνη στο προτελευταίο κωδικόνιο της προπυρηνικής περιοχής, στη θέση 196, 5 νουκλεοτίδια πριν από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης της πυρηνικής πρωτεΐνης e. Τελικό αποτέλεσμα είναι η διακοπή της σύνθεσης και έκκρισης της πυρηνικής πρωτεΐνης e. Αντίθετα η παραγωγή και έκκριση της πυρηνικής πρωτεΐνης core που είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό, τη μορφογένεση και την έκκριση των ιικών σωματιδίων εξακολουθεί να γίνεται κανονικά.

Το προπυρηνικά μεταλλαγμένο στέλεχος του HBV, αν και μεταδύσιμο, φαίνεται να αναπτύσσεται στην πορεία της χρόνιας λοίμωξης από το φυσικό-άγριο στέλεχος κατά τη φάση της ορομετατροπής του HBeAg σε antiHBe μετά από κυτταρική ή χυμική ανοσολογική πίεση του ξενιστή. Αυτό εξηγεί γιατί στις Μεσογειακές χώρες και στην Άπω Ανατολή βλέπουμε ασθενείς αυτού του σταδίου (antiHBe θετικοί). Πρόκειται για άτομα ηλικίας άνω των 30 ετών που μολύνθηκαν κατά την παιδική ηλικία και που ακολούθησαν τις φάσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω. Αντίθετα, στη Βορειοδυτική Ευρώπη και στις ΗΠΑ, οι μολύνσεις συμβαίνουν σε μεγαλύτερες ηλικίες και οι ασθενείς βρίσκονται στη φάση της HBeAg θετικότητας. Μεταλλαγές στο HBsAg ευθύνονται για το παράδοξο πρότυπο ορισμένων ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον HBV. Οι ασθενείς αυτοί είναι HBsAg και antiHBs θετικοί. Στις περιπτώσεις αυτές τα antiHBs αντισώματα είναι ετεροτυπικά από προηγούμενη λοίμωξη (10-30% των χρόνιων Β ηπατιτίδων μπορεί να έχουν αυτό το πρότυπο).

2.1.5.Εργαστηριακά ευρήματα

Από την υπόλοιπη εργαστηριακή διερεύνηση ενδέχεται να παρατηρηθούν ελάχιστες αυξήσεις στην ALP, τη γ-GT και στη LDH, ενώ οι άλλες εξετάσεις είναι συνήθως φυσιολογικές. Καθώς η νόσος προοδεύει, τα αποτελέσματα των εργαστηριακών εξετάσεων γίνονται σταδιακά περισσότερο παθολογικά και απεικονίζονται καλύτερα από τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών.

Υψηλότερα επίπεδα AST από εκείνα της ALT υποδηλώνουν την πιθανότητα ανάπτυξης κίρρωσης, όπως άλλωστε τα υψηλά επίπεδα γ-σφαιρινών και τα χαμηλά επίπεδα λευκωματίνης στον ορό. Ο χρόνος προθρομβίνης βρίσκεται παρατεταμένος με τη μετάπτωση της νόσου σε κίρρωση. Σε ορισμένους ασθενείς ανιχνεύονται επίσης δείκτες αυτοάνοσης αντίδρασης όπως, τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA), τα αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ιών (SMA) και ρευματοειδείς παράγοντες (RF) (Dalekos 1993A, Dalekos 2002A, Gatselis 2005, Zachou 2003).

2.1.6.Θεραπεία και παρακολούθηση ασθενών

Πρόσφατα η ηπατίτιδα Β έχει γίνει μια θεραπεύσιμη ασθένεια (Buffet 2008). Οι πρόσφατες επιλογές για θεραπεία περιλαμβάνουν α-ιντερφερόνη (κλασική ή πεγκυλιωμένη), τα νουκλεοσιδικά ανάλογα (λαμιβουδίνη, τελμπιβουδίνη, εντεκαβίρη) και τα νουκλεοτιδικά ανάλογα (αδεφοβίρη και τενοφοβίρη). Παλαιότερα είχαν χρησιμοποιηθεί τα κορτικοστεροειδή (αύξηση της νοσηρότητας και θνησιμότητας), η αζαθειοπρίνη (μη αποτελεσματική), η λεβαμιζόλη (απαιτούνται περισσότερα στοιχεία), η ιντερλευκίνη-2 και τέλος ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α). Επίσης, η ιντερλευκίνη 12 και η ιντερλευκίνη 10 είχαν δειχθεί ότι εμφανίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της κάθαρσης από τον ιό, αλλά δεν έχουν ακόμη εφαρμοστεί εκτενώς στην κλινική πράξη (Rigoroulou 2005A).

Οι ιντερφερόνες είναι φυσικές πρωτεΐνες που ονομάζονται κυτταροκίνες και παράγονται από τον ανθρώπινο οργανισμό για την καταπολέμηση των ιών. Η ιντερφερόνη-α (IFN-α) παράγεται από τα λεμφοκύτταρα. Η ιντερφερόνη-β (IFN-β) παράγεται κυρίως από τους ινοβλάστες. Τέλος, η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) παράγεται από τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα. Όλες οι ιντερφερόνες εκκρίνονται ως απάντηση στις λοιμώξεις από ιούς και στην παρουσία όγκων. Αποτελούν κύριους μεσολαβητές στη φλεγμονώδη απάντηση. Ενεργοποιούν τα φυσικά κύτταρα-φονείς (NK cells) και τα μακροφάγα, ώστε να καταστρέψουν τα μολυσμένα από ιούς κύτταρα, αλλά και τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα. Η υποδόρια χορήγηση ιντερφερόνης-α για διάστημα 6-12 μηνών σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β έχει σαν αποτέλεσμα την κάθαρση του HBV-DNA και του HBeAg από τον ορό και μακροχρόνια βελτίωση των βιοχημικών και των ιστολογικών βλαβών στο 25-40% των ασθενών. Εντούτοις, δεν είναι απόλυτα γνωστό αν οι μακροχρόνιες επιπλοκές

(κίρρωση, πυλαία υπέρταση και ηπατοκυτταρικός καρκίνος) καθυστερούν στους ασθενείς που επιτυγχάνεται ύφεση της νόσου. Η θεραπεία με πεγκυλιωμένη-IFN α -2 α 180 μ g/εβδομάδα για 24 εβδομάδες επιφέρει απώλεια του HB ϵ Ag, μείωση του HBV-DNA (<500.000 copies/ml) και ομαλοποίηση της ALT σε ποσοστό 28% στο τέλος της παρακολούθησης (24 εβδομάδες μετά τη διακοπή της θεραπείας).

Οι ευνοϊκοί προγνωστικοί παράγοντες ανταπόκρισης της χρόνιας ηπατίτιδας Β στη θεραπεία με α -ιντερφερόνη είναι η υψηλή τιμή της ALT και η χαμηλή τιμή του HBV-DNA πριν από την έναρξη της θεραπείας, η μόλυνση από τον HBV στην ενήλικη ζωή, η μικρή διάρκεια της λοίμωξης, η λοίμωξη από το «φυσικό-άγριο» στέλεχος του HBV, η απουσία του HIV ή HDV λοίμωξης, το φύλο και η ετεροφυλοφιλική σεξουαλική συμπεριφορά. Η IFN- α αποτελεί το κλασικό και καθιερωμένο φάρμακο για τη χρόνια ηπατίτιδα Β. Όμως, η IFN- α είναι ακριβή και παρουσιάζει ανεπιθύμητες ενέργειες (Πίνακας 5) (Dalekos 1998), ενώ σημαντικό ποσοστό ασθενών δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία ή υποτροπιάζει μετά τη διακοπή της. Επίσης σε ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση και σε ανοσοκατεσταλμένους δεν μπορεί να χορηγηθεί INF- α λόγω σημαντικών και σοβαρών επιπλοκών.

Πίνακας 5: Παρενέργειες ιντερφερόνης.

Ήπιες	Σοβαρές
Πυρετός, μυαλγίες, κόπωση, κακουχία, επαγωγή αυτοάνοσων αντιδράσεων, δερματολογικές διαταραχές.	Μυελοτοξικότητα, ψύχωση, κατάθλιψη, θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα.

Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα είναι ανάλογα γουανοσίνης με αξιοσημείωτη δραστικότητα ενάντια στην πολυμεράση του HBV-DNA in vitro και in vivo. Ενσωματώνονται στο DNA του ιού κατά τον πολλαπλασιασμό του, αναστέλλοντας την αντίστροφη μεταγραφάση/πολυμεράση του HBV και διακόπτοντας την επιμήκυνση της ιικής αλυσίδας. Η μακροχρόνια χρήση τους οδηγεί σε καταστολή της αντιγραφής του ιού και μειωμένους ρυθμούς ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Fourel 1994). Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα δεν παρουσιάζουν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες,

μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε τελικού σταδίου ηπατική νόσο, σε ανοσοκατεσταλμένους, μεταμοσχευμένους και είναι δραστικά έναντι και άλλων ιών .

Η λαμβουδίνη είναι νουκλεοσιδικό ανάλογο της κυτοσίνης, χορηγούμενη σε ημερήσια δόση 100 mg (δισκία Zeffix) σε ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη. Η λαμβουδίνη παρουσιάζει έντονη αντιική δράση έναντι του HBV, προκαλώντας βιοχημική, ιολογική και ιστολογική ύφεση της νόσου. Δρα σε HBeAg θετικούς και αρνητικούς ασθενείς, ανεξάρτητα από την ανοσολογική τους επάρκεια ή από τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών και της ιαιμίας (Tiples 1996, Tillmann 2006).

Η αδεφοβίρη σε ημερήσια δόση 10 mgr (adefovir dipiroxil, Hepsera®) είναι νουκλεοτιδικό παράγωγο αδενίνης (Marcellin 2003). Είναι δραστική έναντι του φυσικού HBV και των μεταλλαγμένων στελεχών (YMDD) που αναδύονται κατά τη θεραπεία με λαμβουδίνη (Schif 2003).

Η εντεκαβίρη (entecavir, Baraclude®) είναι ισχυρό αντι-ϊικό νουκλεοσιδικό ανάλογο της γουανοσίνης (Langley 2007). Είναι δραστική στο φυσικό και λιγότερο στον ανθεκτικό στη λαμβουδίνη HBV (Chang 2006). Χορηγείται σε ημερήσια δόση 0,5 mg και σε ανθεκτικά στη λαμβουδίνη στελέχη σε δόση 1 mg ημερησίως. Δεν προκαλεί ανάδυση ανθεκτικών στελεχών τουλάχιστον τα πρώτα 3 χρόνια της χορήγησης, ενώ στα 4 χρόνια το ποσοστό ανάπτυξης αντίστασης σε πρωτοθεραπευόμενους ασθενείς είναι 0,8% (Colopno 2006, Goulis 2008).

Η τελμπιβουδίνη (telbivudine, Sebivo®) είναι ισχυρό αντι-ϊικό νουκλεοσιδικό ανάλογο της θυμιδίνης, που χορηγείται σε δόση των 600 mg ημερησίως (Keam 2007). Η τενοφοβίρη (Viread®) που κυκλοφόρησε το 2008 παρουσιάζει δραστηριότητα στο φυσικό ιό και σε πολλά μεταλλαγμένα στελέχη των άλλων νουκλεοσιδικών-νουκλεοτιδικών αντι-ϊικών φαρμάκων, χωρίς να οδηγεί σε αντίσταση τουλάχιστον βραχυπρόθεσμα (Wong 2006).

Η εμτρισιταμπίνη, νουκλεοσιδικό ανάλογο της κυτοσίνης, παρουσιάζει πιθανότητα ανάδυσης ανθεκτικών στελεχών παρόμοια με τη λαμβουδίνη. Ωστόσο, συνιστάται σε ασθενείς με συλλοίμωξη HBV-HIV, αφού σε συνδυασμό με την τενοφοβίρη (δισκία Truvada®) παρουσιάζει ικανοποιητική αντι-ϊική δράση έναντι και των δύο ιών, χωρίς την ανάδυση ανθεκτικών στελεχών

(Lim 2006). Όταν επιλέγεται η χρήση νουκλεοσιδικού-νουκλεοτιδικού αναλόγου, η θεραπεία χορηγείται για μεγάλο χρονικό διάστημα, ιδιαίτερα σε ασθενείς χωρίς ΗΒεΑg με τον κίνδυνο να αναδυθούν ανθεκτικά ιικά στελέχη που περιορίζουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Η IFN-α δεν προκαλεί ιική αντίσταση. Η συχνότητα εκδήλωσης της αντίστασης ποικίλλει ανάλογα με το αντι-ιικό φάρμακο.

Η θεραπεία με λαμβουδίνη συσχετίζεται με εκδήλωση ιικής αντίστασης στο 70% των ασθενών στα 5 χρόνια, η αδεφοβίρη σε ποσοστό 29% στα 5 χρόνια, η εντεκαβίρη σπάνια (όμως 39% στα 4 χρόνια σε ασθενείς με προηγμένη αντίσταση στη λαμβουδίνη) και η τελμπιβουδίνη σε ποσοστό 22% στα 2 χρόνια. Οι επιπτώσεις της ανάδυσης των ανθεκτικών στελεχών περιλαμβάνουν την αύξηση της ιαιμίας (επίπεδα HBV DNA στον ορό), των τρανσαμινασών και των εκδηλώσεων ηπατικής ανεπάρκειας σε ασθενείς με προχωρημένη ηπατική νόσο (Werle 2004). Η επιλογή του αντι-ιικού φαρμάκου θα πρέπει να βασίζεται στη δραστηριότητά του, στη μείωση της ιαιμίας και στην πιθανότητα ανάδυσης ανθεκτικών στελεχών. Σε ασθενείς όπου η θεραπεία δεν προκαλεί σημαντική μείωση του ιικού πολλαπλασιασμού, ο κίνδυνος ανάδυσης ανθεκτικών στελεχών είναι μεγαλύτερος. Σε ασθενείς που λαμβάνουν αγωγή με νουκλεοσιδικά-νουκλεοτιδικά ανάλογα θα πρέπει να παρακολουθούνται τα επίπεδα της ιαιμίας τακτικά για να εντοπίζεται έγκαιρα η ιολογική διαφυγή. Σε ασθενείς με εκδήλωση αντίστασης στη λαμβουδίνη προστίθεται αδεφοβίρη ή τενοφοβίρη, ενώ σε αντίσταση στην αδεφοβίρη προστίθεται λαμβουδίνη. Συμπερασματικά, η παρακολούθηση της ιικής αντίστασης και η έγκαιρη αντιμετώπιση είναι πολύ σημαντική κατά τη διάρκεια της θεραπείας με αντι-ιικά φάρμακα (Goulis 2008, Ντουράκης 2009). Συνδυασμοί νουκλεοσιδικών-νουκλεοτιδικών αναλόγων σε μακροχρόνια χορήγηση με ή χωρίς ανοσοτροποποιητικά φάρμακα (όπως INF-α ή άλλες κυταροκίνες) μπορεί να αποτελούν το μέλλον της θεραπείας της χρόνιας HBV λοίμωξης. Σε ασθενείς με τελικού σταδίου ηπατική νόσο από τον HBV (μη αντιρροπούμενη κίρρωση), η μεταμόσχευση ήπατος σε συνδυασμό με τη χορήγηση νουκλεοσ(τ)ιδικών αναλόγων προ και μεταμοσχευτικά ώστε να προστατευθεί από επαναμόλυνση το μόσχευμα, αποτελούν τους μόνους δυνατούς θεραπευτικούς χειρισμούς με πολύ καλά αποτελέσματα. Η παρακολούθηση ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β συνίσταται στην εκτίμηση του βιοχημικού προτύπου κάθε 3-6 μήνες καθώς και του ορολογικού

και/ή ιολογικού κάθε 6-12 μήνες. Υπερηχογράφημα ήπατος και προσδιορισμός της α-FP κάθε 6-12 μήνες πρέπει να γίνεται αλλά στους κίρρωτικούς ασθενείς δεν φαίνεται να βοηθούν στην προσπάθεια ανακάλυψης πρώιμου ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Συνίσταται επίσης η αποφυγή κατανάλωσης οινοπνεύματος και ηπατοτοξικών φαρμάκων (Stefos 2009, Νταλέκος 2001).



2.2. ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C

Οι ασθενείς που εμφανίζουν ιαιμία (HCV-RNA θετικό) με ή χωρίς αντι-HCV (με ανοσοενζυμικές μεθόδους) και επίμονα παθολογική αύξηση των επιπέδων της ALT για διάστημα μεγαλύτερο των 6 μηνών θεωρούνται ότι εμφανίζουν χρόνια λοίμωξη, αν και οι διακυμάνσεις της ALT (σταθερή αύξηση, διακύμανση τύπου «γιο-γιο» ή φυσιολογικές τιμές για μακρύ χρονικό διάστημα) μπορεί να προκαλέσουν σύγχυση, όσον αφορά τη διάγνωση της χρόνιας ηπατίτιδας C. Οι περισσότεροι ασθενείς με χρόνια λοίμωξη από τον HCV είναι ασυμπτωματικοί.

2.2.1. Αιτιοπαθογένεια νόσου

Μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο, η πολυπρωτεΐνη του ιού επεξεργάζεται από τις κυτταρικές και ιικές πρωτεάσες. Οι μη δομικές πρωτεΐνες, η ελικάση και η RNA-εξαρτώμενη RNA-πολυμεράση επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό του ιού. Η συναρμολόγηση και η μορφογένεση του ιού συμβαίνει εντός του ενδοπλασματικού δικτύου των ηπατοκυττάρων. Ο πολλαπλασιασμός του ιού δεν είναι αυτός καθ' αυτός κυτταροπαθογόνος για το ηπατοκύτταρο, εκτός από το γεγονός ότι η ηπατική στεάτωση μπορεί να επάγεται από την πρωτεΐνη του πυρηνοκαψιδίου του ιού (Negro 2010). Η ηπατοκυτταρική βλάβη είναι αποτέλεσμα της επίδρασης CD8(+) κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων στα μολυσμένα ηπατικά κύτταρα (Cerny 1999). Η παραμονή του ιού και η αντοχή του στην αντίική αγωγή μπορεί να είναι αποτέλεσμα επηρεασμένης T-κυτταρικής λειτουργίας, λόγω της μόλυνσης των δενδριτικών κυττάρων (Bain 2001) ή της χαμηλής έκφρασης των ιικών αντιγόνων ή της επιλογής ιικών παραλλαγών που διαφεύγουν της ανοσολογικής απόκρισης. Ο HCV πιστεύεται ότι ξεφεύγει του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή χρησιμοποιώντας

διάφορους μηχανισμούς: (α) εμφάνιση νέων επιτόπων στα Β- και Τ-λεμφοκύτταρα, (β) την απόκρυψη σωματιδίων του ιού από τα εξουδετερωτικά αντισώματα λόγω της συσχέτισης του ΗCV με λιπίδια, (γ) την παραγωγή «δολωμάτων» όπως κενά ιικά σωματίδια τα οποία οδηγούν σε παρέκκλιση του ανοσολογικού συστήματος, (δ) την απευθείας αλληλεπίδραση ιικών αντιγόνων με τους διαμεσολαβητές του ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή, (ε) τη χρήση εξωηπατικών αποθηκών του ιού και (στ) την πιθανή βλάβη της λειτουργίας των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Bain 2001).

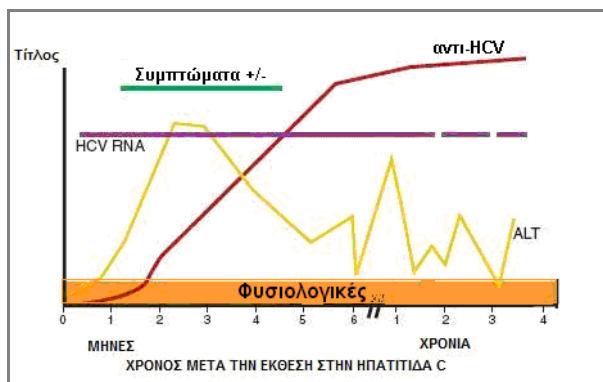
2.2.2. Διάγνωση-Συμπτώματα

Η διάγνωση γίνεται συνήθως τυχαία κατά τη διάρκεια εθελοντικής αιμοδοσίας ή σε προληπτικό εργαστηριακό έλεγχο. Λιγότεροι από το 20% των ασθενών παρουσιάζουν μη ειδικά συμπτώματα όπως, καταβολή, αδυναμία, κνησμό, αρθραλγίες και μυαλγίες. Ένα ποσοστό ασθενών μπορεί να διαγνωσθεί με αφορμή κάποιες από τις εξωηπατικές εκδηλώσεις της ηπατίτιδας C και ιδιαίτερα της μικτής ιδιοπαθούς κρουσφαιριναιμίας ή της μεμβρανουπερπλαστικής σπειραματονεφρίτιδας (Christodoulou 2001). Τα πρώτα ειδικά συμπτώματα και σημεία που σχετίζονται με τη χρόνια λοίμωξη από τον ΗCV συνήθως εμφανίζονται πολύ καθυστερημένα και ισοδυναμούν με προχωρημένη πυλαία υπέρταση και ηπατική ανεπάρκεια (ίκτερος, κίρσοραγία, ασκίτης, ηπατική εγκεφαλοπάθεια).

2.2.3.Εργαστηριακά-Ιστολογικά ευρήματα

Στον εργαστηριακό έλεγχο, τα επίπεδα της ALT παραμένουν αυξημένα και το ΗCV-RNA παραμένει θετικό (Εικόνα 24) (Rigoroulou 2005B). Εκτός των διακυμάνσεων της ALT χαρακτηριστική είναι συνήθως η παρουσία αυξημένων επιπέδων γ-GT (υψηλότερα από οποιαδήποτε άλλη μορφή χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας). Όπως και στη χρόνια ηπατίτιδα Β, καθώς η νόσος προοδεύει τα αποτελέσματα των εργαστηριακών εξετάσεων γίνονται σταδιακά περισσότερο παθολογικά και απεικονίζονται καλύτερα από τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών. Υψηλότερα επίπεδα AST από εκείνα της ALT υποδηλώνουν την πιθανότητα ανάπτυξης

κίρρωσης, όπως άλλωστε τα υψηλά επίπεδα γ-σφαιρινών, η παράταση του χρόνου προθρομβίνης και η μείωση της λευκωματίνης στον ορό (Hino 1994B).



Εικόνα 24: Διακύμανση αμινοτρανσφερασών, HCV RNA και αντισωμάτων στη χρόνια ηπατίτιδα C.

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του HCV είναι η τάση του να επάγει αυτοάνοσες αντιδράσεις σε ασθενείς με κάποια γενετική προδιάθεση είτε από μόνος του είτε σε συνδυασμό με τη φαρμακευτική αγωγή που χορηγείται (IFN- α) (Dalekos 1994, Dalekos 1995B). Έτσι, έχουν ανιχνευθεί χαμηλοί τίτλοι ποικίλων οργανοειδικών και μη οργανοειδικών αυτοαντισωμάτων στο 50-75% των ασθενών (π.χ. ANA, SMA, αντισώματα κατά καρδιολιπίνης, αντιθυροειδικά αντισώματα) (Dalekos 1994). Στο 2-7% όμως των ασθενών ανιχνεύονται αυτοαντισώματα αντι-LKM-1 τα οποία είναι ειδικά αφού χαρακτηρίζουν την AH-2. Οι τίτλοι ανίχνευσης μάλιστα είναι εξίσου υψηλοί και στη χρόνια ηπατίτιδα C. Σε σημαντικό ποσοστό ασθενών που είναι HCV/αντι-LKM-1 θετικοί ανιχνεύονται και αντισώματα κατά κυτοσολίων ήπατος τύπου 1, τα οποία θεωρούνται επίσης ειδικά της AH-2. Το αυτοαντιγόνο των αντι-LKM-1 στη χρόνια λοίμωξη από τον HCV είναι συστατικά του κυτοχρώματος P450 (κυρίως KYTP4502D6 αλλά και το KYTP4502A6) (Bogdanos 2008, Dalekos 1993A, Dalekos 1995B, Dalekos 1999, Dalekos και Makri 2002, Dalekos και Zachou 2002, Dalekos 2003, Zachou 2004A).

Δεν είναι γνωστή η σημασία της παρουσίας αντισωμάτων κατά συστατικών του KYTP450 (ένζυμα φάσης 1 του μεταβολισμού ουσιών που οδηγούν σε υδροξυλίωση) στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, αν δηλαδή αποτελεί ειδικό φαινόμενο της λοίμωξης από τον HCV ή αν είναι αποτέλεσμα μιας γενικευμένης μη ειδικής Β-λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης. Στοιχεία υπέρ μιας ειδικής απόκρισης κατά του KYTP450 στη χρόνια ηπατίτιδα C πηγάζουν από το γεγονός της απουσίας αυτών των αυτοαντισωμάτων σε άλλες χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες, την ανάπτυξη αντι-

LKM-1 μετά από μεταμόσχευση ήπατος και τέλος από την επαγωγή ηπατικών αυτοάνοσων φαινομένων σε ορισμένους HCV/αντι-LKM-1 θετικούς ασθενείς μετά από θεραπεία με IFN-α (Bogdanos 2008, Dalekos 2002A, Rigoroulou 2008, Zachou 2004A). Τα ιστολογικά ευρήματα χωρίς να είναι παθογνωμικά εμφανίζουν ορισμένες ιδιαιτερότητες όπως για παράδειγμα η παρουσία λίπωσης, λεμφοκυτταρικών αθροίσεων και χολοστατικού κυρίως τύπου βλάβες των χοληφόρων και κοκκιώματα.

2.2.4.Κλινικές μορφές

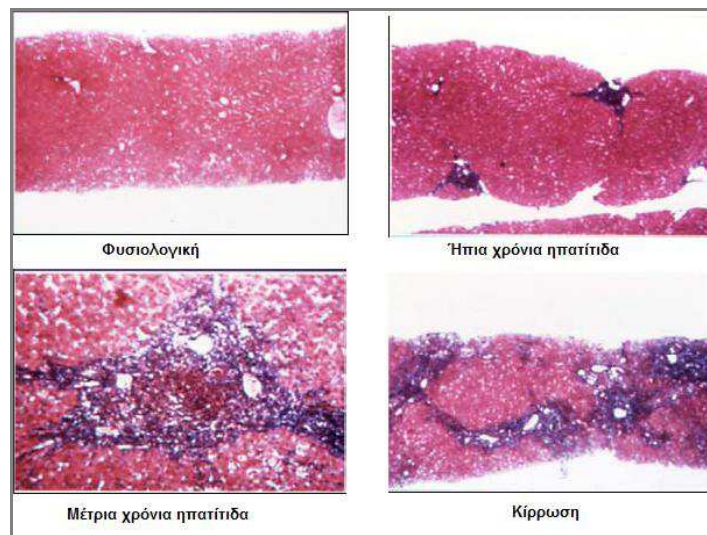
Με βάση κλινικοεργαστηριακά, ιολογικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά, η χρόνια ηπατίτιδα C μπορεί να διακριθεί σε τρεις υποκατηγορίες: χρόνια ηπατίτιδα με φυσιολογικές τρανσαμινάσες, ήπια χρόνια ηπατίτιδα και μέτρια προς σοβαρή χρόνια ηπατίτιδα C.

Χρόνια ηπατίτιδα με φυσιολογικές τρανσαμινάσες: Περίπου 25% των ασθενών έχουν συνεχώς φυσιολογικές τιμές ALT. Οι ασθενείς αυτοί είναι συνήθως ασυμπτωματικοί και στη βιοψία ήπατος έχουν συνήθως ήπια χρόνια ηπατίτιδα (Εικόνα 25). Εντούτοις, 10% των ασθενών με φυσιολογικές αμινοτρανσφεράσες μπορεί να εμφανίζουν κίρρωση στη βιοψία ήπατος (burn-out cirrhosis). Η ομάδα αυτή εμφανίζει μακρά πορεία της νόσου.

Ήπια χρόνια ηπατίτιδα C: Η δεύτερη ομάδα των ασθενών χαρακτηρίζεται από αυξημένες τιμές ALT με διακυμάνσεις. Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνεται το 50% των πρωτοδιαγνωσθέντων ασθενών. Παρόλο που είναι κυρίως ασυμπτωματικοί, συχνά αναφέρουν την εμφάνιση κόπωσης. Στη βιοψία ήπατος ανιχνεύονται περιοχές με μέτρια νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα και ελαφρά ή μέτρια ίνωση. Αυτή η ομάδα συνήθως εξελίσσεται βραδέως και ο μακροπρόθεσμος κίνδυνος για την ανάπτυξη κίρρωσης είναι χαμηλός. Ο τύπος αυτός είναι ο πιο συχνός σε νεαρούς ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C.

Μέτρια-σοβαρή χρόνια ηπατίτιδα C: Η τρίτη ομάδα ασθενών περιλαμβάνει περίπου το 25% των πρωτοδιαγνωσθέντων ασθενών. Οι ασθενείς αυτοί είναι δύσκολο να διακριθούν από αυτούς με ήπια χρόνια ηπατίτιδα C. Η αύξηση των τιμών της ALT δεν είναι καλός προγνωστικός παράγοντας. Όταν παρατηρείται θρομβοκυτταροπενία, αύξηση των επιπέδων της γ-GT, της φερριτίνης ή των γ-σφαιρινών τότε συνήθως πρόκειται για προχωρημένη νόσο. Η βιοψία ήπατος

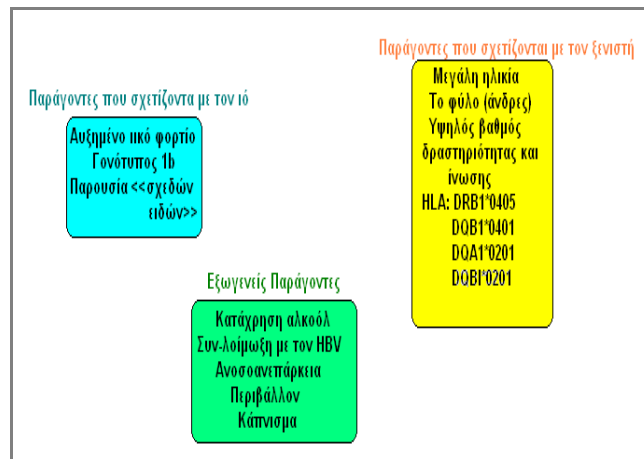
είναι ο πιο ακριβής τρόπος για την αναγνώριση τέτοιων μορφών χρόνιας ηπατίτιδας C καθώς και για τον προσδιορισμό της πρόγνωσης. Εμφανίζεται συνήθως έντονη νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα και εκτεταμένη ίνωση ή ακόμα και κίρρωση (Hoofnagle 1997).



Εικόνα 25: Ιστολογική εξέλιξη χρόνιας ηπατίτιδας C.

2.2.5. Φυσική εξέλιξη

Η αυτόματη ύφεση της χρόνιας ηπατίτιδας C με εξαφάνιση του HCV-RNA από τον ορό και το ήπαρ είναι εξαιρετικά σπάνιο φαινόμενο. Η χρόνια ηπατίτιδα C δεν είναι προοδευτικά επιδεινούμενη νόσος σε όλους τους ασθενείς. Χρόνια ηπατίτιδα C με ιαιμία αναπτύσσεται στο 85-90% των ασθενών, 70% των οποίων αναπτύσσουν κάποιο βαθμού ηπατική βλάβη και αντιμετωπίζουν πλέον τον κίνδυνο για εξέλιξη σε κίρρωση. Ο μέσος χρόνος για την εξέλιξη της λοίμωξης σε κίρρωση είναι 30 έτη, αλλά υπάρχουν δύο υποομάδες: (α) ασθενείς με ταχεία εξέλιξη της ίνωσης, όπου η κίρρωση αναπτύσσεται σε διάστημα μικρότερο της εικοσαετίας και (β) ασθενείς με βραδεία εξέλιξη στους οποίους η κίρρωση εμφανίζεται μετά από 50 έτη από τη μόλυνση (Poynard 1997). Η εξέλιξη της ηπατικής νόσου επηρεάζεται από παράγοντες που αφορούν τον ιό και το ξενιστή (Εικόνα 26).

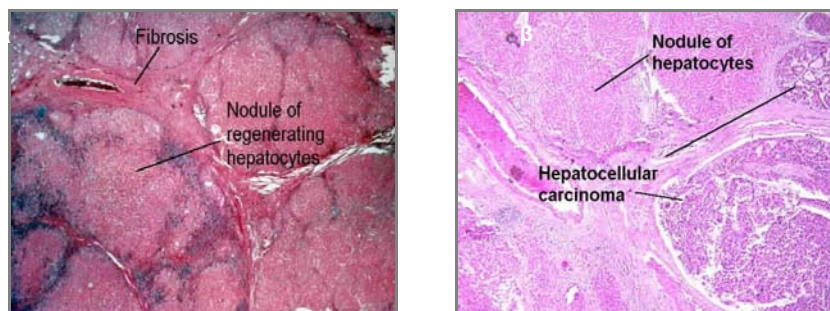


Εικόνα 26: Παράγοντες εξέλιξης ηπατίτιδας C.

Η κίρρωση από ηπατίτιδα C μπορεί να είναι λανθάνουσα για αρκετά χρόνια. Κλινικά συμπτώματα πυλαίας υπέρτασης ή ηπατικής ανεπάρκειας εμφανίζονται σε τελικά στάδια. Ασυμπτωματική κίρρωση συχνά ανακαλύπτεται μετά από βιοψία ήπατος. Σε πολλές περιπτώσεις, η κίρρωση διαγιγνώσκεται κατά το στάδιο της μη αντιρροπούμενης μορφής της νόσου ή/και του ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Η κλινική εξέταση σε συνδυασμό με το υπερηχογράφημα ήπατος και τις βιοχημικές εξετάσεις μπορούν να βοηθήσουν στην πιθανότητα ανάπτυξης κίρρωσης, ωστόσο η διάγνωση της κίρρωσης δεν παύει να είναι σχεδόν αποκλειστικά ιστολογική. Σε αντιρροπούμενη κίρρωση, το ποσοστό θανάτων που σχετίζεται με την ηπατική νόσο είναι 9% στην πενταετία και 21% στη δεκαετία, ενώ σε μη αντιρροπούμενη κίρρωση η πενταετής επιβίωση μειώνεται στο 20%. Η θνητότητα από πυλαία υπέρταση, ηπατική ανεπάρκεια ή ηπατοκυτταρικό καρκίνο στα πλαίσια κίρρωσης από τον HCV είναι 2-5% κάθε χρόνο.

Ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου (Εικόνα 27) μπορεί να συμβεί σπάνια και σε μη κίρρωτικό ήπαρ (Polizos 2003). Η εμφάνιση ηπατοκυτταρικού καρκίνου σε κίρρωτικούς δικαιολογεί την παρακολούθηση αυτών των ασθενών με υπερηχογράφημα ήπατος και προσδιορισμό της α-FT ανά 6 μήνες. Ο σχετικός κίνδυνος της ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου σε HCV-RNA θετικούς κίρρωτικούς ασθενείς είναι 100 φορές μεγαλύτερος από ότι στο γενικό πληθυσμό (Hoofnagle 1997) και υπολογίζεται ότι ανάμεσα σε ασθενείς με κίρρωση λόγω ηπατίτιδας C ο κίνδυνος ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου είναι 1-4% κάθε χρόνο. Μακροχρόνια, η πρόγνωση της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV είναι χειρότερη από την

πρόγνωση της χρόνιας ηπατίτιδας Β. Αντίθετα, η ταχύτητα εμφάνισης των επιπλοκών είναι σαφώς βραδύτερη στη χρόνια νόσηση από τον HCV σε σχέση με την αντίστοιχη της ηπατίτιδας Β.



Εικόνα 27: α) Κίρρωση: Αναγεννητικά οζίδια διαχωριζόμενα μεταξύ τους με ινώδη διαφράγματα. β) Καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HES x 35).

5.2.6.Θεραπεία και παρακολούθηση

Θεραπεία συνιστάται αναμφίβολα για όσους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C έχουν αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης σε κίρρωση. Οι ασθενείς αυτοί έχουν αντιρροπούμενη ηπατική νόσο και χαρακτηρίζονται από (α) αυξημένα επίπεδα ALT κα/ή AST (ALT/AST > ανώτερη φυσιολογική τιμή), (β) ανιχνεύσιμο HCV-RNA ορού (>50 IU/ml) και γ) τουλάχιστο μέτριου βαθμού ίνωση και τουλάχιστο μετρίου βαθμού νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα σε βιοψία ήπατος (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ 2008). Η παρατεταμένη ιολογική ανταπόκριση δηλαδή ή μη ανίχνευση του HCV-RNA στον ορό του ασθενούς 24 εβδομάδες μετά την ολοκλήρωση της αγωγής είναι το συνηθισμένο μέτρο ελέγχου ανταπόκρισης στη θεραπεία. Οι ασθενείς αυτοί έχουν ευνοϊκή κλινική και ιστολογική έκβαση (Lau 1998). Παράγοντες που αποτελούν αντένδειξη για θεραπεία φαίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Αντενδείξεις θεραπευτικής αγωγής με IFN-α.

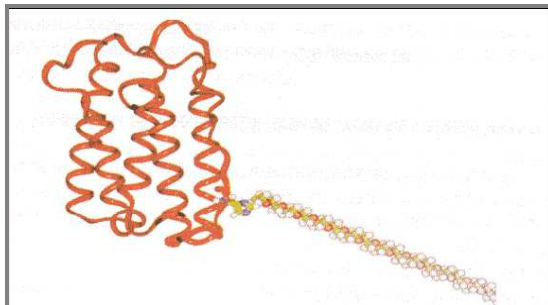
Θρομβοπενία (<80000 mm ³)
Τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια
Λευκοπενία (<3000 mm ³)
Αναιμία: Hb <12 gr/dl
Μη αντιρροπούμενη κίρρωση
Αιμοσφαιρινοπάθεια
Αυτοάνοσο νόσημα
Συμπτωματική καρδιοπάθεια
Μείζων ψυχιατρική νόσος
Κύηση

Πολλοί παράγοντες έχουν μελετηθεί ως πιθανές θεραπείες, αλλά η μόνη αποτελεσματική θεραπεία μέχρι σήμερα είναι η θεραπεία που βασίζεται στην IFN-α. Η IFN-α-2b χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για τη θεραπεία της μη-A, μη-B ηπατίτιδας το 1986, 3 χρόνια πριν απομονωθεί ο ιός της ηπατίτιδας C. Συνιστάται η χορήγηση IFN-α (επικρατέστερη δόση: 3000000 IU/τρεις φορές εβδομαδιαία υποδόρια) σε συνδυασμό με ριμπαβιρίνη (800-1200 mgr/ημέρα) για 6-12 μήνες ανάλογα με την αρχική ανταπόκριση, το γονότυπο και το ιικό φορτίο. Τα μακροχρόνια σχήματα (12 μήνες) προτιμώνται σήμερα για όλους τους γονότυπους πλην των 2 και 3, αφού τα εξάμηνα σχήματα παρά την αρχική ανταπόκριση (60-75%) ακολουθούνται από υποτροπές μετά τη λήξη της θεραπείας στο 50-75% των περιπτώσεων. Αντίθετα παρατεταμένη ιολογική και βιοχημική ύφεση (διάρκεια ύφεσης>6 μήνες μετά το τέλος της θεραπείας) μετά από τα μακροχρόνια θεραπευτικά σχήματα επιτυγχάνεται στο 40-50% των ασθενών (Jaeckel 2001).

Οι παρενέργειες της ριμπαβιρίνης περιλαμβάνουν κυρίως την εκδήλωση αιμόλυσης (25%) γεγονός που αποκλείει τη χρήση του φαρμάκου σε ασθενείς με αναιμία οποιασδήποτε αιτιολογίας (π.χ αιμοσφαιρινοπάθειες, νεφρική ανεπάρκεια). Όπως στη χρόνια ηπατίτιδα Β έτσι και στη χρόνια λοίμωξη από τον HCV συνιστάται η αποφυγή κατανάλωσης οινοπνεύματος και ηπατοτοξικών φαρμάκων. Συνιστάται επίσης ο προφυλακτικός εμβολιασμός κατά του HAV και του HBV καθώς σε περίπτωση μόλυνσης από τους παραπάνω ιούς έχει παρατηρηθεί εκδήλωση οξείας κεραυνοβόλου ηπατίτιδας με πολύ μεγάλη θνητότητα σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C. Σε τελικού σταδίου νόσο οι ασθενείς οδηγούνται σε μεταμόσχευση ήπατος.

Σημαντικό πλεονέκτημα στη θεραπεία της HCV λοίμωξης προσέφερε η εισαγωγή της Peg-IFN-α (Εικόνα 28). Στην περίπτωση αυτή το μόριο της IFN-α συνδέεται με μια ουσία που καλείται πολυαιθυλενική γλυκόλη. Η προσθήκη ενός πολυαιθυλενικού γλυκολ-άκρου στο μόριο της IFN-α προάγει τη βιολογική δραστικότητα και παρατείνει την ημίσεια ζωή του φαρμάκου (Manns 2001). Έτσι, εξαιρουμένων των αντενδείξεων, η βασική θεραπεία των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C σήμερα είναι η συνδυασμένη αγωγή με Peg-IFN-α και ριμπαβιρίνη. Ενώ λοιπόν ο συνδυασμός κλασσικής IFN-α με ριμπαβιρίνη για 48 εβδομάδες επιτύχανε ιολογική ανταπόκριση σε ποσοστό 43% του συνόλου των ασθενών, ο συνδυασμός Peg-IFN-α με ριμπαβιρίνη για το ίδιο διάστημα φαίνεται να βελτιώνει τα ποσοστά σε 54-56% (περίπου 45% των ασθενών με γονότυπο 1 και 80%

των ασθενών με γονότυπο 2 ή 3), όπως παρουσιάζεται σε δύο πολυκεντρικές, τυχαίοποιημένες μελέτες, όπου στη μία χρησιμοποιήθηκε η Peg- $\text{INF-}\alpha$ -2b και στην άλλη η Peg- $\text{INF-}\alpha$ -2a (Mimidis 2006, Shiffman 2001).



Εικόνα 28. Το μόριο της πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης.

3. ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΑ

Τα επακόλουθα της χρόνιας χρήσης οινοπνεύματος αποτελούν την τέταρτη πιο συχνή αιτία θανάτου σε παγκόσμια κλίμακα. Ο κίνδυνος ανάπτυξης αλκοολικής ηπατοπάθειας αυξάνεται σημαντικά όταν η ημερήσια κατανάλωση οινοπνεύματος υπερβεί τα 40-60 γρ για τους άνδρες και τα 20 γρ (μια μπύρα/ημέρα) για τις γυναίκες. Ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται κατά 25 φορές όταν η κατανάλωση υπερβεί τα 100 γρ την ημέρα. Η μορφή εξάλλου υπό την οποία καταναλίσκεται το οινόπνευμα δεν επηρεάζει την ηπατοτοξική του δράση (π.χ. η μπύρα είναι εξίσου τοξική όσο και ένα “σκληρό” ποτό αρκεί να περιέχει την ίδια ποσότητα καθαρού οινοπνεύματος). Σημαντικοί παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης αλκοολικής ηπατοπάθειας είναι οι γενετικοί πολυμορφισμοί των μεταβολικών ένζυμων του οινοπνεύματος, το φύλο (γυναίκες), ταυτόχρονη έκθεση σε άλλους ηπατοτοξικούς παράγοντες (φάρμακα, ξеноβιοτικές ουσίες κ.α.), ταυτόχρονες λοιμώξεις από ηπατοτρόπους ιούς (ιδιαίτερα ηπατίτιδας B και C), ανοσολογικοί παράγοντες και η κατάσταση θρέψης. Ο αλκοολισμός παρουσιάζει αυξημένη επίπτωση μεταξύ μελών της ίδιας οικογένειας. Ποικίλα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας I και II έχουν συσχετιστεί με την αλκοολική ηπατοπάθεια. Η χρόνια κατανάλωση οινοπνεύματος επάγει τη δραστικότητα των μικροσωμικών ενζύμων με αποτέλεσμα τον αυξημένο μεταβολισμό φαρμάκων και ξеноβιοτικών ουσιών σε δυνητικά τοξικούς μεταβολίτες. Χαρακτηριστικό αποτελεί η εκδήλωση σοβαρού βαθμού ηπατοτοξικότητας σε

αλκοολικούς ασθενείς μετά από λήψη ακεταμινοφαίνης (ακόμη και σε φυσιολογικές δόσεις του φαρμάκου).

3.1. Μεταβολισμός της αιθανόλης

Η αιθανόλη μεταβολίζεται εξολοκλήρου από το ήπαρ, ενώ μικρό μέρος της που δεν υπερβαίνει το 10% αποβάλλεται αναλλοίωτο από τους νεφρούς, τους πνεύμονες και τον ιδρώτα. Πριν από το βασικό μεταβολισμό της στο ήπαρ, η αιθανόλη υφίσταται έναν πρώτο μεταβολικό «ηθμό» στο στομάχι από την αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) του στομάχου. Η δραστηριότητα του ενζύμου αυτού είναι μικρότερη στις γυναίκες υποδεικνύοντας ότι το ήπαρ των γυναικών επιβαρύνεται μάλλον με μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης σε σχέση με άνδρες που έχουν καταναλώσει την ίδια ποσότητα οινοπνεύματος. Ο μεταβολισμός της αιθανόλης στο ηπατικό κύτταρο δεν ρυθμίζεται από μηχανισμό παλίνδρομης αλληλεξάρτησης, με αποτέλεσμα όση ποσότητα αιθανόλης προσφέρεται στο ηπατικό κύτταρο να οξειδώνεται σε βάρος άλλων ουσιών που φυσιολογικά μεταβολίζονται στο ήπαρ (μέγιστη ικανότητα ημερήσιου μεταβολισμού αιθανόλης από το ήπαρ: 160-180 γραμ). Η αιθανόλη οξειδώνεται πρώτα σε ακεταλδεΐδη κυρίως μέσω της ADH που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και τα κυτοσόλια των ηπατοκυττάρων, αλλά και μέσω του κυτοχρώματος P450 2E1 (KYTP2E1) που βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στη συνέχεια μετατρέπεται σε ακετοξεϊκό οξύ μέσω της αφυδρογονάσης της ακεταλδεΐδης (ALDH) και ιδιαίτερα του ισοενζύμου 2 της αλκοολικής αφυδρογονάσης (ALDH2) όπως φαίνεται παρακάτω.

Η οξείδωση της αιθανόλης από την ADH συντελείται με συνεχή κατανάλωση NAD που ανάγεται σε NADH, με αποτέλεσμα τη σταθερή αύξηση του λόγου NADH/NAD⁺ και επομένως τη σταθερή αύξηση (σε πλεόνασμα) των παραγόμενων ιόντων υδρογόνου (H⁺). Στην αύξηση αυτή αποδίδεται σειρά μεταβολικών διαταραχών που παρατηρούνται κυρίως μετά από μακροχρόνια κατάχρηση οινοπνεύματος όπως η αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέος, η μειωμένη απέκκριση ουρικών αλάτων, η υπερουριχαιμία (μπορεί να κυμαίνεται από ασυμπτωματική μέχρι την πλήρη έκφραση οξείας ουρικής αρθρίτιδας), η εμφάνιση υπερτριγλυκαιριδαιμίας και κέτωσης, η αυξημένη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων στα ηπατικά κύτταρα (λιπώδες ήπαρ του αλκοολισμού) και η

διαταραχή μεταβολισμού των πορφυρινών με την εμφάνιση όψιμης δερματικής πορφυρίας (Lucey 2009).

3.2 Αιτιοπαθογένεια νόσου

Η χρόνια κατανάλωση οινοπνεύματος συμβάλλει στην απελευθέρωση ενδοτοξινών από συγκεκριμένα βακτήρια του εντέρου που μετακινούνται από το έντερο στην κυκλοφορία του αίματος και στο ήπαρ. Αυτά με τη σειρά τους συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer. Τα μακροφάγα που ενεργοποιούνται από μικροοργανισμούς ή τις τοξίνες τους συμβάλλουν στην παραγωγή φλεγμονωδών κυταροκινών και του TNF- α (Thurman 1998). Από διάφορες μελέτες έχειδειχθεί ότι τα μιτοχόνδρια που εκτίθενται στον TNF- α υπερπαραγάγουν τις ελεύθερες ρίζες και αυξάνεται η διαπερατότητα τους (Pastorino 2000). Επίσης, η ακεταλδεΐδη είναι δραστικό μόριο και ασκεί άμεση τοξική δράση μέσω μεταβολικών, οξειδωτικών, κυτταροτοξικών και φλεγμονωδών ή ινωτικών μηχανισμών. Ανιχνεύσιμα επίπεδα ακεταλδεΐδης βρίσκονται στις ηπατικές φλέβες και στον εκπνεόμενο αέρα αλκοολικών, πιθανότατα ως αποτέλεσμα της διαταραγμένης ηπατικής λειτουργίας που συνδυάζεται με τη μειωμένη δραστικότητα της αλκοολικής ηπατοπάθειας. Αναλυτικοί πιθανοί ηπατοτοξικοί μηχανισμοί είναι οι παρακάτω:

1. Μεταβολικοί: Η κατανάλωση του οξυγόνου για τη διάσπαση της αιθανόλης στο ήπαρ είναι πολύ υψηλή, γύρω στα 75% της πρόσληψης του οξυγόνου των ηπατοκυττάρων και χρησιμοποιείται για τον οξειδωτικό μεταβολισμό του αλκοόλ. Έτσι η επιδείνωση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια συμβάλλει στο να είναι τα ηπατοκύτταρα σε μια κατάσταση σχετικής υποξίας. Επίσης, ο μεταβολισμός της αιθανόλης συμβάλλει στη δημιουργία του νικοτινάμιδου αδένινου δινουκλεοτιδίου (NADH) που προάγει τη στεάτωση με το να ενεργοποιεί τη σύνθεση των λιπαρών οξέων και να αντιτίθεται στην οξειδωσή της (Nagata 2007).

2. Οξειδωτικοί: Το συνδεδεμένο με το αλκοόλ οξειδωτικό στρες προσδιορίζεται από την υπερπαραγωγή της υπεροξειδικής ρίζας από τις παρακάτω πηγές: α) Οξειδάση της ξανθίνης και οξειδάση της ακεταλδεΐδης. Η δραστικότητα της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης υπερισχύει της δραστικότητας της οξειδάσης της ξανθίνης στο φυσιολογικό ήπαρ. Όμως σε ποντίκια η χορήγηση

αιθανόλης φαίνεται να οδηγεί σε αναστολή της δραστηριότητας της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης, υπέρ της οξειδάσης της ξανθίνης που συμβάλλει στην υπερπαραγωγή της υπεροξειδικής ρίζας. β) Η μικροσωμική αναγωγή του NADH. Στα ζώα που τρέφονται με αιθανόλη χρόνια (για 4-5 εβδομάδες), η αλληλεπίδραση με το σίδηρο στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη συμβάλλει στην αυξανόμενη παραγωγή ελευθέρων ριζών. γ) Η β-οξειδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων. δ) Η μεγάλου βαθμού επαγωγή της δραστηριότητας του ΚΥΤΡ 2E1 από το μεταβολισμό της αιθανόλης οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Albano 1991).

Ο σημαντικός παθογενετικός ρόλος του ΚΥΤΡ 2E1 στην αλκοολική ηπατοπάθεια ενισχύεται από α) τη σοβαρού βαθμού ηπατοτοξικότητα (με χαρακτηριστική κεντρολοβιακή καταστροφή), που παρουσιάζουν οι ασθενείς με αλκοολική νόσο του ήπατος μετά από έκθεση σε διάφορους παράγοντες που μεταβολίζονται από το ΚΥΤΡ 2E1 και β) από τις χαρακτηριστικές αρχικές ιστολογικές βλάβες που παρατηρούνται στην αλκοολική νόσο του ήπατος και οι οποίες αντιπροσωπεύουν περιοχές του ήπατος με αυξημένη έκφραση και δραστηριότητα του ΚΥΤΡ 2E1. Επίσης στις παραπάνω ιστολογικές δομές του ήπατος υπάρχει εκσεσημασμένη ανεπάρκεια γλουταθειόνης, αποτέλεσμα της χρόνιας κατανάλωσης οινοπνεύματος. Έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες για να υπολογίσουν την κατάσταση της ηπατοκυτταρικής γλουταθειόνης μετά από έκθεση στην αιθανόλη. Πράγματι, αποτελέσματα από μελέτες σε τρωκτικά έχουν δείξει ότι η οξεία και χρόνια έκθεση στην αιθανόλη προκαλεί χρονική και δόσοεξαρτώμενη μείωση της ηπατικής γλουταθειόνης (Masini 1994, Shaw 1981).

3.Κυτταροτοξικοί: Αυτοάνοσες αντιδράσεις κατά ηπατικών αντιγόνων όπως παραλλαγμένων πρωτεϊνών από τη δράση της ακεταλδεΐδης και της αλκοολικής υαλίνης του Mallory πιστεύεται ότι σχετίζονται με τη συνεχιζόμενη ηπατική καταστροφή σε ασθενείς που διέκοψαν το οινόπνευμα. Οι πιο σημαντικές αλδεΐδες που συνδέονται με τις πρωτεΐνες του ήπατος είναι η ακεταλδεΐδη και η Μηλονική διαλδεΐδη (MDA). Οι τελευταίες αντιδρούν με τις πρωτεΐνες και δημιουργούν υβριδικά πρωτεϊνικά προθέματα, που ορίζονται ως MAA (MalonaldeydeAcetaldeydeAdducts) προθέματα. Τα MAA προθέματα παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αλκοολικής ηπατικής βλάβης. Η in vitro επώαση των απομονωμένων ηπατικών ενδοθηλιακών κυττάρων (HEK) με τα MAA

προθέματα έχει δειχθεί να επάγει την έκκριση αρκετών κυτταροκινών και χυμογόνων, συμπεριλαμβάνοντας τον TNF- α , τη χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων και τη φλεγμονώδη πρωτεΐνη 2 των μακροφάγων. Επιπρόσθετα η έκθεση των ΗΕΚ στα ΜΑΑ προθέματα ρυθμίζει θετικά την έκφραση των μορίων πρόθεσης όπως είναι η L-σελεκτίνη και η P-σελεκτίνη. Τα ΜΜΑ προθέματα επάγουν μια ισχυρή ανοσιακή απάντηση, καταλήγοντας στη δημιουργία αντισωμάτων έναντι των ΜΑΑ επιτόπων (νεοαντιγόνα) καθώς και στην πρωτεΐνη φορέα (αυτοαντιγόνα) (Rolla 2000). Επίσης έχουν βρεθεί αντισώματα ενάντια της ADH (May 1997) και του KYT P4502E1.

4. Φλεγμονώδεις η ινωτικοί: Η υπερπαραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1, IL-6, IL-8 και TNF- α) αποτέλεσμα ενεργοποίησης των κυττάρων Kupffer έχει συσχετισθεί με την έκταση της ηπατικής βλάβης, αλλά και με την αυξημένη θνητότητα σε ασθενείς που διέκοψαν το οινόπνευμα (Tilg 2000). Τα περικολποειδικά, λιποαθροιστικά κύτταρα Ito εντοπίζονται στο χώρο του Disse, αλλά και στα τελικά ηπατικά και πυλαία φλεβίδια. Σήμερα αποκαλούνται ηπατικά «αστεροειδή» κύτταρα (hepatic stellate cells, HSC). Αποτελούν το 15% των μη παρεγχυματικών κυττάρων του ήπατος και αποθηκεύουν τη βιταμίνη Α. Όταν διεγερθούν μετατρέπονται φαινοτυπικά σε μυοϊνοβλάστες, παράγοντας θεμελιώδεις ουσίες για τη διεργασία της ινογέννεσης, όπως το κολλαγόνο τύπου I, III και IV, καθώς επίσης τη φιμπρονεκτίνη, τη λαμίνη και τις πρωτεογλυκάνες. Πιστεύεται ότι τα κύτταρα αυτά εμπλέκονται στη διαδικασία της ίνωσης μετά από διέγερση τους από την ακεταλδεΐδη, από παράγωγα υπεροξειδωσής λιπιδίων και τέλος από διάφορες φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (Tuma 2002).

3.3. Ιστοπαθολογικές μορφές

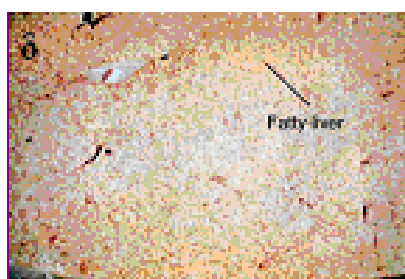
Η αλκοολική νόσος του ήπατος περιλαμβάνει 3 βασικές ιστοπαθολογικές μορφές: α) το λιπώδες ήπαρ του αλκοολισμού (καλείται και λιπώδης «μεταμόρφωση» ή λιπώδης διήθηση ή στεάτωση του ήπατος), β) την αλκοολική ηπατίτιδα ή αλκοολική στεατοηπατίτιδα ή αλκοολική στεατονέκρωση και γ) την αλκοολική κίρρωση του ήπατος, που συχνά συνυπάρχει με τις άλλες δυο μορφές (Εικόνα 29)



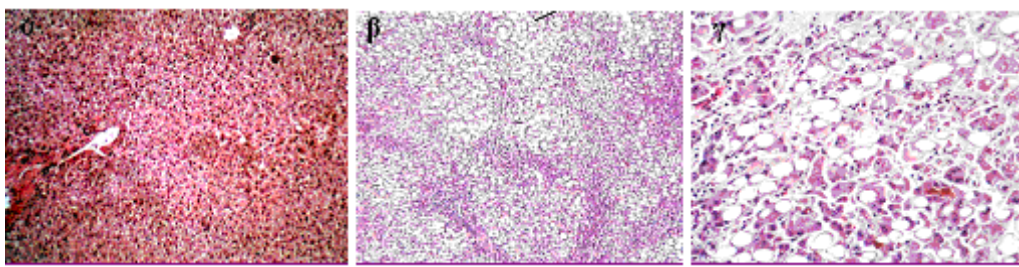
Εικόνα 29: Ιστοπαθολογικές μορφές της αλκοολικής νόσου.

3.3.1 Λιπώδες ήπαρ του αλκοολισμού

Η βιοψία ήπατος είναι διαγνωστική αλλά σπάνια απαιτείται (Εικόνα 30). Παρατηρείται μεγαλοφυσσαλιδώδης στεάτωση με απώθηση του πρωτοπλάσματος (Εικόνα 31γ) και του πυρήνα του ηπατοκυττάρου στην περιφέρεια, δίνοντας τη χαρακτηριστική εικόνα «σφραγιστήρα δακτυλίου» ενώ σπανιότερα παρατηρείται μικροφυσσαλιδώδης διήθηση (Εικόνα 31β). Δεν αποτελεί προστάδιο της ηπατικής κίρρωσης και γενικώς είναι κατάσταση αναστρέψιμη, αν βεβαίως γίνει διακοπή της χρήσης οινοπνεύματος (εντός ημερών υποχωρούν οι κλινικές εκδηλώσεις και εντός 2-3 εβδομάδων οι ιστολογικές βλάβες) (Maher 2002).



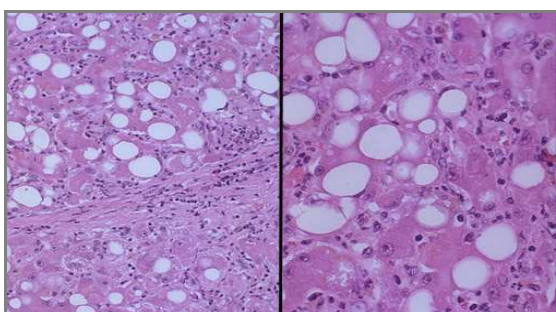
Εικόνα 30: Μακροσκοπική εικόνα λιπώδης διήθησης.



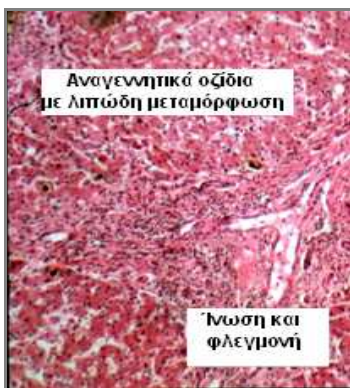
Εικόνα 31: Ιστολογική απεικόνιση λιπώδους ήπατος α) Φυσιολογικό ήπαρ, β) μικροφυσσαλιδώδης στεάτωση, γ) μεγαλοφυσσαλιδώδης στεάτωση.

3.3.2.Αλκοολική ηπατίτιδα

Πρόκειται για οξεία ή χρόνια φλεγμονή του ήπατος αποτέλεσμα ηπατοκυτταρικής νέκρωσης που επάγεται από την κατάχρηση οινοπνεύματος. Αν και είναι συχνά αναστρέψιμη, αποτελεί πολλές φορές το πρόδρομο στάδιο της κίρρωσης που ακολουθεί. Οι χαρακτηριστικές βλάβες, περιλαμβάνουν συνήθως την παρουσία μεγαλοφυσουσαλιδώδους εναπόθεσης λίπους, φλεγμονώδεις διηθήσεις (κυρίως ενδολοβιακές) από πολυμορφοπύρρηνα, ηπατοκυτταρικές νεκρώσεις με ή χωρίς υαλίνη του Mallory (Εικόνα 32), αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου στα ηπατικά λοβία και μεταξύ των ηπατοκυττάρων (κυρίως στην ζώνη 3), ενώ ενίοτε μπορεί να παρατηρηθούν και σημεία αρχόμενης μικροζώδους κίρρωσης (Εικόνα 33).



Εικόνα 32: Απεικονίζεται η υαλίνη του Mallory (άσπρα κυστίδια), αλλά υπάρχουν και ουδετερόφιλα, νέκρωση των ηπατοκυττάρων (μπλέ κουκκίδες), εναπόθεση κολλαγόνου και αλλαγές στο λίπος. Αυτά τα ευρήματα είναι τυπικά οξείας αλκοολικής ηπατίτιδας.



Εικόνα 33: Παρατηρούνται γεφυροποιός ίνωση και τα αναγεννητικά οζίδια. Υπάρχει αρκετή φλεγμονή.

Η βιοψία ήπατος θέτει με ακρίβεια τη διάγνωση καθώς τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα παρατηρούνται και στους άλλους δυο τύπους της αλκοολικής ηπατοπάθειας. Επιπρόσθετα η βιοψία δίνει πληροφορίες για τον τύπο, τη βαρύτητα και την πρόγνωση της βλάβης, μια και αλλοιώσεις όπως τα γιγαντιαία μιτοχόνδρια έχουν συσχετιστεί με καλή πρόγνωση, ενώ η περικολποειδική ίνωση με κακή (Kelekis 2004).

3.4. Κλινική εικόνα

Στο λιπώδες ήπαρ του αλκοολισμού συνήθως υπάρχει μακροχρόνια χρήση οινόπνεύματος αν και μπορεί να συμβεί και μετά από βραχυχρόνια κατάχρηση. Οι ασθενείς είναι συνήθως ασυμπτωματικοί. Μικρό ποσοστό παρουσιάζει ήπια μη ειδικά συμπτώματα (βάρος στο δεξιό υποχόνδριο ή το επιγάστριο, ανορεξία, ναυτία). Ηπατομεγαλία είναι συχνό εύρημα (70%) στην αντικειμενική εξέταση (ήπαρ μαλακό, ήπια επώδυνο με ομαλό χείλος). Σπάνια μπορεί να συνδυάζεται με ίκτερο, αιμολυτική αναιμία και υπερλιπιδαιμία. Η αλκοολική ηπατίτιδα μπορεί να ποικίλλει από ασυμπτωματική ηπατομεγαλία μέχρι βαριά ηπατοπάθεια με θανατηφόρο έκβαση. Συνήθως προηγείται μικρό διάστημα έντονης κατάχρησης οινόπνεύματος. Πάνω από το 80% των ασθενών κάνουν κατάχρηση οινόπνεύματος περισσότερο από 5 έτη. Εντούτοις, ορισμένοι εμφανίζουν τα συμπτώματα μόλις ένα χρόνο μετά την έναρξη των συμπτωμάτων (απώλεια βάρους, ίκτερος και επώδυνη ηπατομεγαλία). Υπάρχει υπερδυναμική κυκλοφορία και η αρτηριακή πίεση είναι συνήθως μειωμένη. Σε ποσοστό 10-70% μπορεί να υπάρχουν επίσης σημεία από ανεπάρκεια βιταμινών και ιχνοστοιχείων (π.χ beri-beri, σκορβούτο, ερυθρά γλώσσα) διάχυτο κοιλιακό άλγος, διάρροια του τύπου της σταετόρροιας, σπληνομεγαλία, ασκίτης, πυρετός και σημεία ηπατικής εγκεφαλοπάθειας.

3.5. Εργαστηριακά ευρήματα

Στο ασθενείς που βρίσκονται στο στάδιο του λιπώδους ήπατος του αλκοολισμού παρατηρούνται μόνο στο 1/3 περίπου των ασθενών ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω: ήπια αύξηση των αμινοτρανσφερασών (συνήθως διπλάσια των ανώτερων φυσιολογικών τιμών) με υπεροχή της AST, αύξηση της γ-GT, αύξηση του MCV (μπορεί να βρεθεί και χωρίς την παρουσία αναιμίας), αύξηση του ουρικού οξέος και ηλεκτρολυτικές διαταραχές. Το υπερηχογράφημα (υπερηχογενές ή λευκό ήπαρ), η CT και το MRI ενισχύουν την κλινική διάγνωση. Στην αλκοολική ηπατίτιδα, αναιμία συνήθως μακροκυτταρική πιθανά από έλλειψη B₁₂ και φυλλικού οξέος είναι συχνό εύρημα αν και η μακροκυττάρωση στον αλκοολισμό συνήθως δεν διορθώνεται μετά από τη χορήγηση των παραπάνω βιταμινών.

Λευκοκυττάρωση με αριστερή στροφή του τύπου απαντάται στο 25-95% (σπάνια παρατηρείται λευκοπενία που ανατάσσεται μετά τη διακοπή του οινοπνεύματος). Περίπου 10% των ασθενών παρουσιάζουν θρομβοπενία αποτέλεσμα άμεσης τοξικής δράσης του οινοπνεύματος στην παραγωγή των μεγακαρυοκυττάρων ή λόγω συνυπάρχοντος υπερσπληνισμού. Υπάρχει ποιοτική ανωμαλία των αιμοπεταλίων και παράταση του χρόνου προθρομβίνης. Ο βιοχημικός έλεγχος αποκαλύπτει αύξηση της AST ενώ η ALT ακόμη και σε βαριά αλκοολική ηπατίτιδα είναι ελαφρά ή ουδόλως αυξημένη. Προσδιορισμός της μιτοχονδριακής μορφής της AST φαίνεται να είναι περισσότερο ευαίσθητη και ειδική δοκιμασία από τα ολικά επίπεδα της AST, καθώς το οινόπνευμα προκαλεί χαρακτηριστικές βλάβες στα μιτοχόνδρια. Η ALP είναι μέτρια αυξημένη, ενώ η γ-GT είναι σημαντικά αυξημένη. Η χολερυθρίνη είναι αυξημένη στο 60-90% των περιπτώσεων. Η λευκωματίνη είναι μειωμένη και αυξάνεται καθώς ο ασθενής βελτιώνεται. Οι γ-σφαιρίνες είναι αυξημένες στο 50-70% των περιπτώσεων ακόμη και σε απουσία κίρρωσης του ήπατος. Υποκαλιαιμία, υπομαγνησισαιμία, υπερτριγλυκεριδαιμία (με ή χωρίς υπερχοληστερολαιμία) και υπερουριχαιμία είναι συχνά. Χρήσιμο εργαστηριακό δείκτη για την εκτίμηση της βαρύτητας της αλκοολικής ηπατίτιδας αποτελεί ο δείκτης Maddrey ο οποίος υπολογίζεται ως ακολούθως 4,6 x παράταση χρόνου προθρομβίνης+ολική χολερυθρίνη. Αν είναι >32 σχετίζεται με βαριά νόσο και υψηλή θνητότητα (40-50%) (Νταλέκος 2001).

3.6. Επιπλοκές

Στις επιπλοκές περιλαμβάνονται η ανάπτυξη ασκίτη (υποστρέφει με τη βελτίωση της ηπατίτιδας για αυτό και δεν συνίσταται η χορήγηση διουρητικών), αιμορραγικών φαινομένων (συχνά εκδηλώνεται πρώτα ως αιμορραγία από το γαστρεντερικό) και σπάνια ηπατικής εγκεφαλοπάθειας ή ηπατονεφρικού συνδρόμου. Κλινική επιδείνωση του ασθενούς με επίταση του κοιλιακού άλγους μπορεί λανθασμένα να θεωρηθεί ως οξεία κοιλία με καταστρεπτικά αποτελέσματα αν ο ασθενής οδηγηθεί στο χειρουργείο.

3.7. Πρόγνωση

Η ετήσια θνητότητα ανέρχεται στο 7% όταν δεν υπάρχουν διαταραχές πήξης και αυξάνεται στο 18% όταν εμφανίζεται κατά τη νοσηλεία προοδευτική παράταση του χρόνου προθρομβίνης (>3 sec σε σχέση με το μάρτυρα). Η ετήσια πιθανότητα ανάπτυξης κίρρωσης υπολογίζεται σε 10-20%. Συνολικά, περίπου 50-70% των ασθενών που νόσησαν από αλκοολική ηπατίτιδα, αναπτύσσουν εντός 5-15 ετών κίρρωση ήπατος. Κακοί προγνωστικοί παράγοντες που σχετίζονται με πρόοδο σε κίρρωση αποτελούν η συνεχιζόμενη κατανάλωση οινοπνεύματος, η σοβαρού βαθμού αρχική ιστολογική βλάβη και το φύλο.

3.8. Θεραπεία

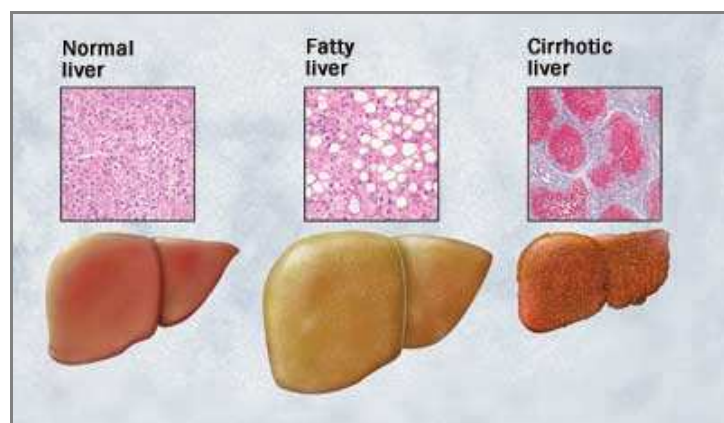
Απαιτείται πλήρης διακοπή του οινοπνεύματος και αυξημένη παροχή θερμίδων (2000-3000/ημέρα) κυρίως ως πρωτεΐνες (1 γρ λευκώματος/Κγρ Β.Σ.) αλλά και ως υδατάνθρακες (από το στόμα ή ενδοφλέβια σε περιόδους ανορεξίας και εμετών), ώστε να μειωθεί ο ενδογενής καταβολισμός των πρωτεϊνών, να προαχθεί η γλυκονεογένεση και να εμποδιστεί η εμφάνιση υπογλυκαιμίας. Η χορήγηση κορτικοστεροειδών φαίνεται να διεγείρει την όρεξη, αυξάνει την παραγωγή λευκωματίνης, αναστέλλει τη σύνθεση κολλαγόνου τύπου I, τροποποιεί την ανοσολογική απάντηση κατά νεοαντιγόνων και μειώνει την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών. Εντούτοις, πολλές μελέτες έδειξαν ότι δεν επηρεάζουν την εξέλιξη της νόσου σε ιστολογικό επίπεδο ούτε προλαμβάνουν την ηπατική ίνωση. Βασική είναι επίσης, η χορήγηση πολυβιταμινούχων σκευασμάτων ώστε να αντιμετωπιστεί η ανεπάρκεια βιταμινών (κυρίως φυλικού οξέος, θειαμίνης, ριβοφλαβίνης, νικοτινικού οξέος, πυριδοξίνης, βιοτίνης, παντοθενικού οξέος και βιταμίνης C), καθώς και η έλλειψη ιχνοστοιχείων, όπως μαγνήσιο και ψευδάργυρος. Ειδικές δίαιτες με S-αδενουσυλική μεθειονίνη (SAMe), πολυακόρεστη λεκιθίνη, αμινοξέα με διακλαδισμένη αλυσίδα και κορεσμένα λιπαρά οξέα δεν έχουν βελτιώσει μέχρι στιγμής την επιβίωση. Προσεκτική χορήγηση διαζεπάμης (βενζοδιαζεπίνη με δράση μακράς διάρκειας) ή χλωροδιαζεποξίδης (βενζοδιαζεπίνη με δράση βραχείας διάρκειας που πρέπει να προτιμάται σε ασθενείς με βαριά ηπατική νόσο) απαιτείται ως προφυλακτική αγωγή για τον κίνδυνο εμφάνισης τρομώδους παραληρήματος από στέρηση οινοπνεύματος (κατάσταση με 25% θνητότητα). Σε

περίπτωση πλήρους κλινικής έκφρασης του στερητικού συνδρόμου απαιτείται, εκτός από τη χορήγηση βενζοδιαζεπίνων, η απαραίτητη θερμιδική κάλυψη και η χορήγηση βιταμινών (κυρίως θειαμίνης για πρόληψη της εγκεφαλοπάθειας), η χορήγηση β-αναστολέων για την αντιμετώπιση της υπερδραστηριότητας του αυτόνομου νευρικού συστήματος και η χορήγηση αλοπεριδόλης για την αντιμετώπιση του παραληρήματος και της αλκοολικής ψευδαίσθησης.

4.ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΣΤΕΑΤΟΗΠΑΤΙΤΙΔΑ

Η μη αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος είναι μια διαταραχή με ιστολογικά χαρακτηριστικά της λιπώδους διήθησης που επάγεται από το αλκοόλ σε άτομα που δεν καταναλώνουν αλκοόλ. Παρατηρείται στο 3 με 25% του γενικού πληθυσμού (Angulo 2002, Clark 2006, Liou 2006, Lonardo 1999, McCullough 2002).

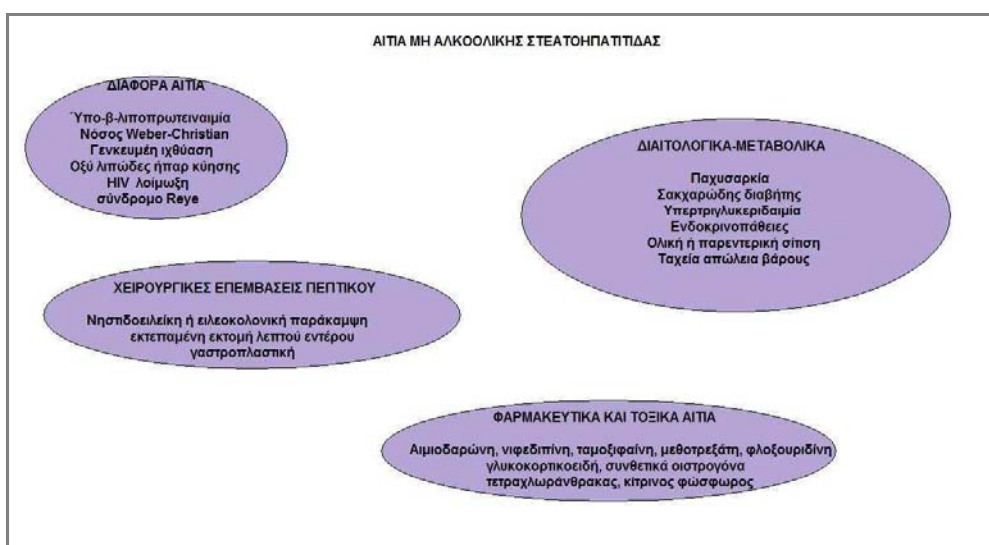
Ο όρος μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (Non Alcoholic SteatoHepatitis:NASH) δημιουργήθηκε από τον Ludwig το 1980 μετά από την περιγραφή ασθενών με χαρακτηριστικές ιστολογικές αλλοιώσεις αλκοολικής ηπατίτιδας, οι οποίοι όμως δεν έκαναν χρήση οινοπνεύματος. Ο όρος «μη αλκοολική νόσος του λιπώδους ήπατος» (Non Alcoholic Fatty Liver Disease:NAFLD) καλύπτει ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων που κυμαίνονται από τη συσσώρευση του λίπους (λιπώδες ήπαρ) στη φλεγμονή και ίνωση (NASH) και τελικά στην κίρρωση και στις κλινικές συνέπειες της (π.χ.ηπατοκυτταρικός καρκίνος) (Εικόνα 34).



Εικόνα 34: Η κλινική εξέλιξη της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας.

Η εξέλιξη από το ένα στάδιο στο επόμενο σχετίζεται με γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η παρουσία λίπους στο ήπαρ είναι γνωστό ότι ακολουθεί μια καλοήγη πορεία, ενώ η παρουσία της φλεγμονής, η υδρωπική εκφύλιση και η ίνωση, τα οποία είναι τυπικά χαρακτηριστικά της NASH μπορούν να οδηγήσουν σε κίρρωση του ήπατος.

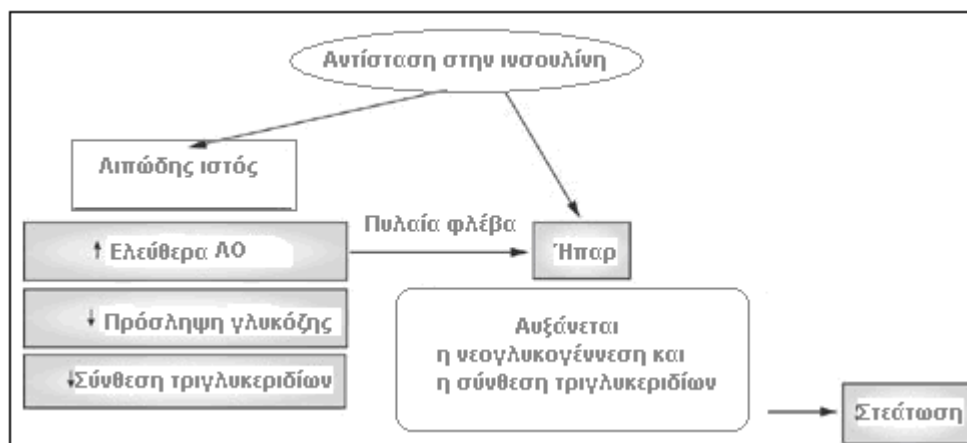
Η NAFLD συνήθως σχετίζεται με ένα αριθμό ασθενειών όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου 2, η υπερλιπιδαιμία, η κοιλιοκάκη, η έκθεση σε διάφορα φάρμακα και τοξίνες και οι χειρουργικές διεργασίες στη γαστρεντερική οδό (Burt 1998, Chitturi 2002). Η κοιλιοκάκη μάλλον συνυπάρχει στο 3% των περιπτώσεων με NAFLD (Grieco 2001, Bardella 2004). Οι ασθενείς με λιπώδες ήπαρ μόνο έχουν καλή πρόγνωση, ενώ η NASH έχει πιο επιθετική πορεία με ανάπτυξη κίρρωσης στο 26% των ασθενών (Angulo 1999, Dixon 2001, Ratziu 2000). Επιπλέον ένας αριθμός μελετών προτείνει ότι η NAFLD μπορεί να είναι υπεύθυνη για περιπτώσεις ασθενών με κρυψιγενή κίρρωση (Brolin 1998, Poonawala 2000). Τα αίτια της NASH φαίνονται στην Εικόνα 35:



Εικόνα 35: Τα αίτια της μη αλκοολική στεατοηπατίτιδας.

4.1. Αιτιοπαθογένεια νόσου

Η παθοφυσιολογία της NAFLD εμπεριέχει 2 βήματα. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει αντίσταση στην ινσουλίνη που επάγει την ανάπτυξη στεάτωσης (Εικόνα 36). Το δεύτερο βήμα είναι το οξειδωτικό στρες που ενεργοποιεί τις φλεγμονώδεις καταστάσεις και προκαλεί NASH (Chitturi 2001, McCullough 2002, McCullough 2006).



Εικόνα 36: Μεταβολικές τροποποιήσεις που οδηγούν στη στεάτωση στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος. Στους ασθενείς που είναι ανθεκτικοί στην ινσουλίνη, η ινσουλίνο-εξαρτώμενη ρύθμιση της λιπόλυσης βλάπτεται στο λιπώδη ιστό. Αυτό οδηγεί στη μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης, μειωμένη σύνθεση τριγλυκεριδίων και μεταφορά μεγάλων ποσοτήτων ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ. Η αντίσταση στην ινσουλίνη στο ήπαρ αυξάνει την παραγωγή γλυκόζης μέσω νεογλυκογένεσης και τη συσσώρευση λιπαρών οξέων (Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism 2007, 3:458-469).

Πρώτο βήμα: Η συσσώρευση των ηπατικών τριγλυκεριδίων στο ήπαρ δημιουργείται όταν ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων πάει προς τη λιπογένεση αντί προς τη λιπόλυση. Αυτό συμβαίνει όταν η εισροή των λιπαρών οξέων στο ήπαρ από το γαστρεντερικό υπερβαίνει την ποσότητα των λιπαρών οξέων που μπορεί να οξειδώσουν τα μιτοχόνδρια και την ποσότητα που απαιτείται για τη σύνθεση των φωσφολιπιδίων και τη σύνθεση των εστέρων χοληστερόλης. Αυτός είναι ο μηχανισμός της στεάτωσης στην αντίσταση στην ινσουλίνη, στην παχυσαρκία, στην αυξημένη λήψη λιπαρών και υδατανθράκων, στη νηστεία, στην ολική παρεντερική διατροφή (Εικόνα 37) (Perlemuter 2007, Reid 2001). Αντίσταση στην ινσουλίνη (Insulin Resistance:IR) είναι μια δυσλειτουργία στον περιφερικό (δηλαδή των σκελετικών μυών) μεταβολισμό της γλυκόζης. Οι μύες είναι ποσοτικά το μεγαλύτερο μέρος όπου γίνεται πρόσληψη γλυκόζης εξαρτώμενη από την ινσουλίνη. Για να ξεπεραστεί η IR και να προαχθεί η αποθήκευση της γλυκόζης αυξάνεται η έκκριση ινσουλίνης και μειώνεται η εκκαθάριση της, με αποτέλεσμα μεταβολικές αλλαγές σε άλλους ιστούς. Η ινσουλίνη είναι ένας ισχυρός αναστολέας της ενδογενούς ηπατικής παραγωγής γλυκόζης, η οποία μειώνεται παρουσία ηπατικής IR (Gastaldelli 2006).

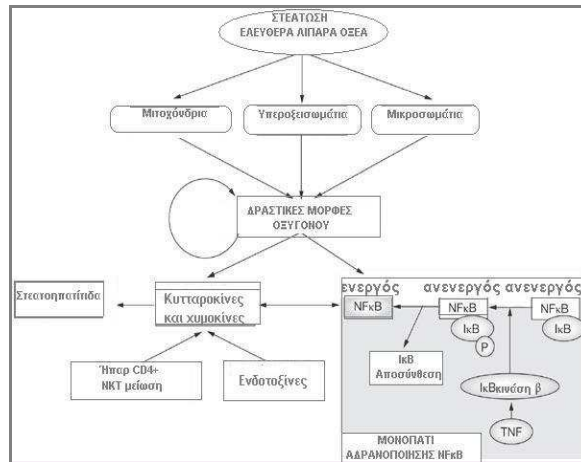
Επίσης στο λιπώδη ιστό μειώνεται η επίδραση της ινσουλίνης που ως γνωστόν επάγει τη μεταγραφή λιπογενετικών γονιδίων, με αποτέλεσμα αύξηση της απελευθέρωσης των ελεύθερων

λιπαρών οξέων στη συστηματική κυκλοφορία (Tamura 2005). Υπάρχουν πολλά στοιχεία που δείχνουν ότι τα άτομα με NAFLD έχουν αυξημένη λιπόλυση και υψηλά επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία. Επίσης, τα άτομα με NAFLD έχουν μειωμένα επίπεδα αδιπνονεκτίνης, η οποία αναστέλλει την έκφραση αρκετών φλεγμονωδών κυτταροκινών και ρυθμίζει το μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης (Bugianesi 2005).

Δεύτερο βήμα: Σε ασθενείς με NAFLD έχει βρεθεί ότι τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν ανωμαλίες από λειτουργικής και μορφολογικής άποψης. Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων οφείλεται στην IR και στα πολλά λιπαρά οξέα. Η μιτοχονδριακή βλάβη συμβάλλει στην αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οι οποίες με τη σειρά τους δημιουργούν μια αυτοσυντηρούμενη αλυσίδα που οδηγεί στη χρόνια βλάβη των μιτοχονδρίων (Begrache 2006). Η μιτοχονδριακή βλάβη λόγω οξειδωτικής βλάβης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της μιτοχονδριακής σύνθεσης του ATP, τη διαταραχή της ομοιόστασης του κυτταρικού ασβεστίου και την αλλαγή της μιτοχονδριακής διαπερατότητας. Όλα τα παραπάνω οδηγούν στη νέκρωση και στην απόπτωση. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (που αυξάνονται στην παχυσαρκία) και οι κετόνες (που αυξάνονται στον διαβήτη) είναι υποστρώματα και του ΚΥΤ P450. Η υπερφόρτωση των μιτοχονδρίων του ήπατος από τα λιπαρά οξέα συμβάλλει στην επαγωγή του ΚΥΤ P450 των μικροσωμίων (ισομορφές ΚΥΤP2E1 και ΚΥΤP4A10/4A14) και των υπεροξυσωματίων για να περιοριστεί η μιτοχονδριακή υπερφόρτωση. Ο πολυμορφισμός που επηρεάζει αυτά τα μονοπάτια μπορεί να ευθύνεται για την παθογένεια της NASH. Η επαγωγή του κυτοχρώματος συμβάλλει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών που με τη σειρά τους προάγουν τη μιτοχονδριακή βλάβη και έτσι αυξάνεται περισσότερο το οξειδωτικό στρες (Pessayre 2005).

Επιπρόσθετες επιδράσεις όπως η έκθεση σε λιποπολυσακχαρίδες, συγκεκριμένες ηπατοτοξίνες ή μολυσματικούς παράγοντες μπορεί επίσης να οδηγήσουν στην ανάπτυξη της ίνωσης. Οι παραπάνω παράγοντες συμβάλλουν στην επαγωγή του TNF-α, της ιντερλευκίνης 6 και της ιντερλευκίνης 8, που ενεργοποιούν τη φλεγμονώδη απάντηση (Marra 2008). Στη φλεγμονώδη απάντηση ενεργοποιείται και η NADPH οξειδάση των κυττάρων Kupffer που συμβάλλει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Το οξειδωτικό στρες συμβάλλει στη νέκρωση και

στην απόπτωση (Feldstein 2003) μέσω επαγωγής του NF-κB. Ο τελευταίος ρυθμίζεται θετικά σε ασθενείς με NASH (Εικόνα 37).



Εικόνα 37: Οι δραστικές μορφές οξυγόνου που παράγονται επάγουν την παραγωγή προφλεγμονώδων κυτταροκινών και χυμοκινών, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν το μονοπάτι του NFκB που μειώνει τη σηματοδότηση της ινσουλίνης. Στο μονοπάτι του NFκB, ο IκB συνδέεται στο μεταγραφικό παράγοντα NFκB και αναστέλλει τη δράση του με το να κρατιέται στο κυτταρόσολιο. Η IκB κινάση ενεργοποιείται από τον TNF και φωσφορυλιώνει τον IκB. Όταν φωσφορυλιωθεί ο τελευταίος αποσυναρμολογείται από τον NFκB ο οποίος μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα και να ενεργοποιήσει διάφορα γονίδια.

Επίσης υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μελετών που δηλώνει ότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην NASH. Αυξημένη λιπιδική υπεροξειδωση έχει προταθεί σε ζωικά μοντέλα στεατοηπατίτιδας και σε ασθενείς με NASH (Mehta 2002, Sanyal 2001).

4.2. Ιστολογικά ευρήματα

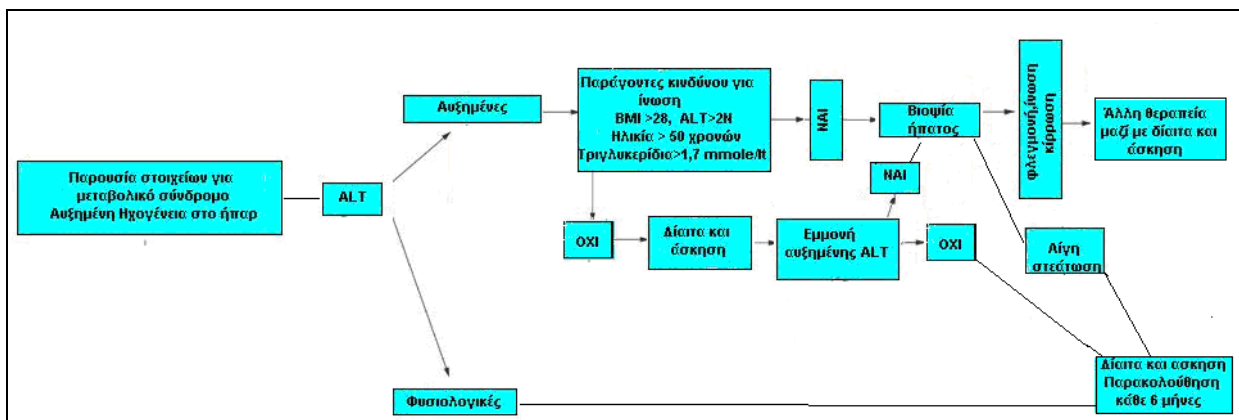
Τα χαρακτηριστικά ευρήματα σε όλες τις περιπτώσεις είναι τα εξής: μακροαγγειακή στεάτωση, παρεγχυματική φλεγμονή, ηπατοκυτταρική νέκρωση, αναγέννηση, υδρωπική εκφύλιση των ηπατοκυττάρων, σωματίδια Mallory, γλυκογονομένοι πυρήνες. Η συσσώρευση λίπους μπορεί να επηρεάσει τα ηπατικά λοβία. Ο βαθμός της στεάτωσης σχετίζεται με το δείκτη μάζας σώματος και είναι πιο σοβαρός στη NASH από ότι στην αλκοολική ηπατίτιδα. Η λοβιακή φλεγμονή μπορεί να είναι παρούσα σε όλες τις περιπτώσεις και αποτελείται από λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα κύτταρα και ουδετερόφιλα. Οι γλυκογονομένοι πυρήνες είναι παρόντες στο 35-100% των ασθενών με στεατοηπατίτιδα.

4.3.Κλινική εικόνα και εργαστηριακά ευρήματα

Η κλινική εικόνα δεν διαφέρει από αυτήν που περιγράφηκε στο λιπώδες ήπαρ του αλκοολισμού, ενώ επιπλέον υπάρχει ποικιλία συνοδών ευρημάτων από τα υποκείμενα αίτια. Σπάνια μπορεί να παρουσιασθεί σαν κεραυνοβόλος ηπατική ανεπάρκεια. Στον εργαστηριακό έλεγχο παρατηρείται ήπια αύξηση των αμινοτρανσφερασών και της ALP. Σήμερα, φαίνεται ότι ο πλέον αξιόπιστος εργαστηριακός δείκτης για τον αποκλεισμό κατάχρησης οινόπνευματος σε ασθενείς με στεατοηπατίτιδα αποτελεί ο προσδιορισμός της αποσιαλωμένης τρανσφερίνης (dTF). Συγκεκριμένα η σχέση dTF προς την ολική τρανσφερίνη δεν είναι σχεδόν ποτέ μεγαλύτερη του 1,3 στις περιπτώσεις της NASH.

4.4. Διάγνωση

Η διάγνωση της NASH στηρίζεται σε ιστολογικά και όχι κλινικά κριτήρια. Για την ιστολογική διάγνωση της NASH είναι αναγκαία εκτός από τη λιπώδη διήθηση του ήπατος (μεγαλοφουσαλιδώδης ή άλλοτε μικροφουσαλιδώδης διήθηση), η παρουσία ενδείξεων ηπατοκυτταρικής βλάβης στην ζώνη 3 του ηπατικού λοβίου, η οποία υποχρεωτικά περιλαμβάνει μια από τις παρακάτω 2 αλλοιώσεις α) υαλίνη του Mallory και/ή περικυτταρική ίνωση ή β) κενοτοπιώδη εκφύλιση ή απόπτωση κυττάρων στην περικεντρική περιοχή του λοβίου. Παρά τους σοβαρούς κινδύνους που συνδέονται με τη NASH υπάρχουν μερικά εργαλεία για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και η ταυτοποίηση των ασθενών υψηλού κινδύνου (Miele 2007) (Εικόνα 38).



Εικόνα 38: Προτεινόμενος αλγόριθμος για τη διάγνωση και θεραπεία της μη αλκοολικής λιπώδης διήθησης του ήπατος. Συνομημύσεις: 2N:2 φορές παραπάνω από το φυσιολογικό.

4.5. Θεραπεία και πρόγνωση

Η θεραπεία είναι αιτιολογική και συνίσταται στην απομάκρυνση ή την τροποποίηση του τοξικού παράγοντα καθώς και στην αντιμετώπιση του υποκείμενου νοσήματος ή συνδρόμου. Έχουν δοκιμαστεί υπολιπιδαιμικά φάρμακα, αντιβιοτικά, αντιοξειδωτικά και ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UDCA) με αποτελέσματα από αρνητικά έως μέτρια. Η πρόγνωση εξαρτάται από τον υποκείμενο αιτιολογικό παράγοντα. Μπορεί να εξελιχθεί σε κίρρωση αν και η επιθετικότητα της νόσου φαίνεται να είναι χαμηλή σε σχέση με την αλκοολική ηπατίτιδα (πρόοδος σε κίρρωση στο 15-20% των ασθενών μετά από μια 10ετία εάν δεν υπάρξει αποτελεσματική θεραπευτική παρέμβαση) (Νταλέκος 2001).

5.ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΗΠΑΤΟΣ

Η ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος κατά κυτταρικών αντιγόνων του ίδιου του οργανισμού οδηγεί σε μία «λανθασμένη» ανοσολογική απάντηση που καλείται αυτοάνοση απόκριση (αυτοανοσία) και χαρακτηρίζεται από παραγωγή αντισωμάτων που στρέφονται ενάντια σε «ίδια» κυτταρικά αντιγόνα (αυτοαντισώματα) ή και από επικράτηση αυτοδραστικών κυτταροτοξικών T-λεμφοκυτταρικών κλώνων. Η αυτοανοσία είναι μια κατάσταση διάσπασης των φυσιολογικών ανοσολογικών μηχανισμών ανοχής (εξάλειψη, ανοσολογική άγνοια, ανοσολογική ρύθμιση) με τους οποίους ο οργανισμός «αντιλαμβάνεται» τα κυτταρικά στοιχεία ως «ίδια» (self) και ασφαλή και όχι ως «ξένα» (non-self) και επιβλαβή. Ανεπάρκεια ή δυσλειτουργία στους μηχανισμούς που φυσιολογικά ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις μπορεί να οδηγήσει σε παρατεταμένη ή υπερβολική απόκριση και να προκαλέσει ιστική καταστροφή είτε μέσω της εναπόθεσης των κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων (αυτοαντίσωμα-αυτοαντιγόνο-συμπλήρωμα) είτε μέσω της άμεσης κυτταροτοξικής δράσης των κυκλοφορούντων αυτοδραστικών T-λεμφοκυττάρων (CD8⁺) στους ιστούς με τελικό αποτέλεσμα την εκδήλωση αυτοάνοσου νοσήματος. Οι κλινικές εκδηλώσεις των αυτοάνοσων νοσημάτων είναι ποικιλόμορφες και είναι δυνατόν να αφορούν είτε μόνο σε ένα όργανο (οργανοειδικά) ή είτε σε πολλά όργανα συγχρόνως (συστηματικά ή μη-οργανοειδικά), ενώ δεν είναι ασυνήθιστο ένα οργανοειδικό

αυτοάνοσο νόσημα να παρουσιάζει παράλληλα και εκδηλώσεις από άλλα όργανα ή να συνυπάρχουν περισσότερα από ένα οργανοειδικά ή συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα (σύνδρομα επικάλυψης) στον ίδιο ασθενή (Rigoroulou 2008).

Τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος είναι οργανοειδικά, χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα αγνώστου αιτιολογίας με παθογένεια που οφείλεται σε αυτοάνοση απόκριση έναντι ηπατικών κυττάρων-στόχων (ηπατοκύτταρα ή χολαγγειοκύτταρα) σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα. Η αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ), η πρωτοπαθής χολική κίρρωση (ΠΧΚ) και η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ) αποτελούν τα αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα. Αρκετά συχνά στην κλινική πράξη παρατηρούνται και σύνδρομα επικάλυψης (overlap syndromes), καθώς και οριακές μορφές (outlier syndromes) των παραπάνω νοσημάτων (Alvarez 1999, Czaja 2008, Hennes 2008).

5.1. ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ (ΑΗ)

Η ΑΗ οφείλεται σε διαταραχή του ανοσολογικού συστήματος στην αναγνώριση και στην ανοχή των «ίδιων» ηπατικών πρωτεϊνών-αντιγόνων, που έχει ως αποτέλεσμα υπέρμετρη αυτο-ενεργοποίηση χυμικών και κυτταρικών ανοσολογικών μηχανισμών, πρόκληση χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης στο ήπαρ και νέκρωση των ηπατοκυττάρων. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι ειδικών ή και μη ειδικών πρωτεϊνών για το ήπαρ και από σημαντικό βαθμό πολυκλωνική υπεργαμσφαιριναιμία (Bogdanos 2008, Dalekos 2002B, Obermayer-Straub 2000, Zachou 2004A). Η ΑΗ οδηγεί σε προοδευτική καταστροφή του ήπατος, με αποτέλεσμα τη συχνή μετάπτωση σε κίρρωση και την αυξημένη θνητότητα, ιδιαίτερα αν η νόσος δεν διαγνωστεί έγκαιρα και αφεθεί χωρίς θεραπεία.

Η ΑΗ προσβάλλει όλες τις ηλικίες, κυρίως όμως γυναίκες (4:1) και παρουσιάζει δύο αιχμές ηλικιακής εμφάνισης στα 10-30 και στα 40-50 έτη. Ο επιπολασμός της νόσου στη Βορειοδυτική Ευρώπη υπολογίζεται σε 140-170 ασθενείς ανά 1.000.000 κατοίκους, η μέση ετήσια επίπτωσή της είναι περίπου 0,7-1,6 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους και στις Η.Π.Α αντιστοιχεί στο 10-20% του συνόλου των χρόνιων ηπατοπαθειών. Στη χώρα μας δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία για την ακριβή επιδημιολογία της νόσου.

5.1.1. Αιτιοπαθογένεια νόσου

Η αιτιολογία της νόσου είναι άγνωστη. Στην αιτιοπαθογένεια της νόσου έχουν ενοχοποιηθεί διάφοροι ιοί όπως ο ιός της ιλαράς, ο ιός Epstein-Barr, ο ιός του απλού έρπητα και οι ιοί των ιογενών ηπατίτιδων (ιδιαίτερα ο HCV). Από τους μηχανισμούς πρόκλησης αυτοανοσίας δυο είναι αυτοί που φαίνεται να βρίσκουν εφαρμογή στην ΑΗ (η μοριακή μίμηση και η διαταραχή της ανοσολογικής απόκρισης). **Μοριακή μίμηση:** Ο όρος «μοριακή μίμηση» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Snell το 1968 για να περιγράψει την έκφραση από τους ιούς αντιγόνων παρόμοιων με αντιγόνα του ξενιστή (ομολογία αμινοξέων μεταξύ «ίδιων» και «ξένων» κυτταρικών στοιχείων) που προκαλούν την παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Μοριακή μίμηση μεταξύ ηπατοτρόπων ιών και ηπατοκυττάρων πιθανολογείται ως πυροδοτικός μηχανισμός σε γενετικά ευαίσθητα άτομα, ενώ παράλληλα η ελάττωση της λειτουργίας των κατασταλτικών T-λεμφοκυττάρων φαίνεται ως η κυρίως διαταραχή της ανοσολογικής απόκρισης κατά την πρόκληση της ΑΗ.

Δύο θεωρούνται οι πιθανοί μηχανισμοί της ιστικής βλάβης στο ήπαρ:

- A. Εξαρτημένη από αντισώματα κυτταροτοξικότητα (μηχανισμός χυμικής ανοσίας).
- B. Έκτοπη έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τύπου II (μηχανισμός κυτταρικής ανοσίας).

Η παθογένεια της ΑΗ πυροδοτείται όταν ένα γενετικά προδιατεθειμένο άτομο εκτίθεται σε έναν περιβαλλοντικό παράγοντα που μπορεί να είναι ιός, βακτήριο, χημική ουσία ή φάρμακο. Ανοσογενετικές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση της ΑΗ με τα ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (HLA) του Μείζονος Συστήματος Ιστοσυμβατότητας (MHC), το οποίο κωδικοποιείται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 (Van der Berg 1998).

Ο απλότυπος HLA-A1-B8-DR3 ανευρίσκεται περίπου στο 37% των ασθενών και χαρακτηρίζει άτομα νεαρής ηλικίας μικρότερης των 30 ετών, ιδιαίτερα γυναίκες που εμφανίζουν υψηλή ενεργότητα νόσου, χαμηλή θεραπευτική ανταπόκριση και σημαντικό αριθμό υποτροπών μετά τη διακοπή της θεραπείας. Ο απλότυπος αυτός σχετίζεται και με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (ΣΕΛ), η αυτοάνοση θυρεοειδοπάθεια, ο ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης κ.ά. Ο γονότυπος HLA-DR4 αφορά συνήθως σε ασθενείς

μεγαλύτερους των 40 ετών που εμφανίζουν μικρή ενεργότητα νόσου, υψηλή θεραπευτική ανταπόκριση και μικρό ποσοστό υποτροπών μετά τη διακοπή της θεραπείας. Ο γονότυπος HLA-A11 σχετίζεται με συχνή εμφάνιση εξωηπατικών εκδηλώσεων.

Οι παράγοντες περιβαλλοντικοί ή μη που προκαλούν την εκδήλωση της ΑΗ σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα δεν είναι πλήρως γνωστοί, ωστόσο έχουν ενοχοποιηθεί ιογενείς λοιμώξεις από τον ιό της ιλαράς, της ηπατίτιδας Α, τον ιό Epstein Barr κ.ά. Ο Mackay έχει προτείνει ότι κάθε διεργασία που ξεκινά μια φλεγμονώδη διεργασία στο ήπαρ μπορεί να είναι ικανή να ενεργοποιήσει την ΑΗ στα ευπαθή άτομα (Mackay 1965). Αρκετές μελέτες του 1970 και του 1980 έδειξαν κυτταροτοξικότητα διαμεσολαβούμενη από αντισώματα στα περιφερικά μονοκύτταρα ενάντια στα ηπατοκύτταρα. Η θεραπευτική χορήγηση INF-α στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες έχει επίσης αναφερθεί ότι μπορεί να επάγει λανθάνουσα ΑΗ (ιδιαίτερα στους αντι-LKM-1 θετικούς ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C) (Dalekos 1999, Dalekos 2001B, Dalekos 2002A, Zachou 2004A). Δεν είναι γνωστό αν η μειωμένη λειτουργία των κατασταλτικών T-λεμφοκυττάρων που αποτελεί χαρακτηριστικό εύρημα της ΑΗ είναι πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής διαταραχή (Czaja 2001A).

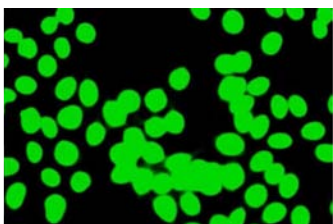
5.1.2. Εργαστηριακά ευρήματα

Παρατηρείται αύξηση χολευθρίνης, αμινοτρανσφεράσεων και χαρακτηριστική διάχυτη υπεργαμμασφαιριναιμία. Η ανίχνευση διαφόρων αυτοαντισωμάτων αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικούς παθολογικούς εργαστηριακούς δείκτες για τη διάγνωση και την ταξινόμηση της ΑΗ. Η ανίχνευση των ανωτέρω αυτοαντισωμάτων εξακολουθεί να αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο για τη διάγνωση της ΑΗ σε ασθενείς με χρόνια ή οξεία ηπατική νόσο και απουσία ιολογικών, μεταβολικών, γενετικών και τοξικών παραγόντων σχετιζόμενων με ηπατική βλάβη. Στην ΑΗ παρατηρούνται τα παρακάτω αυτοαντισώματα (Dalekos 2002B, Gabeta 2008, Zachou 2004A).

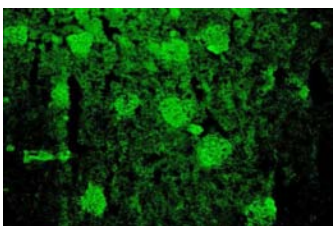
1. Αντιπυρηνικά Αντισώματα (ANA): Τα ANA αποτελούν μια ετερογενή ομάδα αυτοαντισωμάτων που στρέφονται κατά διαφόρων αντιγονικών συστατικών του πυρήνα, ιστονικών και μη ιστονικών πρωτεϊνών, όπως το DNA (απλής ή διπλής έλικας), το tRNA, η λαμινίνη Α, η λαμινίνη C, η κυκλική Α κ.ά. και υποδεικνύουν ύπαρξη συστηματικού ή οργανοειδικού αυτοανόσου νοσήματος (Czaja 2001B). Η ανίχνευσή τους στον ορό των ασθενών

γίνεται σήμερα με τη χρήση του έμμεσου ανοσοφθορισμού (ΕΑΦ) (Εικόνα 39α). Το 4% του υγιούς πληθυσμού ηλικίας μικρότερης των 65 ετών εμφανίζει θετικά ANA και το ποσοστό αυτό αυξάνεται με την ηλικία. Αναγνωρίζονται διάφοροι τύποι ανοσοφθορισμού, όπως ο ομοιογενής, ο στικτός, ο αντιπυρηνισκικός, ο περιφερικός, ο αντικεντρομεριδιακός καθώς και ποικίλοι συνδυασμοί των παραπάνω τύπων (Dalekos 2002B, Strassburg 1996, Zachou 2004A). Συνήθως, τα ANA συνυπάρχουν με τα αντισώματα έναντι των λείων μυϊκών ινών (SMA) σε ποσοστό 86-91%.

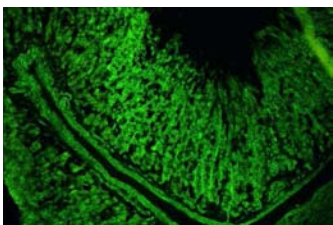
2. Αντισώματα Έναντι Λείων Μυϊκών Ινών (SMA): Τα SMA αποτελούν υποκατηγορία των ANA που στρέφονται κατά αντιγόνων του κυτταροσκελετού (Dalekos 2002B, Dalekos 2008, Makaritsis 2009, Zachou 2004A). Η ανίχνευσή τους μπορεί να γίνει με έμμεσο ανοσοφθορισμό (ΕΑΦ) σε υποστρώματα ανθρώπινων κυτταρικών σειρών, όπου δίνουν αντικυτταροπλασματικού τύπου ανοσοφθορισμό και εμφανίζουν χαρακτηριστική εικόνα «ιστού αράχνης». Εντούτοις, τα καταλληλότερα υποστρώματα αποτελούν οι τομές σε κρυσσοστάτη από ιστούς ήπατος-νεφρών-στομάχου αρουραίων (Dalekos 2002B, Zachou 2004A) (Εικόνα 39 β,γ).



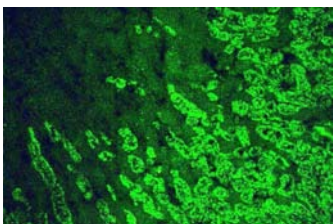
Εικόνα 39α:Υψηλός τίτλος αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) από ομογενή τύπο με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε ακινητοποιημένα HEp-2 κύτταρα σε γυναίκες ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1 (AIH-1).



Εικόνα 39β: Αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών με έμμεσο ανοσοφθορισμό στο νεφρό αρουραίου (ορός από ασθενή με αυτοάνοση ηπατίτιδα). Ο ανοσοφθορισμός εμπεριέχει λείες μυϊκές ίνες μέσα στα αιμοφόρα αγγεία (μεγέθυνση x40).



Εικόνα 39 γ: Αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε στομάχι αρουραίου (ορός από ασθενή με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1). Ο ανοσοφθορισμός εμπεριέχει λείες μυϊκές ίνες που βρίσκονται πάνω στο βλεννογόνο (μεγέθυνση x40).



Εικόνα 39 δ: Αντισώματα έναντι μικροσωμίων ήπατος-νεφρών (αντι-LKM-1). Αυτά τα αντισώματα αντιδρούν στα εγγύς σωληνάρια των νεφρών των αρουραίων. Η απουσία της δραστηριότητας ενάντια στα σωληνάρια των νεφρών των αρουραίων διαχωρίζει τα αντι-LKM-1 από τα αντιμιτοχονδριακά αυτοαντισώματα (μεγέθυνση x40).

Με τη χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής, τόσο τα ANA όσο και τα SMA συνήθως μειώνονται και/ή αρνητικοποιούνται στην πλειονότητα των ασθενών, αλλά το γεγονός αυτό δεν αποτελεί προγνωστικό παράγοντα για την επίτευξη παρατεταμένης ύφεσης μετά τη διακοπή της θεραπείας. Ο ρόλος των ANA και SMA δεν έχει τεκμηριωθεί ακόμη σαφώς στην παθογένεια της ΑΗ και η παρουσία τους στον ορό των ασθενών έχει μεγαλύτερη διαγνωστική παρά προγνωστική αξία. Θετικά ANA ή SMA ανιχνεύονται συχνά σε ασθενείς με οξείες ή χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες Α, Β και κυρίως C, αλλά στις περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις δεν παρουσιάζουν ειδικότητα έναντι της F-ακτίνης όπως στην ΑΗ, αλλά στρέφονται κατά της βιμεντίνης και άλλων αντιγόνων του κυτταροσκελετού (Dalekos 1993B, Gatselis 2005, Gatselis 2006, Lenzi 1995, Zachou 2003).

3. Αντισώματα Κατά Κυτταροπλάσματος των Ουδετερόφιλων (ANCA): Είναι αντισώματα που στρέφονται κατά διαφόρων συστατικών του κυτταροπλάσματος των ουδετερόφιλων κυττάρων και των μονοκυττάρων. Ανιχνεύονται με δύο εργαστηριακές μεθόδους: α) με ΕΑΦ, όπου εμφανίζονται ο κυτταροπλασματικός (διάχυτος ή κοκκιώδης) τύπος ανοσοφθορισμού, ειδικός έναντι της πρωτεΐνωσης-3 (θετικά c-ANCA) και ο περιπυρηνικός, ειδικός έναντι της μυελοϋπεροξειδάσης (MPO) (θετικά p-ANCA). Συχνά παρατηρείται ένας «άτυπος» ανοσοφθορισμός των ANCA έναντι της ελασάσης των λευκοκυττάρων, της λακτοφερίνης ή της καθεψίνης G. β) με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA) όπου τον αντιγονικό στόχο αποτελούν οι πρωτεΐνες πρωτεΐνωση-3 (PR3, αντι-PR3 αντισώματα που αντιστοιχούν στα c-ANCA) και η μυελοϋπεροξειδάση (MPO, αντι-MPO αντισώματα που αντιστοιχούν στα p-ANCA). Θετικά p-ANCA ή «άτυπες» μορφές ANCA ανιχνεύονται συχνά και σε άλλες αυτοάνοσες παθήσεις, όπως στα φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου, στην ελκώδη κολίτιδα, στη νόσο του Crohn, στην πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, στο σύνδρομο Felty, στο συστηματικό ερυθρεματώδη λύκο (Dalekos 1993B, Dalekos 2002B, Zachou 2004A).

4. Αντισώματα έναντι Υποδοχέα της Ασιαλογλυκοπρωτεΐνης (Αντι-ASGP-R): Ο υποδοχέας της ασιαλογλυκοπρωτεΐνης (ASGP-R) είναι μια πρωτεΐνη της μεμβράνης του συμπλέγματος της ηπατοειδικής μεμβρανικής λιποπρωτεΐνης (LSP) των ηπατοκυττάρων, που συμμετέχει στη σύνδεση και ενδοκυττάρωση των γλυκοπρωτεϊνών που φέρουν τελικές ομάδες γαλακτόζης (Czaja

1996, Dalekos 2002B, Zachou 2004A). Εκφράζεται κυρίως στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων της πυλαίας ζώνης. Είναι οργανοειδικά και συσχετίζονται με τη βαρύτητα της ιστολογικής εικόνας της ΑΗ και την ανταπόκρισή της στη θεραπεία (Dalekos 2002B, Zachou 2004A). Αντι-ASGP-R ανιχνεύονται ωστόσο και σε ασθενείς με ΠΧΚ, αλκοολική ηπατοπάθεια ή χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες Β και C, έχοντας ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της διαγνωστικής τους ειδικότητας.

5. Αντισώματα κατά Διαλυτών Αντιγόνων Ήπατος/Παγκρέατος (αντι-SLA/LP): Τα αντι-SLA αυτοαντισώματα περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1987. Δεν ανιχνεύονται με την τεχνική του ΕΑΦ, αλλά συνήθως με ανταγωνιστικές μεθόδους ELISA ή ραδιοανοσοενζυμικές μεθόδους. Το SLA ανευρίσκεται στο υπερκείμενο μετά από υπερφυγοκέντρηση ηπατικού ομογενοποιημάτος και αντιπροσωπεύει πρωτεΐνη κυτοσολίων, η οποία δεν είναι ούτε οργανοειδική, ούτε ειδική του είδους. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του συγκεκριμένου αντιγόνου παρατηρούνται στο ήπαρ και τους νεφρούς. Το LP αντιγόνο ανευρίσκεται στο υπερκείμενο μετά από υπερφυγοκέντρηση ηπατικού και παγκρεατικού ομογενοποιημάτος, υποδεικνύοντας ότι και αυτό το αντιγόνο είναι μια διαλυτή πρωτεΐνη κυτοσολίων. Μέχρι πρόσφατα, τα αντι-LP θεωρούνταν διαφορετικά αυτοαντισώματα από τα αντι-SLA. Εντούτοις, η πρόσφατη μελέτη των Wies et al δίνει πειστικά στοιχεία και επιβεβαιώνει προηγούμενες θεωρίες ότι το αντι-SLA και το αντι-LP είναι ένα και το αυτό αυτοαντίσωμα (αντι-SLA/LP) (Dalekos 2002B, Rigoroulou 2007B, Zachou 2004A).

6. Αντισώματα Έναντι Μικροσωμιακών Αντιγόνων Ήπατος-Νεφρών (Αντι-LKM): Τα LKM αυτοαντισώματα (Εικόνα 39δ) διακρίνονται σε τρεις τύπους: **α. Αντι-LKM 1:** Στρέφονται έναντι ομάδας ενζύμων του κυτοχρώματος P450. Το αντιγόνο-στόχος των LKM1 ανευρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια της πλασματοκυτταρικής μεμβράνης των ηπατοκυττάρων μεταξύ των αμινοξέων 254-271 και είναι μια μικροσωμιακή πρωτεΐνη 50kD, τμήμα του ενζυμικού συστήματος P450 IID6 E1 του κυτοχρώματος P450, που συμμετέχει στο μεταβολισμό των φαρμάκων (β-αδρενεργικοί αναστολείς, αντιαρρυθμικά, αντικαταθλιπτικά κ.ά.) (Bogdanos 2008, Dalekos 2002B, Zachou 2004A). Παρόμοια αντισώματα ανιχνεύονται σε ποσοστό έως και 7% σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, ανεξαρτήτως γονότυπου του ιού (Dalekos 2001B, Gatselis 2005, Gatselis 2006, Kerkar 2003). **β. Αντι-LKM 2:** Στρέφονται έναντι του ενζύμου KYTP450 2C9. Δεν ανιχνεύονται ποτέ στην ΑΗ (Dalekos 2002B, Zachou 2004A). **γ. Αντι-LKM 3:** Στρέφονται κατά

των UDP-γλυκουρονικών τρανσφερασών (οικογένεια-1) και ανιχνεύονται μόνα τους ή σε συνδυασμό με τα αντι-LKM 1 (Dalekos 2002B, Zachou 2004A). Παρατηρούνται επίσης στο 13% ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα D και σπάνια σε περιπτώσεις χρόνιας HCV λοίμωξης (Dalekos 2001A, Dalekos 2002B, Philipp 1994, Zachou 2004A).

7. Αντισώματα έναντι κυτοσολίων του Ήπατος τύπου-1 (Αντι-LC1): Τα αυτοαντισώματα αυτά βρέθηκε να αντιδρούν με μια πρωτεΐνη των κυτοσολίων του ήπατος (αντι-LC1) και είναι οργανοειδικά και ειδικά για τη νόσο, αν και έχουν ανιχνευθεί και σε ασθενείς με HCV λοίμωξη (Dalekos 2002B, Muratori 1995, Rigoroulou 2007B, Vergani 2000, Zachou 2004A). Συνυπάρχουν σε ποσοστό 30% με τα αντι-LKM-1 αντισώματα και σχετίζονται με την ενεργότητα της νόσου.

8. Αντισώματα έναντι Καρδιολιπίνης (aCL): Τα aCL ανευρίσκονται συχνότερα (39%) στην ΑΗ σε σχέση με άλλα χρόνια ηπατικά νοσήματα. Η παρουσία θετικών IgG-aCL έχει συσχετισθεί με την παρουσία κίρρωσης και την ενεργότητα της ΑΗ αλλά δεν φαίνεται να υποδηλώνει συνύπαρξη με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, ενώ τα IgM-aCL έχουν προταθεί ως ορολογικοί δείκτες αυξημένης ενεργότητας ή προχωρημένου ιστολογικού σταδίου της νόσου (Al-Chalabi 2006, Czaja 2007, Dalekos 2000, Liaskos 2005, Zachou 2003).

9. Αντισώματα κατά α-ακτινίνης (a-actinin Abs): Η συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων της F-ακτινίνης (Abs) με την α-ακτινίνη Abs (διπλή αντιδραστικότητα) συσχετίστηκε με τη σοβαρότητα της αυτοάνοσης ηπατίτιδας τύπου 1 (Guéguen 2006). Τα αντισώματα έναντι α-ακτινίνης συσχετίζονται με τα μονόκλωνα (ss) DNA στο 16 με 50 (32%) ασθενών με ΑΗ-1 σε σχέση με 16 με 401 (4.0%) ασθενών με άλλη ασθένεια του ήπατος. Επιπλέον, τα άντι-α-ακτινίνης αντισώματα σχετίζονται με υψηλή συγγένεια με τα άντι-ssDNA αντισώματα στην ΑΗ-1. Επιπλέον, η διπλή αντιδραστικότητα ενάντια στην α-ακτινίνη και το ssDNA σχετίστηκε με κλινική και ιστολογική δραστηριότητα της ασθένειας, σε ασθενείς με ΑΗ που δεν παίρνουν θεραπεία (Renaudineau 2008).

5.1.3. Ιστολογική εικόνα

Η ιστολογική εικόνα στο βιοπτικό υλικό του ήπατος δεν είναι ειδικά παθογνωμονική, ώστε να θέσει τη διάγνωση της ΑΗ, αλλά εφόσον τίθεται η κλινική υπόνοια και ανιχνεύονται αυτοαντισώματα στον ορό των ασθενών συμβάλλει σημαντικά στην επιβεβαίωσή της. Χαρακτηριστική είναι η παρουσία περιπυλαίας ή περιδιαφραγματικής διαβρωτικής νέκρωσης με λεμφοκυτταρική και πλασματοκυτταρική διήθηση που μπορεί να συνυπάρχει με πυλαιο-πυλαία ή πυλαίο-φλεβική γεφυροποιό νέκρωση. Μπορεί επίσης να παρατηρηθεί και εικόνα λοβιακής ηπατίτιδας στην ΑΗ, κυρίως όμως στις υποτροπές της νόσου (Vergani 2009). Η χρήση ανοσοϊστοχημείας και μονοκλωνικών αντισωμάτων αυξάνει την ευαισθησία και την ειδικότητα της ιστοπαθολογικής μελέτης του ήπατος και βοηθά περισσότερο στη διάγνωση.

5.1.4. Ορολογικοί τύποι ΑΗ

Η ΑΗ ταξινομείται σε δύο κύριες υποκατηγορίες, την ΑΗ τύπου 1 (ΑΗ-1) και την ΑΗ τύπου 2 (ΑΗ-2).

Αυτοάνοση Ηπατίτιδα τύπου 1 (ΑΗ-1): Εκδηλώνεται στο 70% των ασθενών με ΑΗ, είναι συχνότερη σε γυναίκες και εμφανίζει διφασική ηλικιακή κατανομή με πρώτη έξαρση στις ηλικίες 15-30 ετών και δεύτερη 50-79 ετών. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία ANA συνήθως με στικτό ή διάχυτο τύπο ανοσοφθορισμού, SMA, σημαντικού βαθμού πολυκλωνική υπεργαμμασφαιριναιμία (κυρίως IgG) και από την παράλληλη εκδήλωση και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων (Czaja 1997, Dalekos 2002B, Zachou 2004A). Οι ασθενείς εμφανίζουν συχνότερα απλότυπο HLA-A1 B8 DR3 ή γονότυπο HLA-DR4. Συχνά, μπορεί να ανιχνευθούν τα p-ANCA και τα αντι-ASGP-R αντισώματα. Αντισώματα έναντι μονής ή διπλής έλικας DNA (αντι-ssDNA ή αντι-dsDNA) δεν είναι σπάνια (Guéguen 2006, Renaudineau 2008). Στους ασθενείς με ΑΗ-1 και εξωηπατικές εκδηλώσεις συχνά προκύπτει μικρό κλινικό διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ) και το συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ) (Rigoroulou 2007A). Η βιοψία ήπατος στα νοσήματα αυτά δεν αποκαλύπτει σοβαρή παρεγχυματική βλάβη ιστολογικά και η προσβολή του οργάνου είναι πολύ περιορισμένη (Dalekos 2002B, Rigoroulou 2007A, Zachou 2004A). Ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών (10-15%) χαρακτηρίζεται από την παρουσία αντιSLA/LP αντισωμάτων ενώ

αντισώματα κατά α-ακτινίνης παρατηρούνται στο 33%. Η παρουσία των παραπάνω αντισωμάτων σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση και σοβαρής μορφής νόσο (Dalekos 2002B, Zachou 2004A).

Αυτοάνοση Ηπατίτιδα τύπου 2 (AH-2): Χαρακτηρίζεται από την παρουσία ειδικών αυτοαντισωμάτων (αντι-LKM1 και αντι-LC1) συνήθως απουσία ANA και SMA, ενώ η IgA ανοσοσφαιρίνη μπορεί να είναι χαμηλή. Στον τύπο αυτό ανήκει περίπου το 4% των ενηλίκων με AH, ενώ είναι συχνότερος σε παιδιά ηλικίας 2-14 ετών. Η AH-2 παρουσιάζει επιπολασμό που διαφέρει γεωγραφικώς σημαντικά από 5 έως 10 περιπτώσεις/1.000.000 κατοίκους σε ορισμένες χώρες της Ευρώπης. Όπως και η AH-1 έτσι και η AH-2 συνυπάρχει συχνά με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η νεανική ιδιοπαθής αρθρίτιδα, η θυρεοειδίτιδα, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1, η αιμολυτική ή η μεγαλοβλαστική αναιμία, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η ελκώδης κολίτιδα. Οι ασθενείς με θετικά τόσο τα αντι-LKM-1 όσο και τα αντι-LC1 είναι νεότεροι σε ηλικία και εμφανίζουν εντονότερη δραστηριότητα της νόσου σε σχέση με αυτούς που έχουν θετικά μόνο τα αντι-LKM-1 αντισώματα. Οι ασθενείς που εμφανίζουν θετικά μόνο τα αντι-LC1 νοσούν βαρύτερα από εκείνους με θετικά και τα δύο αυτοαντισώματα. Τα αντι-LC1 αντισώματα αποτελούν κακό προγνωστικό δείκτη για την AH (Νταλέκος 2004).

5.1.5. Μορφες κλινικής εκδήλωσης

Οι κλινικές εκδηλώσεις ασθενών με AH διαφέρουν σε αριθμό και βαρύτητα και διακρίνονται στις παρακάτω μορφές:

Ήπια συμπτωματική μορφή: Αποτελεί την πιο συχνή μορφή (60% των περιπτώσεων). Συνήθως υπάρχουν για μεγάλο χρονικό διάστημα πριν από τη διάγνωση γενικά μη-ειδικά συμπτώματα όπως και στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες (κακουχία, ανορεξία, απώλεια βάρους, αρθραλγίες και μυαλγίες καθώς και αίσθημα αδυναμίας και εύκολης κόπωσης). Στο 10% υπάρχει μέτριου βαθμού πυρετική κίνηση μέχρι 38°C. Στην κλινική εξέταση διαπιστώνεται συνήθως υπερτρίχωση, σταγονοειδής ακμή, πολλαπλές τηλεαγγειεκτασίες και ηπατοσπληνομεγαλία. Αμηνόρροια και ίκτερος μπορεί επίσης να συνυπάρχουν. Οι περισσότεροι ασθενείς έχουν ήδη αναπτύξει κίρρωση τη στιγμή της διάγνωσης.

Οξεία μορφή ΑΗ: Παρατηρείται στο 30% των περιπτώσεων. Η κλινική εικόνα μοιάζει με αυτή της οξείας ιογενούς ηπατίτιδας. Στο 20% των περιπτώσεων αυτής της μορφής δεν διαπιστώνεται ίκτερος (ανικτερική μορφή). Σπανιότερα μπορεί να εκδηλωθεί με τη μορφή οξείας κεραυνοβόλου ηπατικής ανεπάρκειας. Η πιθανότητα αυτή είναι συχνή στην πολύ μικρή ηλικία (<10 ετών).

Ασυμπτωματική μορφή ΑΗ: Στο 10% των περιπτώσεων η διάγνωση τίθεται μετά από τυχαία κλινική ή εργαστηριακή εξέταση (διαπίστωση ηπατοσπληνομεγαλίας και μεγάλη αύξηση των αμινοτρανσφερασών αντίστοιχα). Η ΑΗ μπορεί να συνδυάζεται με πολυάριθμα αυτοάνοσα νοσήματα ή σύνδρομα όπως η αυτοάνοση θυροειδίτιδα Hashimoto, η νόσος Graves, η ελκώδης κολίτιδα, η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, το σύνδρομο Sjogren, η πολυμυοσίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η μικτή νόσος του συνδετικού ιστού κ.α (Dalekos 2001A, Dalekos 2008).

5.1.6. Διάγνωση

Η διάγνωση της ΑΗ βασίζεται σε συγκεκριμένες κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους που θεσπίστηκαν ως κριτήρια ταξινόμησης της νόσου το 1993, από τη Διεθνή Ομάδα Μελέτης της ΑΗ και τροποποιήθηκαν το 1999 (Alvarez 1999, Paramichalis 2007, Hennes 2008) και είναι οι εξής (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Διεθνές σύστημα βαθμοποίησης για τη διάγνωση της ΑΗ.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ/ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΒΑΘΜΟΣ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ/ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΒΑΘΜΟΣ
Φύλο		ANA, SMA ή ανη-LKM-1	
Γυναίκα	+2	Τίτλος > 1:80	+3
Άνδρας	0	Τίτλος = 1:80	+2
Ιολογικοί Δείκτες		Τίτλος = 1:40	+1
Θετικοί	-3	Τίτλος < 1:40	0
Αρνητικοί	+3	AMA ΘΕΤΙΚΑ	-4
Λόγος ALP/AST (ή ALT)		Ανταπόκριση στην θεραπεία	
<1,5	+2	Πλήρης ανταπόκριση	+2
1,5-3	0	Υποτροπή	+3
Αύξηση ολικών σφαιρινών ή IgG		Χρήση ηπατοτοξικών παραγόντων	
>2x της ανώτερης φυσιολογικής τιμής	+3	ΝΑΙ	-4
1,5-2x της ανώτερης φυσιολογικής	+2	ΟΧΙ	+1
1-1,5x της ανώτερης φυσιολογικής	+1	Μέση καταναλώση αλκοόλ	
< 1x της ανώτερης φυσιολογικής	0	< 25 g/ημέρα	+2
Βιοψία Ήπατος		>60 g/ημέρα	-2
Περιπυλαία ηπατίτιδα	+3	Χρήση αλκοόλης (<35g, <25g)	+2
Διηθήσεις κυρίως από λεμφοκύτταρα ή και πλάσματοκύτταρα	+1	Άλλες αυτοάνοσες νόσοι	+2
Σχηματισμός ροζετών	+1	Άλλες Παράμετροι	
Τίποτα από τα παραπάνω	-5	Οροθετικότητα για άλλα αυτοαντισώματα	+2
Βλάβες χοληφόρων	-3	HLA DR3 ή DR4	+1
Άλλες βλάβες	+2		

Εντούτοις, ακόμα πιο πρόσφατα τα κριτήρια για τη διάγνωση της ΑΗ απλοποιήθηκαν το 2008 όπως παρακάτω (Πίνακας 7) (Hennes 2008).

Πίνακας 7: Απλοποιημένα διαγνωστικά κριτήρια για την ΑΗ.

Παράμετρος	Όριο	Βαθμός	Όριο	Βαθμός
ANA or SMA	$\geq 1:40$	1	$\geq 1:80$	2
LKM			$\geq 1:40$	
SLA			θετικά	
IgG	>ULN	1	>1.1 X ULN	2
Βιοψία	Συμβατή με ΑΗ	1	Τυπική με ΑΗ	2
Απουσία ιογενών ηπατιτιδών			ΝΑΙ	2
	Πιθανή ΑΗ*	≥ 6	Σίγουρη ΑΗ*	≥ 7

Ο μέγιστος βαθμός για όλα τα αυτοαντισώματα είναι το 2. Το σύνολο των βαθμών είναι 8. * Δεν είναι ξεκάθαρο ποιος βαθμός διαχωρίζει την πιθανή από τη σίγουρη αυτοάνοση ηπατίτιδα.

5.1.7.Θεραπεία

Η νόσος οφείλεται σε διαταραχή της ανοσορρύθμισης και σε δυσλειτουργία των Τ κατασταλατικών λεμφοκυττάρων και για το λόγο αυτό στη θεραπεία της ΑΗ χορηγούνται κορτικοστεροειδή με ή χωρίς συγχορήγηση αζαθειοπρίνης (Czaja 1996). Συνιστάται συγχρόνως σωματική άσκηση και χορήγηση ασβεστίου και βιταμίνης D για αποφυγή της οστεοπενίας, που προκαλούν τα κορτικοστεροειδή. Τα κορτικοστεροειδή με την αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική δράση τους στα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα που διηθούν το ήπαρ μειώνουν την παραγωγή των αυτοαντισωμάτων, ενώ η αζαθειοπρίνη μειώνει τον αριθμό άρα και τη δράση των κυττάρων-φυσικών φονιάδων (NK).

Η μονοθεραπεία με κορτικοστεροειδή προτιμάται σε παιδιά, λευκοπενικούς ασθενείς, έγκυες γυναίκες και σε ασθενείς με νεοπλασίες. Χορηγούνται με προσοχή σε ασθενείς με οστεοπενία, διαβητικούς, παχύσαρκους ή υπέρτασικούς. Ο συνδυασμός κορτικοστεροειδών με αζαθειοπρίνη χορηγείται σε διαβητικούς ασθενείς, οστεοπενικούς, υπέρτασικούς και παχύσαρκους, ενώ αντενδείκνυται σε έγκυες γυναίκες, λευκοπενικούς ασθενείς και σε ασθενείς με νεοπλασίες. Η θεραπεία στην ΑΗ μπορεί να είναι:

A.Αγωγή δια βίου, αφού η ΑΗ συνήθως υποτροπιάζει με τη διακοπή της θεραπείας.

B.Αγωγή με δόσεις εφόδου αρχικά και στη συνέχεια με δόση συντήρησης για 28 μήνες τουλάχιστον. Εφόσον ο ασθενής παραμένει κλινικά, βιοχημικά και ιστολογικά βελτιωμένος γίνεται προσπάθεια διακοπής της αγωγής στους 36 μήνες.

Γ.Διαλείπουσα αγωγή με μεταβολή της δοσολογίας των φαρμάκων και της διάρκειας της θεραπείας ανάλογα με την κλινική και βιοχημική εικόνα του ασθενούς.

Στόχος της θεραπείας είναι η ύφεση της νόσου. Ο μέσος όρος του χρόνου που απαιτείται για την επίτευξη ύφεσης είναι 6 έως 36 μήνες. Ως πλήρης ύφεση ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία ο ασθενής απαλλάσσεται από τα συμπτώματα, η ηπατική βιοχημεία και οι τιμές της IgG καθίσταται φυσιολογικές και η ιστοπαθολογική εικόνα του ήπατος είναι σχεδόν φυσιολογική. Ως μερική ύφεση ορίζεται η κατάσταση όπου εκτός από τη βελτίωση των συμπτωμάτων, παρατηρείται και βελτίωση της ηπατικής βιοχημείας κατά 50% αν και οι αμινοτρανσφεράσες και η IgG δεν έχουν επανέλθει στα φυσιολογικά επίπεδα κατά τον πρώτο χρόνο της θεραπείας. Καμία ανταπόκριση δε σημειώνεται όταν η ηπατική βιοχημεία δεν παρουσιάζει σημαντική βελτίωση. Αποτυχία στη θεραπεία θεωρείται όταν η νόσος επιδεινώνεται παρά την αγωγή. Ως υποτροπή της νόσου ορίζεται η κατάσταση όπου μετά από πλήρη ανταπόκριση και διακοπή της θεραπείας, παρατηρείται νέα αύξηση των αμινοτρανσφερασών ή της IgG ανοσοσφαιρίνης. Υποτροπή παρατηρείται στο 50% των ασθενών κατά το πρώτο εξάμηνο μετά από 6 μήνες από τη διακοπή της θεραπείας αποτελώντας σημαντικό κλινικό πρόβλημα (Cjaza 2009). Στους κίρρωτικούς ασθενείς υποτροπή παρατηρείται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 85%, αν και η θεραπεία διακόπτεται στα 2 έτη και οι ασθενείς αυτοί αντιμετωπίζονται καλύτερα με μικρές δόσεις κορτικοειδών για μεγάλο διάστημα (ίσως και εφόρου ζωής).

5.2. ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ (ΠΧΚ)

Αποτελεί χρόνια χολοστατική νόσο του ήπατος αγνώστου αιτιολογίας που έχει ύπουλη έναρξη και προσβάλλει κυρίως γυναίκες μέσης ηλικίας 40-60 χρονών (90% των ασθενών). Ο επιπολασμός της υπολογίζεται περίπου στις 50 περιπτώσεις/10⁶ κατοίκους. Παρόλα αυτά σήμερα με την ευρεία χρήση των αυτόματων αναλυτών η συχνότητα της νόσου φαίνεται να αυξάνει μέχρι και 250 περιπτώσεις/10⁶ κατοίκους λόγω της ανακάλυψης ασυμπτωματικών ασθενών (διάγνωση μετά από τυχαία ανίχνευση αυξημένων επιπέδων αλκαλικής φωσφατάσης και/ή γ-GT). Παθογενετικά, χαρακτηρίζεται από προοδευτική καταστροφή των μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων με ανοσολογικούς μηχανισμούς.

Η νόσος ακολουθεί μια εξελεκτική πορεία χωρίς αυτόματες υφέσεις, που οδηγεί σε ηπατοκυτταρική βλάβη (πιθανά από τη δράση των χολικών οξέων) και στη χαρακτηριστική χολικού τύπου διαβρωτική νέκρωση, πυλαία ίνωση και κίρρωση. Χωρίς μεταμόσχευση η μέση επιβίωση συμπτωματικών ασθενών με προχωρημένο στάδιο είναι 6-8 χρόνια. Αντίθετα, η πορεία είναι πολύ καλύτερη στους ασυμπτωματικούς ασθενείς (μέση επιβίωση 16 χρόνια). Η ΠΧΚ σχετίζεται με την παρουσία διαφόρων αυτοάνοσων νοσημάτων που φαίνονται στον Πίνακα 8 (Kaplan 2005, Dalekos 1993B, Gatselis 2007Γ).

Πίνακας 8: Αυτοάνοσα νοσήματα ή σύνδρομα που σχετίζονται με την ΠΧΚ.

Σύνδρομο Sicca	Πολυμυοσίτιδα
Σύνδρομο Sjogren	Ρευματική Πολυμυαλγία
Ρευματοειδής Αρθρίτιδα	Σκληρόδερμα
Αυτοάνοσα Νοσήματα Θυρεοειδούς	Συστηματικός Ερυθηματώδης λύκος
Μεικτή Νόσος του Συνδετικού Ιστού	Αντιφωσφολιπιδικό Σύνδρομο
Μυασθένεια Gravis	Κακοήθης Αναιμία Biermer
Ιδιοπαθής Πνευμονική ίνωση	Εξωκρινής Παγκρεατική Ανεπάρκεια
Ελκώδης Κολίτιδα	Νεφρική Σωληναριακή Οξέωση
Λεύκη	Πορφύρα Henoch-Schoulein

5.2.1. Αιτιοπαθογένεια νόσου

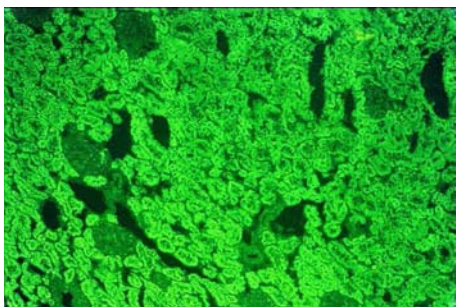
Η καταστροφή του ενδοθηλίου των χοληφόρων οδών είναι το ιστολογικό χαρακτηριστικό γνώρισμα της ΠΧΚ. Ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για τη βλάβη παραμένει άγνωστος. Πειραματικές μελέτες προτείνουν ότι η καταστροφή του επιθηλίου των χοληφόρων ξεκινά από περιβαλλοντικά ερεθίσματα που δρουν σε προδιατεθειμένα γενετικώς άτομα (Jones 2007). Οι γενετικοί παράγοντες φαίνεται να επιδρούν πιο ισχυρά στην παθογένεια της ΠΧΚ σε σχέση με τα υπόλοιπα αυτοάνοσα νοσήματα (Invernizzi 2008). Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου στους πρώτου βαθμού συγγενείς είναι 50 με 100 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό (Parikh-Patel 1999). Μεταξύ των μονοζυγωτικών διδύμων που έχουν τη νόσο αν και η ηλικία έναρξης είναι η ίδια, η πρόοδος της νόσου μπορεί να διαφέρει, υποδεικνύοντας έμμεσα την εμπλοκή γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (Selma 2004).

Οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα λεμφοκύτταρα σχετίζονται στενά με την πρόοδο της χολικής βλάβης στην ΠΧΚ επειδή τα επιθηλιακά χολικά κύτταρα φέρνουν αρκετούς υποδοχείς κυτταρικών όπως είναι η ιντερλευκίνη 4, η ιντερλευκίνη 6, η ιντερφερόνη-γ και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α). Επιπρόσθετα, τα χολικά επιθηλιακά κύτταρα παράγουν τον TNF-α και την ιντερλευκίνη 6, που έχουν αυτοκρινή και παρακρινή δράση. Τα φλεγμονώδη κύτταρα στις πυλαίες οδούς στην ΠΧΚ είναι τα CD8 και τα CD4 λεμφοκύτταρα. Η παρουσία των κυττάρων του ανοσοποιητικού μέσα στα χολικά επιθηλιακά στρώματα και η άμεση προσκόλληση μεταξύ των χολικών επιθηλιακών κυττάρων και των κυττάρων του ανοσοποιητικού είναι τα γεγονότα κλειδιά, που συμβάλλουν στη διαμεσολαβούμενη από τα κύτταρα κυτταροτοξικότητα και στην απόπτωση των χολικών επιθηλιακών κυττάρων (Chandra 2000, Salunga 2007, Takeda 2003, Tsikrikoni 2005).

5.1.2. Εργαστηριακά ευρήματα

Οι λειτουργικές δοκιμασίες του ήπατος δείχνουν αύξηση των χολοστατικών ενζύμων και της χοληστερόλης, ενώ σε προχωρημένα στάδια υπάρχει αύξηση και της χολερυθρίνης (κυρίως άμεση ή συζευγμένη). Η χολερυθρίνη αποτελεί τον καλύτερο προγνωστικό εργαστηριακό δείκτη σχετικά με την αναγκαιότητα ή όχι μεταμόσχευσης ήπατος (απόλυτη ένδειξη όταν είναι >10

mg/dl). Υπάρχει επίσης υπεργαμμασφαιριναιμία (στις περισσότερες περιπτώσεις οφειλόμενη σε μεγάλη αύξηση της IgM ανοσοσφαιρίνης) (Zachou 2004B). Η διάγνωση βασίζεται στην ανίχνευση των AMA (αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων) (Liaskos 2007). Τα AMA ανιχνεύονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό (ΕΑΦ) στο 95% των περιπτώσεων και για αυτό θεωρούνται παθογνωμικά της νόσου (η ειδικότητα τους αγγίζει το 100% όταν οι τίτλοι είναι >1:160). Στην τεχνική του ΕΑΦ χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα ιστικές τομές κρουστάτη από ήπαρ και νεφρούς αρουραίων ή ο κυτταρικός κλώνος HEp2 από ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα λαρυγγικού καρκινώματος (θετικός τίτλος >1:80) (Shimoda 2008, Rigoroulou 2008). Το χαρακτηριστικό πρότυπο των AMA αποτελεί η θετική φθορίζουσα αντίδραση τόσο στα εγγύς όσο και στα άπω νεφρικά σωληνάκια, ενώ το σπείραμα είναι αρνητικό (Εικόνα 40).



Εικόνα 40: Έμμεσος ανοσοφθορισμός για ανίχνευση αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων. Αντιμιτοχονδριακά αντισώματα αντιδρούν στα εγγύς και στα άπω σωληνάκια του νεφρού των αρουραίων (μεγέθυνση x40). Σε αυτές τις περιπτώσεις υπάρχει επίσης δραστικότητα στα κύτταρα του στομάχου (Zachou 2004A).

Σύμφωνα με την παλαιά ονοματολογία το μιτοχονδριακό αντιγόνο των AMA ονομάστηκε M2. Υπάρχουν και άλλα μιτοχονδριακά αντιγόνα (ανάλογα με τις συνθήκες φυγοκέντρωσης για το διαχωρισμό τους) που δίνουν το χαρακτηριστικό φθορισμό των AMA. Αυτά ονομάστηκαν M1 και M3-M9. Τα μιτοχονδριακά αυτοαντιγόνα-στόχοι των AMA στην ΠΧΚ αποτελούν συστατικά (ενζυμικές υπομονάδες) του συμπλέγματος της 2-κετοξικής δεϋδρογονάσης (Πίνακας 10) που εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων των θηλαστικών. Σε κάθε περίπτωση, η αντιδραστικότητα του αντισώματος κατά του ενζυμικού συμπλέγματος αφορά κυρίως την E2 ενζυμική υπομονάδα (Liaskos 2007, Rigoroulou 2005Γ, Rigoroulou 2008, Shimoda 2008) (Πίνακας 9 και 10).

Πίνακας 9: Οι υπομονάδες του συμπλέγματος της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης, η μοριακή ταυτοποίηση, η τρέχουσα ονοματολογία, το μοριακό βάρος (MB) και η λειτουργία των αντίστοιχων αυτοαντισωμάτων.

Μοριακή Ταυτοποίηση	Ονοματολογία	Λειτουργία
Πυροσταφυλική δεϋδρογονάση		
E1-α- αποκαρβοξυλάση	M2d	Αποκαρβοξυλίωση πυροσταφυλικού με πυροφωσφορική θειαμίνη σαν συμπ παράγοντα
E1-β αποκαρβοξυλάση	M2e	Αποκαρβοξυλίωση πυροσταφυλικού με πυροφωσφορική θειαμίνη σαν συμπ παράγοντα
E2-ακετυλοτρανσφεράση	M2a	Μεταφορά ακετυλομάδων από E1 στο συνένζυμο A (CoA)
Πρωτεΐνη X	M2c	Άγνωστη

Πίνακας 10: Οι υπομονάδες του συμπλέγματος της 2-κετοξικής και της κετογλουταερικής δεϋδρογονάσης, η μοριακή ταυτοποίηση, η τρέχουσα ονοματολογία, το μοριακό βάρος (MB) και η λειτουργία των αντίστοιχων αυτοαντισωμάτων.

Μοριακή Ταυτοποίηση	Ονοματολογία	Λειτουργία
2-κετοξική δεϋδρογονάση		
E2- ακυλοτρανσφεράση	M2c	Μεταφορά ακετυλομάδων από E1 στο συνένζυμο A (CoA)
Κετογλουταερική δεϋδρογονάση		
E2-ηλεκτρική τρανσφεράση	M2c	Μεταφορά ηλεκτρολυμάτων από E1 στο συνένζυμο A (CoA)

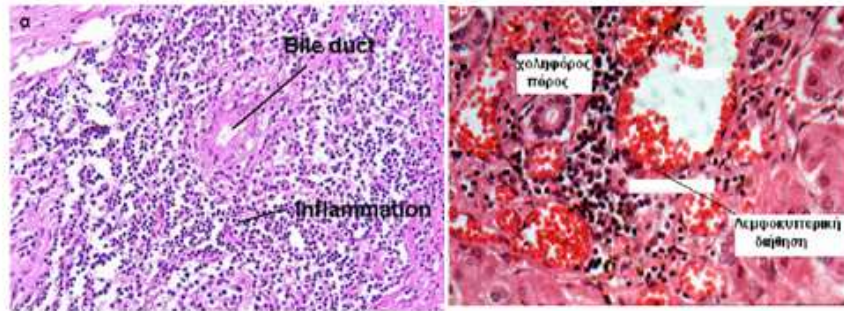
Άλλα αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται σε χαμηλότερα ποσοστά στην ΠΧΚ φαίνονται στον Πίνακα 11 (Bogdanos 2007, Rigoroulou 2004, Rigoroulou 2005Γ, Rigoroulou 2007Γ, Rigoroulou 2007Δ, Zachou 2006). Μεταξύ αυτών των αυτοαντισωμάτων τα ειδικά για τη νόσο ANA και συγκεκριμένα τα anti-gr 210 & anti-sp100 έχουν συσχετισθεί με ταχύτερη πρόοδο του νοσήματος και χειρότερη έκβαση (Bogdanos 2007, Rigoroulou 2004, Rigoroulou 2008).

Πίνακας 11: Άλλα αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται σε χαμηλότερα ποσοστά στην ΠΧΚ.

ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (%)
ANA (Αντιπυρηνικά αντισώματα)	
AKA (Αντικεντρομεριδιακά)	12
Συστατικά πυρηνικής μεμβράνης	
gp 210	10-41
p62	22
Υποδοχέας β-λαμίνης	1
Ρυθμιστικών πρωτεϊνών του πυρήνα	
Sp 100	40(AMA +), 60 (AMA -)
Κυκλίνη A	8
p-ANCA (κατά λακτοφερίνης κυτταρόπλασμα ουδετεροφίλων)	35.7
Αντισώματα κατά καρβονικής ανυδράσης	8.3
Αντιαιμοπεταλιακά αντισώματα	40

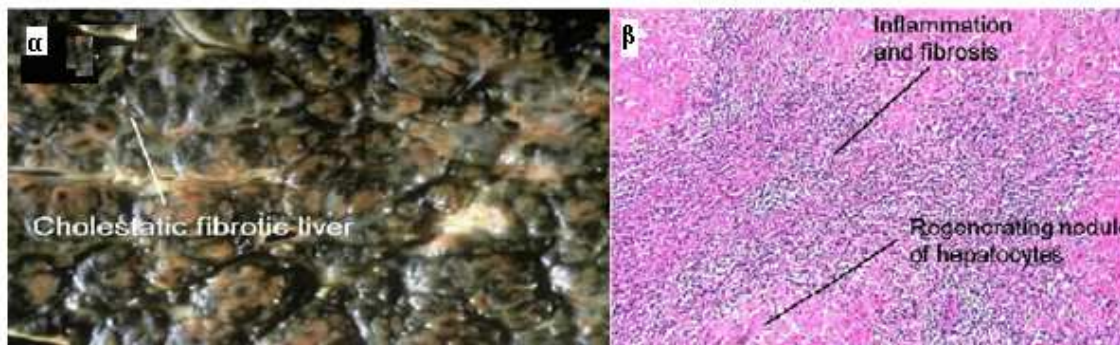
5.1.3. Ιστολογικά ευρήματα

Η ΠΧΚ χαρακτηρίζεται από τέσσερα ιστολογικά στάδια (Hubscher 1993). Στο πρώτο στάδιο υπάρχει παθολογική ασύμμετρη καταστροφή των διαφραγματικών και των ενδολοβιακών χολαγγείων. Τα χολαγγεία διηθούνται από μονοκύτταρα που στην πλειονότητα τους είναι Τ-λεμφοκύτταρα (CD8 κατασταλτικά-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα). Οι βλάβες διαχέονται ανώμαλα στα πυλαία διαστήματα (εκεί επικρατούν τα CD4 βοηθητικά-επαγωγικά λεμφοκύτταρα) δίνοντας την εικόνα φλεγμονής, που αναφέρεται σαν “χολική” πυλαία ηπατίτιδα. Λόγω της κατά τόπους καταστροφής των χολαγγείων όλα τα παραπάνω ευρήματα βρίσκονται συνήθως μόνο σε μεγάλα χειρουργικά βιοπτικά παρασκευάσματα. Στο στάδιο αυτό είναι επίσης δυνατόν να παρατηρηθούν κοκκιωματώδεις βλάβες. Στο στάδιο II οι βλάβες είναι περισσότερο διάχυτες, αλλά λιγότερο ειδικές. Συνήθως τα φυσιολογικά χολαγγεία στα πυλαία διαστήματα απουσιάζουν ή είναι εξαιρετικά μειωμένα, ενώ αντίθετα παρατηρείται αυξημένος αριθμός άτυπων χολαγγείων που χαρακτηρίζονται από το ανώμαλο σχήμα και τον εξαφανισμένο αυλό. Γύρω και εντός του πυλαίου διαστήματος παρατηρείται διάχυτη ίνωση, εστιακή νέκρωση και φλεγμονώδεις διηθήσεις (περιπυλαία ηπατίτιδα) (Εικόνα 41).



Εικόνα 41: Οι αλλαγές εδώ είναι ευδιάκριτες. α) Γύρω από το χοληφόρο πόρο παρατηρούνται διηθήσεις από λεμφοκύτταρα (HES *400). β) Παρατηρούνται λεμφοκυτταρικές διηθήσεις (κόκκινες κουκίδες) και εστιακή νέκρωση (μαύρες κουκίδες) (HES *600).

Στο στάδιο III, οι βλάβες έχουν εξελιχθεί περισσότερο. Παρατηρούνται ινώδη διαφράγματα πέραν των πυλαίων διαστημάτων και πυλαίο-πυλαίες γεφυροποιές νεκρώσεις. Μπορεί επίσης να παρατηρηθούν όζοι και περιπυλαία χολόσταση (Εικόνα 42). Τέλος, το στάδιο IV αποτελεί το τελικό στάδιο της νόσου, όπου είναι παρόντα πλέον σαφή σημεία κίρρωσης (αναγεννητικά οζία, ίνωση). Πολλές φορές η ιστολογική διακρίση της από άλλα αίτια κίρρωσης είναι δύσκολη.



Εικόνα 42: α) Γεφυροποιός ίνωση και χολόσταση (*100). γ) Φλεγμονή και ίνωση, Αναγεννητικοί όζοι (HES *400).

5.2.4.Κλινικές Εκδηλώσεις

Ασυμπτωματική νόσος: Αρκετοί ασθενείς (έως και το 40% των περιπτώσεων) είναι ασυμπτωματικοί για πολλά χρόνια πριν από τη διάγνωση. Η αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης 2 με 3 φορές πάνω από το φυσιολογικό είναι το μοναδικό παθολογικό χαρακτηριστικό που παρατηρείται. Υπάρχει ηπατομεγαλία. Τα AMA βρίσκονται στο 95% των ασθενών. Κάποιοι ασθενείς ανιχνεύονται στο ασυμπτωματικό στάδιο, λόγω των εξετάσεων ρουτίνας που κάνουν για τα συμπτώματα που έχουν από άλλα νοσήματα που σχετίζονται με την ΠΧΚ (υπερχοληστερολαιμία, οστεοπενία, στεατόρροια κ.λ.π.). Η υπερχοληστερολαιμία είναι λόγω

χολόστασης, ενώ η στεατόρροια οφείλεται στην ανεπαρκή έκκριση χολής στο έντερο με αποτέλεσμα να υπάρχει δυσσαπορόφηση των βιταμινών (A, D, E και K) (Prince 2004).

Συμπτωματική νόσος: Έντονος γενικευμένος κνησμός αποτελεί συνήθως το πρώτο σύμπτωμα. Ο κνησμός μπορεί να προηγείται μέχρι και δυο χρόνια από την εμφάνιση του ίκτερου. Παραδοσιακά, πιστευόταν ότι ο κνησμός οφείλεται στην αυξημένη συσσώρευση των χολικών οξέων στο διάμεσο υγρό του δέρματος (περιφερική αιτιολογία). Σήμερα έχει αποδειχθεί σε πειραματικά μοντέλα αλλά και στην κλινική πράξη ότι ο κνησμός οφείλεται και στα ενδογενή οπιοειδή λόγω του αυξημένου τόνου που παρουσιάζουν οι υποδοχείς τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) σε παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από χολόσταση (κεντρική αιτιολογία). Επιπλέον, έχει ενοχοποιηθεί και διαταραχή της λειτουργίας του τόνου των σεροτονινεργικών υποδοχέων στο ΚΝΣ (5-HT₃ υποδοχείς σεροτονίνης). Ένα άλλο κυρίαρχο σύμπτωμα της νόσου (πολλές φορές μπορεί να είναι το μοναδικό) αποτελεί το αίσθημα κόπωσης που είναι σημαντικού βαθμού και δεν αποδίδεται στα πλαίσια της χρόνιας νόσου. Αντίθετα, πιστεύεται ότι είναι αποτέλεσμα του αυξημένου τόνου των σεροτονινεργικών υποδοχέων στο ΚΝΣ λόγω της παρατεταμένης χολόστασης (5-HT₂ υποδοχείς σεροτονίνης). Συχνά κατά τη διάγνωση υπάρχει ήπατοσπληνομεγαλία.

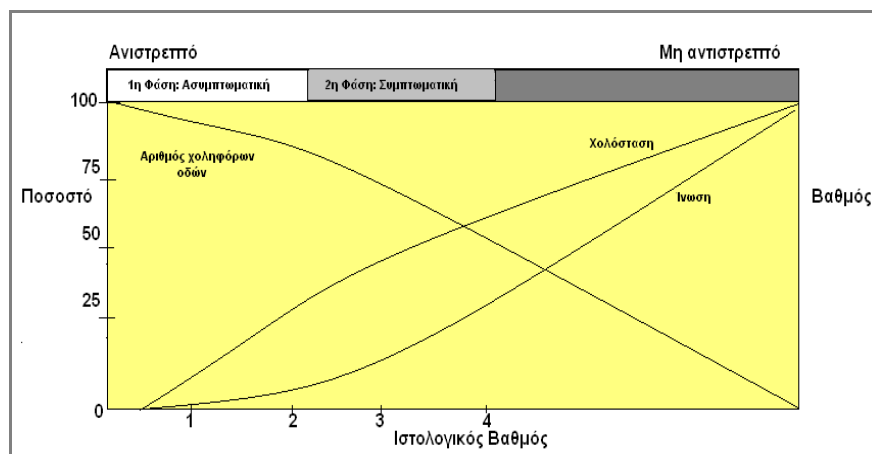
Λόγω της επακόλουθης από τη χολόσταση υπερχοληστερολαιμίας είναι δυνατόν να παρατηρηθούν ξανθώματα (δέρμα, τένοντες) και ξανθελάσματα (βλέφαρα). Η παρουσία ικτέρου και σημείων πυλαίας υπέρτασης αποτελούν όψιμα ευρήματα. Όχι σπάνια, η νόσος επιπλέκεται από στεατόρροια, οστεοπόρωση, οστεομαλακία (Maddrey 1990) και ασυμπτωματική βακτηριουρία, η οποία πρέπει να θεραπεύεται. Εκτός από τα χαρακτηριστικά ευρήματα της ΠΧΚ μπορεί να παρατηρηθούν ποικίλα φυσικά σημεία και συμπτώματα, αποτέλεσμα των καταστάσεων που περιγράφονται στον Πίνακα 8. Η προχωρημένη νόσος εκδηλώνεται με τις επιπλοκές της κίρρωσης, όπως είναι ο ασκίτης και η ηπατική εγκεφαλοπάθεια.

5.2.5. Διαφορική διάγνωση

Η διαφορική διάγνωση πρέπει να γίνει κυρίως από τη δευτεροπαθή χολική κίρρωση που είναι συνήθως αποτέλεσμα χρόνιας απόφραξης του χοληφόρου δένδρου από λίθο, ουλώδη στένωση (π.χ μετά από επανειλημμένες εγχειρήσεις στα χοληφόρα ή μετά από υποτροπιάζουσες χολαγγειίτιδες), νεόπλασμα ή ατρησία των χοληφόρων. Η ΠΧΚ πρέπει επίσης να διαφοροδιαγνωσθεί από τη σαρκοειδωση, τη χολοστατική νόσο που παρατηρείται στη φλεγμονώδη πάθηση των εντέρων (ελκώδης κολίτιδα, νόσος Crohn) και η οποία είναι γνωστή και σαν περιχολαγγειίτιδα ή πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ) των μικρών χοληφόρων. Τέλος, σε ορισμένες περιπτώσεις πρέπει να διακριθεί από την ηπατοπάθεια που επάγεται από φάρμακα (ιδιαίτερα αυτά που προκαλούν χολοστατικού τύπου βλάβες) και τη χρόνια ηπατίτιδα οποιασδήποτε αιτιολογίας κυρίως δε από την ΑΗ.

5.2.6. Φυσική Ιστορία

Η φυσική ιστορία είναι μια κατάσταση εξέλιξης (Pares 2003). Η στιγμή της έναρξης στην προεμμηνοπαυσιακή φάση δεν είναι ξεκάθαρη καθώς έχουν ανιχνευθεί νεότεροι ασθενείς με ήπιες παθολογικές εξετάσεις ήπατος. Ένα μοντέλο της φυσικής ιστορίας φαίνεται στην Εικόνα 43.



Εικόνα 43: Φυσική ιστορία της ΠΧΚ (Από Wiesner et al. Mayo Clin Proc 1994, 69:969).

Αυτό το μοντέλο υποθέτει ότι υπάρχει ένας συγκεκριμένος αριθμός χοληφόρων πόρων και όταν οι χοληφόροι πόροι καταστρέφονται δεν μπορούν να αναγεννηθούν. Καθώς οι χοληφόροι πόροι καταστρέφονται βαθμιαία, ο αριθμός τους μειώνεται και η νόσος προοδεύει ιστολογικά από το στάδιο 1 στο στάδιο 4. Ο ασθενής προοδεύει από την ασυμπτωματική στη συμπτωματική

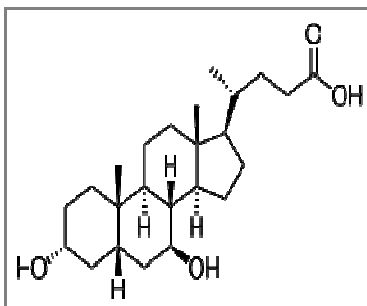
φάση. Αυτή η πρόοδος συνοδεύεται με σημάδια χολόστασης και σχετίζεται με την ανάπτυξη ίνωσης και δυσλειτουργίας με τελικό αποτέλεσμα τη μετατροπή από την αντιστρεπτή στη μη αντιστρεπτή μορφή (ανάπτυξη κίρρωσης). Για να είναι δραστική η ιατρική παρέμβαση πρέπει να ξεκινήσει στην αρχική πορεία της νόσου, όπου είναι ενδεχομένως δυνατή η αντιστροφή της ιστολογίας.

5.2.7.Θεραπεία

Η θεραπεία είναι κυρίως συμπτωματική. Ιοντοανταλλακτικές ρητίνες που δεσμεύουν τα χολικά άλατα όπως, η χολεστυραμίνη και η κολεστιπόλη χορηγούνται για την αντιμετώπιση του κνησμού. Λαμβάνοντας υπόψη την τρέχουσα αιτιοπαθογενετική άποψη για την ανάπτυξη του κνησμού στην ΠΧΚ, η χορήγηση ανταγωνιστών των οπιοειδών (π.χ ναλοξόνη ή ναλτρεξόνη), φαίνεται να αποτελεί σήμερα την πιο καλή και ελπιδοφόρο θεραπευτική προσέγγιση στην αντιμετώπιση του βασανιστικού αυτού συμπτώματος της ΠΧΚ. Για την αντιμετώπιση του αισθήματος κόπωσης έχει δοκιμαστεί μέχρι στιγμής μόνο σε πιλοτικές μελέτες με πολύ καλά αποτελέσματα, η χορήγηση ανταγωνιστών των σεροτονινεργικών υποδοχέων της σεροτονίνης. Ανεπάρκεια λιποδιαλυτών βιταμινών (Α,Δ,Ε,Κ) παρατηρείται όταν συνυπάρχει στεατόρροια (το πρόβλημα επιδεινώνεται ακόμη περισσότερο μετά από τη χορήγηση χολεστυραμίνης ή κολεστιπόλης), οπότε απαιτείται συνήθως θεραπεία υποκατάστασης. Προσθήκη ασβεστίου και βιταμίνης D βοηθά στην αποφυγή της οστεομαλακίας, αλλά είναι αβέβαιο αν ωφελούν στην πρόληψη της οστεοπόρωσης. Η θεραπεία της οστεοπόρωσης της ΠΧΚ δεν διαφέρει από αυτή της μετεμμηνοπαυσιακής εκτός ίσως της χορήγησης οιστρογόνων που στην ΠΧΚ πρέπει μάλλον να αποφεύγεται αφού υπάρχει αυξημένος κίνδυνος επίτασης της χολόστασης. Τα διφωσφονικά φαίνεται να έχουν τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τη χορήγηση καλσιπονίνης ή νατριούχων αλάτων φθορίου.

Για τη βασική νόσο έχουν δοκιμαστεί στο παρελθόν η D-πενικιλλαμίνη, τα κορτικοστεροειδή, η χλωραμβουκίλη, η αζαθειοπρίνη και η κυκλοσπορίνη χωρίς κάποιο σημαντικό όφελος. Από τις παραπάνω θεραπείες προτιμάται το UDCA. Το UDCA είναι ένα είδος δευτερογενούς χολικού οξέος (Εικόνα 44) που παράγεται από το μεταβολισμό των πρωτογενών χολικών οξέων από τα

βακτήρια του εντέρου. Και τα δυο είδη χολικών οξέων βοηθούν στην πέψη. Το UDCA βοηθά στο να ρυθμίζεται η χοληστερόλη με το να διασπά τα μικκύλια που περιέχουν χοληστερόλη (Balan 1994).



Εικόνα 44: Χημικός τύπος UDCA. 3α,7β-διϋδροξυ-5β-24χολικό οξύ (ουρσοδιόλη ή ουρσοδεοξυχολικό οξύ).

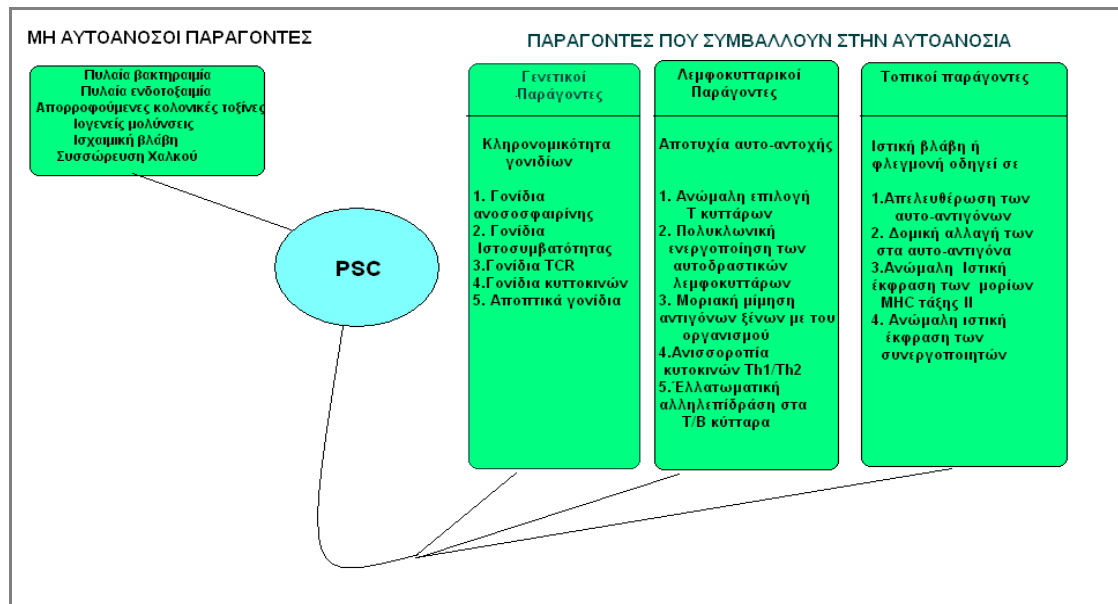
Το UDCA φαίνεται να αναστέλλει την απόπτωση (Amaral 2009), καθώς και να έχει ανοσοκατασταλτική δράση με το να καταστέλλει τη φαγοκυττάρωση και να λειτουργεί ως σηματοδοτικό μόριο για να ρυθμίζει την αναγέννηση του ήπατος. Έχει χρησιμοποιηθεί ως πειραματικό εργαλείο σε μελέτες αναγέννησης του ήπατος. Χρειάζονται όμως και κλινικές μελέτες για να επιβεβαιώσουν αυτό. Το UDCA βελτιώνει σαφώς τους βιοχημικούς δείκτες, μειώνει την πρόοδο της νόσου και επομένως φαίνεται να καθυστερεί την ανάγκη για μεταμόσχευση. Δεν βελτιώνει όμως σημαντικά τη συνολική επιβίωση (Lindor 1994). Συνδυασμοί UDCA με κολχικίνη, κορτικοστεροειδή ή μεθοτρεξάτη δεν είχαν καλύτερα αποτελέσματα από τη χορήγηση μόνου του UDCA. Στο τελικό στάδιο της νόσου οριστική θεραπεία αποτελεί η μεταμόσχευση ήπατος (85-90% επιβίωση στον πρώτο χρόνο). Όχι σπάνια, η μεταμόσχευση μπορεί να πραγματοποιηθεί λόγω έντονου, βασανιστικού κνησμού που δεν μπορεί να ελεγχθεί με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ποιότητα ζωής του ασθενούς. Αξίζει να σημειωθεί όμως, ότι η νόσος μπορεί να υποτροπιάσει στο μόσχευμα (συχνότητα περίπου 10% στα πρώτα 10 χρόνια μετά από τη μεταμόσχευση).

5.3. ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΤΙΚΗ ΧΟΛΑΓΕΙΙΤΙΔΑ (ΠΣΧ)

Αποτελεί νόσο αγνώστου αιτιολογίας που προσβάλλει κυρίως άνδρες ηλικίας 20-40 χρονών (>50% των περιπτώσεων). Χαρακτηρίζεται από φλεγμονή, ίνωση και στενώσεις του αυλού του έξω- και ένδο-ηπατικού χοληφόρου δένδρου. Η περιοχή της βλάβης μπορεί να κυμαίνεται από μερικά χιλιοστά έως και ολόκληρο το χοληφόρο δένδρο. Η κοινή λειτουργική διαταραχή των περιπτώσεων ΠΣΧ είναι η χολόσταση. Περίπου στα 2/3 των ασθενών συνυπάρχει ελκώδης κολίτιδα. Εν τούτοις μόνο 1-4% των ασθενών με ελκώδη κολίτιδα αναπτύσσουν κλινικά σημαντική ΠΣΧ. Ο επιπολασμός της νόσου φαίνεται να αυξάνει σε παγκόσμια κλίμακα (4-6 περιπτώσεις/100.000 κατοίκους). Οι ασθενείς έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης χολαγγειοκαρκινώματος ανεξάρτητα του σταδίου της νόσου (10% των περιπτώσεων).

5.3.1. Αιτιοπαθογένεια νόσου

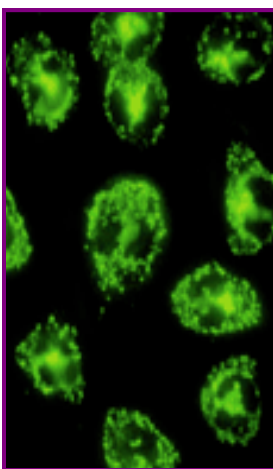
Στην αιτιοπαθογένεια της νόσου έχουν ενοχοποιηθεί παράγωγα βακτηριδίων, ανοσολογικοί και γενετικοί μηχανισμοί (αυξημένη συχνότητα μεταξύ των ασθενών των απλότυπων HLA-B8, DR3 και DRw7). Οι παράγοντες αυτοί αξιολογούνται στο κατά πόσο σχετίζονται με αυτοάνοσες αντιδράσεις ή όχι (Εικόνα 45). Η δράση των βακτηρίων συμβάλλει στην παραγωγή των χολικών οξέων όπως στην παραγωγή του λιθοχολικού οξέος. Αυτά τα χολικά οξέα μπορούν να απορροφηθούν από την κυκλοφορία του αίματος δημιουργώντας πυλαία φλεγμονή (Warren 1996).



Εικόνα 45: Αιτιοπαθογένεια της πρωτοπαθούς σκληρυντικής χολαγγειίτιδας.

5.3.2.Εργαστηριακά ευρήματα

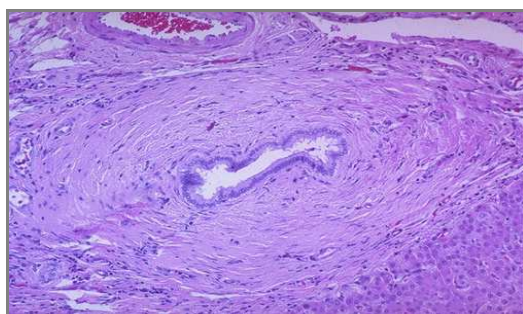
Στον εργαστηριακό έλεγχο διαπιστώνεται αύξηση των χολοστατικών ενζύμων και της χολερυθρίνης (φυσιολογική στα αρχικά στάδια), ενώ οι αμινοτρανσφεράσες παρουσιάζουν μικρή αύξηση. Υπεργαμμασφαιριναιμία παρατηρείται στο 30-50% των ασθενών με πιο συχνή την αύξηση της IgM ανοσοσφαιρίνης (40-50%). Ανιχνεύονται επίσης SMA (11%), ANA (6-35%), p-ANCA στο 65% των ασθενών αν και το εύρημα αυτό υποδεικνύει μάλλον ταυτόχρονη ύπαρξη ελκώδους κολίτιδας (Εικόνα 46) (Dalekos 1993B). Αντίθετα AMA δεν ανιχνεύονται σχεδόν ποτέ (Dalekos 2002B, Rigoroulou 2008, Zachou 2004A).



Εικόνα 46: Ανοσοφθορισμός σε τομές κρουστάτη αουραίου α) αντισώματα έναντι κυτταροπλάσματος ουδετεροφίλων (pANCA), β) πυρηνικά αντισώματα (ANA) στο ήπαρ.

5.3.3. Ιστολογικά ευρήματα

Ιστολογικά οι μεταβολές που παρατηρούνται στο ηπατικό παρέγχυμα με τη βιοψία ήπατος διακρίνονται σε τέσσερα στάδια (όπως και στην ΠΧΚ) που δύσκολα διαχωρίζονται από την ΠΧΚ, αφού οι βλάβες είναι σχεδόν πανομοιότυπες ανά στάδιο. Χαρακτηριστικά ευρήματα δίνουν συνήθως βιοπτικά παρασκευάσματα από τα εξωηπατικά και τα μέσου και μεγάλου μεγέθους ενδοηπατικά χοληφόρα, όπου μπορεί να παρατηρηθεί συγκεντρική πάχυνση και ίνωση του τοιχώματος και καταστροφή των χοληφόρων και αντικατάσταση τους από ουλώδη συνδετικό ιστό (Εικόνα 47). Ο συνδυασμός των παραπάνω αλλοιώσεων με ταυτόχρονα ευρήματα από τα μικρού μεγέθους μεσολοβιδιακά χοληφόρα, όπως η παρουσία οιδήματος σε ορισμένα πυλαία διαστήματα με συνοδό διήθηση των χολαγγείων από μονοκύτταρα, η εστιακή χολαγγειοπενία ή τέλος η ύπαρξη περιχολαγγειακής ίνωσης είναι σχεδόν διαγνωστικά της ΠΣΧ (Nakanuma 1986).



Εικόνα 47: Μικροσκοπικά ο χοληφόρος πόρος περιβάλλεται από αξιοσημείωτη εναπόθεση συνδετικού ιστού (onion like lesions).

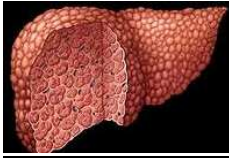
5.3.4.Κλινική εικόνα

Αρχικά οι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί και η διάγνωση μπορεί να τεθεί μετά από τυχαία ανεύρεση αυξημένων χολοστατικών ενζύμων (αν και ορισμένοι από αυτούς μπορεί να έχουν ήδη σημαντικά προχωρημένη νόσο στη βιοψία ήπατος). Τα κλινικά ευρήματα και τα συμπτώματα της νόσου αφορούν προοδευτικά επιδεινούμενο αποφρακτικό ίκτερο, κακουχία, κνησμό, ανορεξία και δυσπεψία. Όταν εκδηλωθούν σχετίζονται συνήθως με προχωρημένη νόσο. Στο 10-15% των ασθενών κατά τη στιγμή της διάγνωσης μπορεί να υπάρχουν επιπλέον, πυρετός με ρίγος, νυκτερινοί ιδρώτες και άλγος στο δεξιό υποχόνδριο. Εκτός της ελκώδους κολίτιδας άλλες νοσολογικές οντότητες αυτοάνοσου αρχής που συνδυάζονται με την ΠΣΧ είναι η ψωρίαση, το

σύνδρομο Sicca, η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα και η οροαρνητική αρθρίτιδα. Η διάγνωση γίνεται ιστολογικά και από τα ευρήματα στην ενδοσκοπική παλίνδρομη χολαγγειογραφία (ERCP). Επίσης στηρίζεται στις χαρακτηριστικές αλλοιώσεις στα ένδο και/ή εξωηπατικά χοληφόρα. Έχουν περιγραφεί 4 τύποι βλαβών στα χοληφόρα. Ο πρώτος αφορά την προσβολή ένδο-και έξω-ηπατικών χοληφόρων συγχρόνως που αποτελεί τη συχνότερη απεικονιστική εμφάνιση της ΠΣΧ (85%). Ο δεύτερος την προσβολή μόνο των εξωηπατικών χοληφόρων (2%). Ο τρίτος την προσβολή μόνο των ενδοηπατικών χοληφόρων που παρατηρείται σχεδόν αποκλειστικά σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα (10-15%) και τέλος ο τέταρτος με την προσβολή μικρού μόνο τμήματος του χοληφόρου δένδρου (η πλέον ασυνήθης μορφή) που όταν αφορά το διχασμό του κοινού ηπατικού πόρου προκαλεί διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα από το πυλαίο χολαγγειοκαρκίνωμα γνωστό και σαν όγκοι Klatskin (Lee 1995A).

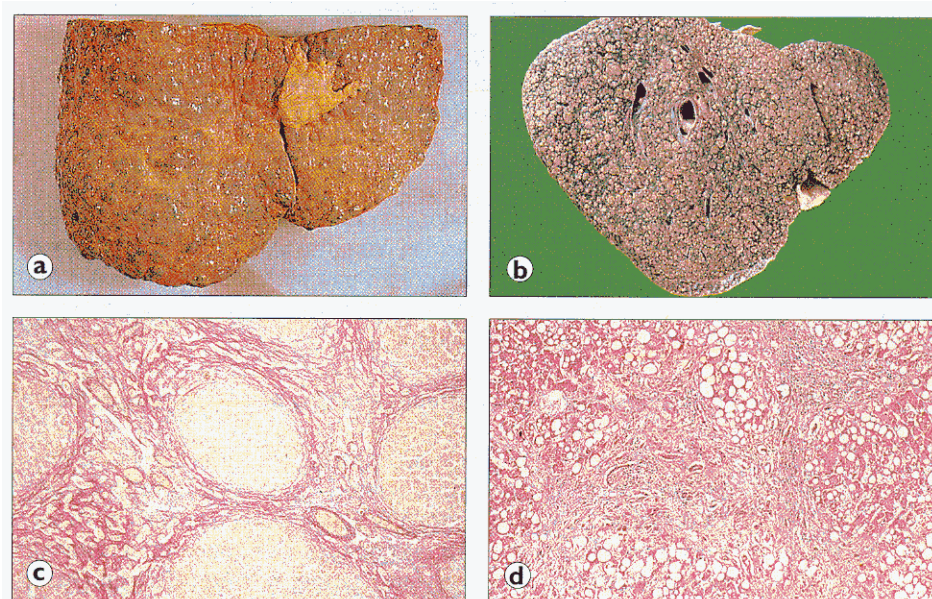
5.3.5.Θεραπεία και πρόγνωση

Η χορήγηση UDCA, μεθοτρεξάτης ή D-πενικιλλαμίνης παρά την κάποια βελτίωση των βιοχημικών και κλινικών παραμέτρων δεν επηρεάζει τη συνολική επιβίωση ή τη χολαγγειογραφική απεικόνιση των βλαβών. Σε ασθενείς χωρίς κίρρωση, η εκτέλεση διαστολών με μπαλόνι σε μεμονωμένες περιοχές στενώσεων μπορεί να βελτιώσει τα συμπτώματα. Η τοποθέτηση επίσης ενδοπροθέσεων σε μεγάλες στενώσεις μπορεί να αποτελέσει κάποια λύση όσον αφορά στην αποχέτευση της χολής, χωρίς όμως να επηρεάζεται η συνολική επιβίωση ή η ανάγκη για μεταμόσχευση. Για την αντιμετώπιση του κνησμού βοηθά συνήθως η χορήγηση χολεστυραμίνης (Paumgartner 2008). Σε τελικού σταδίου (μη αντιρροπούμενη κίρρωση), θεραπεία εκλογής είναι η μεταμόσχευση ήπατος. Η πρόγνωση είναι φτωχή καθώς οι περισσότεροι ασθενείς χρειάζονται μεταμόσχευση 10 χρόνια μετά από την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Δείκτες κακής πρόγνωσης της νόσου αποτελούν η μεγάλη ηλικία, οι υψηλές τιμές χολερυθρίνης, οι προχωρημένες ιστολογικές βλάβες και η ανάπτυξη πυλαίας υπέρτασης .



6. ΚΙΡΡΩΣΗ

Η κίρρωση του ήπατος αποτελεί πολύ σοβαρή νόσο που πήρε το όνομα της από τη λέξη “κηρός” που σημαίνει κερί. Πρόκειται για μια διάχυτη εξεργασία χαρακτηριζόμενη από εκτεταμένη ίνωση και ανάπτυξη αναγεννητικών όζων στο ήπαρ (Εικόνα 48). Αναπτύσσεται μετά από μακροχρόνια ηπατοκυτταρική βλάβη που κατά κανόνα συνοδεύεται από ηπατοκυτταρική νέκρωση. Η απάντηση του ηπατικού ιστού στη νέκρωση συνίσταται σε σύμπτωση των ηπατικών λοβίων, σχηματισμό ινώδων διαφραγμάτων και οζώδη αναγέννηση των ηπατοκυττάρων. Τελικό αποτέλεσμα είναι η καταστροφή της αρχιτεκτονικής του παρεγχύματος που είναι συνήθως μη αναστρέψιμη, προοδευτική και οδηγεί σε χρόνια ηπατοκυτταρική ανεπάρκεια με όλα τα επακόλουθα (πυλαία υπέρταση, ηπατοκυτταρικός καρκίνος) (Rodes 2007).



Εικόνα 48: Κίρρωση. Μακροσκοπικά α) η εξωτερική επιφάνεια του ήπατος έχει υβώδη διαμόρφωση. Κατά την επιφάνεια διατομής β) το παρέγχυμα έχει αντικατασταθεί από οζίδια αναγεννημένων ηπατοκυττάρων, διαχωριζόμενα από ινώδη ιστό. Ιστολογικά γ) οι ηπατοκυτταρικοί όζοι (κίτρινης χροιάς σε αυτό το παρασκεύασμα) διαχωρίζονται μεταξύ τους από δεσμίδες συνδετικού ιστού (ερυθράς χροιάς), στις οποίες περιλαμβάνονται χοληφόροι πόροι και πυλαία αγγεία. Μερικοί από τους όζους περιέχουν κεντρική φλέβα. Η διαταραχή της αγγειακής αρχιτεκτονικής οδηγεί σε πυλαία υπέρταση. Σε μερικές περιπτώσεις η αιτία της κίρρωσης μπορεί να προσδιοριστεί από την ηπατική βιοψία (δ).

Η συνύπαρξη της αύξησης του συνδετικού ιστού και της παρουσίας των αναγεννητικών όζων σε ολόκληρο το ηπατικό παρέγχυμα είναι απαραίτητη προϋπόθεση για να τεθεί η διάγνωση της κίρρωσης. Συνεπώς πρέπει να διακρίνεται από την κίρρωση, η εστιακή οζώδης υπερπλασία (ίνωση και αναγεννητικοί όζοι σε τμήματα ήπατος), η οζώδης αναγεννητική υπερπλασία (αναγεννητικοί όζοι σε ολόκληρο το ήπαρ χωρίς ίνωση) και η συγγενής ίνωση (ίνωση σε ολόκληρο το ήπαρ χωρίς όζους). Όπως φαίνεται από τον ορισμό, η κίρρωση αποτελεί παθολογοανατομική διάγνωση και δεν πρέπει να συγχέεται με την ηπατική ανεπάρκεια. Αποτελεί την κατάληξη πολλών ηπατοπαθειών διαφορετικής αιτιολογίας. Τα κλινικά σύνδρομα που συχνά παρατηρούνται σε ασθενείς με κίρρωση οφείλονται είτε σε ανεπαρκή λειτουργία του ηπατικού κυττάρου (ηπατική εγκεφαλοπάθεια), είτε σε αιμοδυναμικές διαταραχές (πυλαία υπέρταση), είτε σε συνδυασμό αυτών (ασκίτης).

6.1. Παθογένεια και μορφές της κίρρωσης

Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην κίρρωση έχουν ως αφετηρία τη νέκρωση των ηπατικών κυττάρων και σε δεύτερο χρόνο την ανάπτυξη του συνδετικού ιστού. Η ηπατοκυτταρική νέκρωση ακολουθείται από σύμπτωση των λοβίων και ανάπτυξη νέου συνδετικού ιστού στη θέση των νεκρωθέντων κυττάρων, με συνέπεια τη δημιουργία ινωδών διαφραγμάτων. Συγχρόνως παρατηρείται έντονη αναγεννητική δραστηριότητα των περιοχών του παρεγχύματος που επιβιώνουν, η οποία όμως δεν αναπαράγει τη φυσιολογική λοβιώδη αρχιτεκτονική. Τα ηπατοκύτταρα αναγεννώνται πλέον κατά μήκος των δοκίδων του λοβίου όχι σε μονούς αλλά σε διπλούς ή τριπλούς στοιχείους, ενώ καταργείται η διαδοχή πυλαίου διαστήματος και κεντρικής φλέβας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία όζων και την εγκατάσταση της τυπικής εικόνας της κίρρωσης. Διακρίνονται έξι τύποι ηπατοκυτταρικής νέκρωσης, κάθε ένας από τους οποίους μπορεί να συσχετίζεται με την αιτιολογία της ηπατικής βλάβης (Stevens 1994). Σε μερικές νόσους μεμονωμένα ηπατικά κύτταρα πεθαίνουν με τη διαδικασία της απόπτωσης. Τα νεκρά ηπατοκύτταρα φαίνονται ως ηωσινόφιλα συρικνωμένα σωματίδια, τα γνωστά σωματίδια Councilman.

- Εστιακή νέκρωση: Παρατηρείται σε περιπτώσεις τοξικής βλάβης και ιογενών λοιμώξεων όπου παρατηρούνται νεκρά ηπατοκύτταρα διάσπαρτα σε όλο το λοβίο, μεμονωμένα ή σε μικρές ομάδες 25 περίπου κυττάρων.
- Ζωνική νέκρωση: Η εντόπιση νεκρωμένων ηπατοκυττάρων σε συγκεκριμένες ζώνες. Παρατηρείται σε συγκεκριμένες νόσους.
- Διαβρωτική νέκρωση: Η νέκρωση των ηπατικών κυττάρων της περιφέρειας των πυλαίων διαστημάτων. Χαρακτηρίζει τη χρόνια ενεργό ηπατίτιδα.
- Εκτεταμένη νέκρωση: Σχηματίζονται νεκρωτικά διαφράγματα μεταξύ κεντρικών φλεβών ή μεταξύ πυλαίων διαστημάτων και κεντρικών φλεβών.
- Μαζική νέκρωση: Είναι η νέκρωση της πλειοψηφίας των ηπατοκυττάρων. Παρατηρείται σε κεραυνοβόλο ηπατική βλάβη ιογενούς ή τοξικής επίδρασης.

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

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

Η διαδικασία που οδηγεί σε κίρρωση είναι βραδεία. Σπανίως παρατηρείται ταχεία εξέλιξη προς κίρρωση, όπως σε υπερβολική κατανάλωση οινοπνεύματος ή μετά από κεραυνοβόλο ηπατίτιδα. Η συνήθης όμως έκβαση των ατόμων που επιζούν μετά από κεραυνοβόλο ηπατίτιδα

είναι ίαση. Το γεγονός αυτό όπως και η συνήθως παρατηρούμενη ίαση μετά από φαρμακευτική ή οξεία ιογενή ηπατίτιδα αποδεικνύουν ότι η ηπατοκυτταρική νέκρωση από μόνη της δεν αρκεί για να γίνει το ήπαρ κίρρωτικό (Rodes 2007).

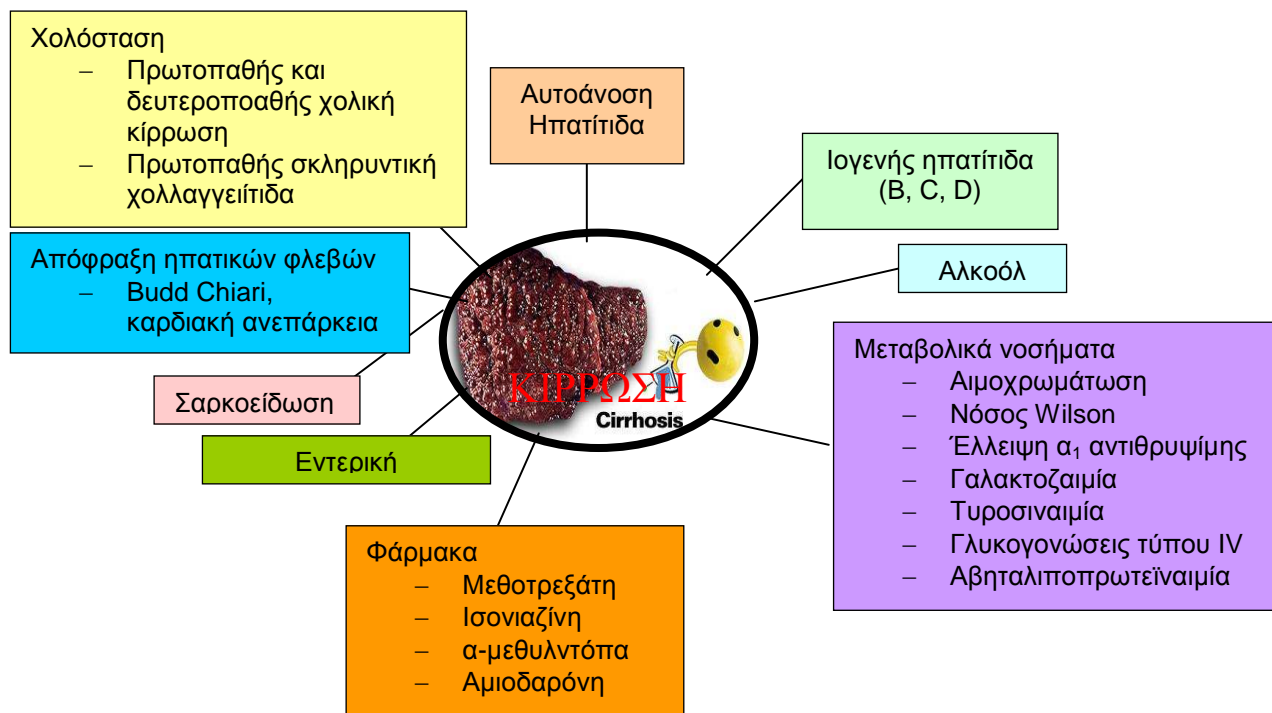
6.2. Ταξινόμηση της κίρρωσης

Η κίρρωση ταξινομείται μορφολογικά στη μικροζώδη, στη μεγαλοζώδη και στο μεικτό τύπο (Πίνακας 12). Η μικροζώδης κίρρωση χαρακτηρίζεται από μικρούς, παρόμοιου μεγέθους αναγεννητικούς όζους, από ινώδη διαφράγματα που διατάσσονται σε ολόκληρο το ηπατικό παρέγχυμα με αξιοσημείωτη ομοιογένεια και από το ότι συμμετέχουν όλα τα ηπατικά λόβια. Η μεγαλοζώδης κίρρωση χαρακτηρίζεται από διαφορετικού μεγέθους ινώδη διαφράγματα και όζους και από την παρουσία φυσιολογικών λοβίων εντός των μεγάλων όζων. Συχνά παρατηρούνται πολλαπλά πυλαία διαφράγματα σε παραπλήσιες θέσεις, αποτέλεσμα της σύμπτωσης του συνδετικού ιστού μετά από καταστροφή και απώλεια ηπατοκυττάρων και της ανάπτυξης νέου κολλαγόνου συνδετικού ιστού (Νταλέκος 2001).

Πίνακας 12: Ταξινόμηση της κίρρωσης.

ΜΙΚΡΟΟΖΩΔΗΣ	ΜΕΓΑΛΟΟΖΩΔΗΣ
Όζοι < 3 mm σε διάμετρο	Όζοι > 3 mm σε διάμετρο
Αλκοολική	Ιογενής ηπατίτιδα
Δευτερογενής χολική	Νόσος Wilson
Αιμοχρωμάτωση	
Σύνδρομο Budd-Chiari	

Η αιτιολογική ταξινόμηση της κίρρωσης (Εικόνα 49) υπερέχει, χωρίς όμως να είναι πάντοτε επιτυχής. Η παθολογοανατομική εικόνα δεν αποδεικνύει συνήθως το αίτιο της κίρρωσης, η οποία είναι πιθανό να οφείλεται σε περισσότερα από ένα αίτια. Σε μικρό ποσοστό κίρρωτικών το αίτιο δεν ανευρίσκεται, παρά τη λεπτομερή διερεύνηση (κρυψιγενής κίρρωση).



Εικόνα 49: Αιτιολογική ταξινόμηση της κίρρωσης.

6.3.Κλινική εικόνα κίρρωσης

Η κίρρωση χαρακτηρίζεται από ένα παρατεταμένο προκλινικό στάδιο που ακολουθείται από ένα βραχύτερο κλινικό στάδιο, οπότε και αναπτύσσονται οι διάφορες κλινικές επιπλοκές. Η κίρρωση του προκλινικού σταδίου ορίζεται ως αντιρροπούμενη και του κλινικού ως μη αντιρροπούμενη κίρρωση. Η αντιρροπούμενη κίρρωση συχνά ανακαλύπτεται τυχαία ή κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας παρακολούθησης ασθενών εξαιτίας γνωστής χρόνιας ηπατοπάθειας. Τα συμπτώματα, εάν υπάρχουν, είναι γενικά και άτυπα όπως, γενικευμένη αδυναμία, εύκολη κόπωση και απώλεια βάρους. Φυσικά σημεία χρόνιας ηπατοκυτταρικής βλάβης μπορεί να μην υπάρχουν ή να μην αξιολογηθούν επαρκώς.

Χαρακτηριστικά φυσικά σημεία που συνήθως βρίσκονται κατά τη φάση της αντιρρόπησης αποτελούν οι αραχνοειδείς τηλεαγγειεκτασίες (ιδιαίτερα στο πρόσθιο άνω θωρακικό τοίχωμα και στα σημεία που εκτίθενται στον ήλιο), το ερύθημα των παλάμων στην περιοχή θέναρως και υποθέναρως (όχι σπάνια παρατηρείται και στα πέλματα), η λευκονυχία, η απόπτωση των τριχών στις μασχάλες, το θώρακα και το εφηβαίο, η επώδυνη διόγκωση των μαστών στους άνδρες (γυναικομαστία), η αμηνόρροια, η ανικανότητα, ο υπογοναδισμός, η μείωση της γενετήσιας έλξης,

η διόγκωση των παρωτίδων (στο 50% των περιπτώσεων αλκοολικής αιτιολογίας κίρρωση), η παρουσία εξόφθαλμου, η πάχυνση της παλαμιαίας περιτονίας (σύνδρομο Dupuyten), η υπερτροφική οστεοαρθροπάθεια (περιοστίτιδα, πληκτροδακτυλία και φλεγμονή του αρθρικού θυλάκου όπως ακριβώς συμβαίνει και στο βρογχογενές καρκίνωμα του πνεύμονα), ηπατική οστεοδυστροφία με συνοδό δευτεροπαθή υπερπαραθυροειδισμό καθώς και σημεία που υποδηλώνουν ανεπάρκεια βιταμινών (γλωσσίτιδα και συγγειλίτιδα).

Μέτριου βαθμού πυρετική κίνηση (μέχρι 38°C) παρατηρείται επίσης σαν πρώτη εκδήλωση της νόσου στο 35% των ασθενών. Σημαντικό ποσοστό των ασθενών παρουσιάζει διαταραχές μεταβολισμού των υδατανθράκων (μέχρι την εμφάνιση κλινικά έκδηλου σακχαρώδη διαβήτη), καθώς και διάφορες γαστρεντερικές διαταραχές όπως χολολιθίαση (30%), πεπτικό έλκος (10-20%), γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, γαστρίτιδα και διάρροια. Το ήπαρ είναι διογκωμένο, μαλακό ή υπόσκληρο με οξύ ή οζώδες χείλος στο 70% των ασθενών με αντιρροπούμενη κίρρωση. Στη φάση της ρήξης της αντιρρόπησης (μη αντιρροπούμενη κίρρωση) τα συμπτώματα των ασθενών είναι περισσότερα έντονα (οι ασθενείς παραπονιούνται για μεγάλο βαθμού ανορεξία, ναυτία, εμετούς και κοιλιακό άλγος οφειλόμενο στη διάταση της κάψας του Gilson ή στην παρουσία ασκίτη) (Dancygier 2009).

Επιπλέον, εκτός των φυσικών σημείων της αντιρροπούμενης κίρρωσης αναγνωρίζονται μείζονα κλινικά ευρήματα που διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει εκείνα τα ευρήματα που οφείλονται στην προχωρημένη ανεπάρκεια των ηπατοκυττάρων και την ανάπτυξη πυλαίας υπέρτασης, όπως ο ίκτερος, η σπληνομεγαλία, ο ασκίτης και οι επιπλοκές του, η δημιουργία κιστών, η ανάπτυξη ηπατοπνευμονικού ή ηπατονεφρικού συνδρόμου και/ή εμφάνιση ηπατικής εγκεφαλοπάθειας, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Το ήπαρ κατά την ψηλάφηση έχει σκληρή σύσταση, αν και συνήθως στο στάδιο αυτό δεν ψηλαφάται είτε λόγω ανάπτυξης μεγάλης ποσότητας ασκίτικου υγρού είτε λόγω εκτεταμένης συρρίκνωσης του (μικρό ρικνό ήπαρ της κίρρωσης). Η αντικειμενική αξιολόγηση της βαρύτητας της κίρρωσης γίνεται με τη σταδιοποίηση κατά Child-Pugh (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Σταδιοποίηση κίρρωσης κατά Child-Pugh.

	ΣΤΑΔΙΟ Α	ΣΤΑΔΙΟ Β	ΣΤΑΔΙΟ C
	Ελάχιστη-ήπια νόσος	Μέτρια νόσος	Προχωρημένη νόσος
Χολερυθρίνη ορού	< 2 mgr/dl	2-3 mgr/dl	>3 mgr/dl
Λευκωματίνη ορού	<2.8 g/dl	2.8-3.5 g/dl	<2.8 g/dl
Χρόνος προθρομβίνης	<4	4-6	>6
Ασκίτης	Δεν υπάρχει	Εύκολα ελεγχόμενος	Δύσκολα ελεγχόμενος
Ηπατική εγκεφαλοπάθεια	Απούσα	Στάδιο 1 ή 2	Στάδιο 3 ή 4

6.4. Εργαστηριακά ευρήματα κίρρωσης

Στην αντιρροπούμενη κίρρωση καθώς και όταν η νόσος είναι σε ύφεση, τα παθολογικά εργαστηριακά ευρήματα απουσιάζουν ή είναι ελάχιστα. Καθώς η νόσος προοδεύει, οι εργαστηριακές εξετάσεις γίνονται ολοένα και περισσότερο παθολογικές. Αναιμία αποτελεί συχνό εύρημα. Η αιτιολογία της είναι πολυπαραγοντική. Μικροκυτταρική υπόχρωμη αναιμία, αποτέλεσμα χρόνιας ή οξείας απώλειας αίματος από το γαστρεντερικό σωλήνα είναι η πιο συχνή αιτία. Μακροκυτταρική αναιμία που συνήθως συνοδεύεται από λευκοπενία και θρομβοπενία παρατηρείται πιο συχνά στην αλκοολικής αιτιολογίας κίρρωση (είτε από άμεση κατασταλτική τοξική δράση της αιθανόλης στην ερυθροποίηση είτε από ανεπάρκεια φυλλικού οξέος ή B12). Συχνά επίσης παρατηρείται αιμολυτική αναιμία με όλα τα συνοδά εργαστηριακά ευρήματα αυτής. Διαταραχές πήξης είναι συχνές λόγω μειωμένης παραγωγής των παραγόντων πήξης από το ήπαρ (παράταση χρόνου προθρομβίνης), αλλά και λόγω ποιοτικής δυσλειτουργίας των αιμοπεταλίων, όπως η ανεπαρκής τους συσσώρευση ακόμα και σε παρουσία φυσιολογικού αριθμού αιμοπεταλίων. Διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη παρατηρείται σχετικά σπάνια και μόνο σε μη αντιρροπούμενη κίρρωση (Stevens 1994).

Οι βιοχημικές δοκιμασίες αντανακλούν την ηπατοκυτταρική καταστροφή και την επακόλουθη ηπατοκυτταρική δυσλειτουργία. Υπάρχει μέτρια αύξηση των αμινοτρανσφερασών, της ALP, της γ-GT και προοδευτική αύξηση της χολερυθρίνης. Υπάρχει επίσης υπολευκωματιναιμία και διάχυτη

υπεργαμμασφαιριναιμία. Υποχοληστερολαιμία (εκτός των κίρρώσεων με χολοστατικού τύπου βλάβες π.χ ΠΧΚ ή ΠΣΧ), υποκαλαιμία ποικίλης αιτιολογίας και υπονατριαίμία είναι συχνά ευρήματα. Η α-FT είναι μέτρια αυξημένη (όχι όμως τόσο όσο στις περιπτώσεις ηπατοκυτταρικού καρκίνου). Η βιοψία ήπατος (αποτελεί την επεμβατική εξέταση εκλογής για τη διάγνωση της κίρρωσης όταν δεν υπάρχουν αντενδείξεις) μπορεί να δείξει ανενεργό κίρρωση (ίνωση και αναγεννητικά οζία) χωρίς να διευκρινίζει συνήθως την υποκείμενη αιτία. Εναλλακτικά μπορεί να δείχνει σημεία συμβατά με αλκοολική νόσο, χρόνια ηπατίτιδα ή άλλα ειδικά αίτια κίρρωσης που αναπτύχθηκαν προηγούμενα. Οι απεικονιστικές μέθοδοι ελέγχου περιλαμβάνουν την απλή ακτινογραφία κοιλιάς (μπορεί να φαίνεται διόγκωση του ήπατος και του σπλήνα), τον ακτινογραφικό έλεγχο του ανώτερου γαστρεντερικού σωλήνα με βάριο, (μπορεί να φαίνονται κισοί του οισοφάγου και του θόλου του στομάχου) και βεβαίως τον ενδοσκοπικό έλεγχο του ανώτερου γαστρεντερικού σωλήνα, την αξονική και τη μαγνητική τομογραφία του ήπατος (Dancygier 2009).

6.5. Θεραπεία

Αποσκοπεί στην απομάκρυνση του αιτιολογικού παράγοντα και στην αντιμετώπιση των επιπλοκών από την ανάπτυξη πυλαίας υπέρτασης. Η διαίτα πρέπει να είναι πλούσια σε θερμίδες με ημερήσια πρόσληψη 75-100 γρ πρωτεϊνών και μόνο αν έχει προηγηθεί επεισόδιο ηπατικής εγκεφαλοπάθειας θα πρέπει να περιορίζεται σε 40-60 γρ/ημέρα. Προσθήκη βιταμινών είναι επιθυμητή. Περιορισμός στην πρόσληψη νατρίου πρέπει να συνιστάται, μόνο όταν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις κατακράτησης υγρών (ασκίτης, περιφερικό οίδημα κ.λ.π.).

6.6. Επιπλοκές

Σχεδόν όλες οι επιπλοκές της κίρρωσης (εκτός της ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου) είναι αποτέλεσμα της πυλαίας υπέρτασης. Περιλαμβάνουν την ανάπτυξη ασκίτη, την αυτόματη βακτηριδιακή περιτονίτιδα, τη συμφορητική σπληνομεγαλία, την αιμορραγία κισμών του οισοφάγου και/ή του θόλου του στομάχου, το ηπατονεφρικό και το ηπατοπνευμονικό σύνδρομο και την πυλαιοσυστηματική ηπατική εγκεφαλοπάθεια (Dancygier 2009).

6.6.1. Πυλαία υπέρταση

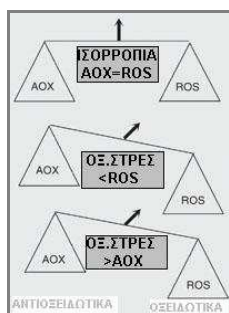
Ορίζεται η αύξηση της κλίσης πίεσης στο πυλαίο διάστημα κατά 5-10 mmHg σε σχέση με τα γενικά παραδεκτά ανώτατα όρια πίεσης της πυλαίας (3-7 mmHg). Αυτό συμβαίνει είτε γιατί υπάρχει αύξηση της πυλαίας εισροής αίματος, χωρίς ανάλογη μείωση της πυλαίας αγγειακής αντίστασης είτε γιατί υπάρχει παθολογική αύξηση της πυλαίας αγγειακής αντίστασης. Στην προσπάθεια αποσυμπίεσης του συστήματος της πυλαίας αναπτύσσεται παράπλευρη κυκλοφορία μεταξύ κλάδων της πυλαίας και της συστηματικής κυκλοφορίας. Τα παράπλευρα αγγεία αποτελούν διάταση προϋπαρχόντων εμβρυικών αγγειακών κλάδων. Μεταξύ αυτών εκείνα με τη μεγαλύτερη κλινική σημασία βρίσκονται στον κατώτερο οισοφάγο που τελικά οδηγούν στη δημιουργία των οισοφαγικών κισμών. Παρά την προσπάθεια αποσυμπίεσης του πυλαίου συστήματος, η πυλαία πίεση παραμένει παθολογικά υψηλή λόγω αφενός της αδυναμίας επιστροφής της πυλαίας αγγειακής αντίστασης σε φυσιολογικά επίπεδα και αφετέρου λόγω της ανάπτυξης συστηματικής υπερδυναμικής κυκλοφορίας, η οποία διατηρεί υψηλή την πυλαία παροχή αίματος. Η παρουσία ασκίτη και σπληνομεγαλίας με συνοδό υπερσπληνισμό ενισχύουν τη διάγνωση της πυλαίας υπέρτασης, ιδιαίτερα όταν έχει αποκλειστεί κακοήθης νόσος, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και φλεγμονώδης νόσος του περιτοναίου. Τα αίτια της πυλαίας υπέρτασης φαίνονται στον Πίνακα 14 (Rodes 2007, Νταλέκος 2001):

Πίνακας 14: Αίτια πυλαίας υπέρτασης.

Προηπατικά αίτια	Ενδοηπατικά αίτια	Μεθηπατικά αίτια
Υπαρξη αρτηριοπυλαιοφλεβικών αναστομώσεων στο σπλαγχνικό δίκτυο (π.χ ανευρύσματα ηπατικής αρτηρίας, ρήξη σπληνός, τραυματισμός, κληρονομική αιμορραγική τηλεαγγειεκτασία)	Προκολποειδικά	Απόφραξη της κάτω κοίλης σε οποιοδήποτε επίπεδο (φλεβική θρόμβωση, πίεση ή διήθηση από όγκο, κύστεις, απόστημα ή ύπαρξη μεμβρανώδους δακτυλίου)
Θρόμβωση σπληνικής φλέβας (παγκρεατική νόσος, υπερπηκτικό σύνδρομο)	Κολποειδικά	Καρδιακή νόσος (συμπιεστική περικαρδίτιδα, ανεπάρκεια τριγλώχινος, σοβαρού βαθμού δεξιά καρδιακή ανεπάρκεια)
Θρόμβωση της πυλαίας φλέβας, διάφορα αίτια σπληνομεγαλίας	Μετακολποειδικά	Απόφραξη ηπατικών φλεβών (δακτύλιοι, διήθηση από νεοπλασία, σύνδρομο Budd-Chiari)

III ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Ο ορίζοντας των ελευθέρων ριζών άρχισε να χαράζει από το 1900 όταν ο Χημικός Gomberg στις ΗΠΑ ανακάλυψε τυχαίως την ρίζα Τριφαινυλομεθυλίου (Phe3C) χωρίς να γνωρίζει ότι ο «τρισθενής» του άνθρακας ήταν η πρώτη ελεύθερη ρίζα στην οργανική χημεία. Η αναγνώριση της παρουσίας ελευθέρων ριζών in vivo έγινε το 1950 όταν αναγνωρίστηκε διεθνώς ως αιτία τύφλωσης 1000 νεογνών το οξυγόνο. Πρώτη η Gershman σε διάλεξη της το 1953 διατύπωσε τη θεωρία ότι η τοξικότητα του οξυγόνου στα νεογνά οφείλεται στις ελεύθερες ρίζες. Αυτό ήταν το παράδοξο του οξυγόνου και εξηγείται με τις ελεύθερες ρίζες (Halliwell 1999, Niki 2000). Τον επόμενο χρόνο (1954) μαζί με τον Gilbert ανέφεραν για πρώτη φορά το σχηματισμό ελευθέρων ριζών στο φυσιολογικό οξειδωτικό μεταβολισμό. Αυτήν ήταν η πρώτη αναφορά σχηματισμού ελευθέρων ριζών in vivo (Gershman 1954). Θεωρείται ανακάλυψη αντίστοιχης εκείνης του Pasteur με τα μικρόβια τον 19^ο αιώνα. Αργότερα από άλλες μελέτες βρέθηκε ότι ο σχηματισμός «δραστικών» μορφών οξυγόνου (ΔΜΟ) και αζώτου (ΔΜΑ) ευθύνονται για την οξειδωτική βλάβη βιολογικών μακρομορίων (DNA, πρωτεϊνών και λιπιδίων). Οι διαδικασίες αυτές εμπλέκονται στην έναρξη και στην εξέλιξη αρκετών νόσων (Knight 1999). Συνεπώς, “οξειδωτικό στρες” είναι μια κατάσταση αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών στον οργανισμό. Οι οξειδωτικές ρίζες είναι φυσιολογικά συστατικά του μεταβολισμού και η αντιβιολογική οξειδωτική τους δράση εξαρτάται από παθολογικές επιδράσεις αλλά και από την αδυναμία του αντιοξειδωτικού δυναμικού του οργανισμού. Η δημιουργία του οξειδωτικού στρες εξαρτάται τόσο από την παραγωγή των ελευθέρων ριζών όσο και από τη δράση της αντιοξειδωτικής άμυνας (Εικόνα 50).



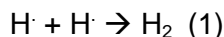
Εικόνα 50: Όταν η αντιοξειδωτική άμυνα αντιμετωπίζει τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται, τότε υπάρχει εξισορρόπηση μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της εκκαθάρισης τους. Όταν η ποσότητα των ελευθέρων ριζών είναι υψηλότερη από αυτήν που εκκαθαρίζεται από την αντιοξειδωτική άμυνα τότε δημιουργείται το “οξειδωτικό στρες”.
ΑΟΧ: Αντιοξειδωτική άμυνα. ROS: ReactiveOxygeneSpecies (Δραστικές Μορφές Οξυγόνου).

Θα περιγραφούν τα είδη των ελευθέρων ριζών και ο τρόπος δημιουργίας τους καθώς και τα είδη της αντιοξειδωτικής άμυνας και ο τρόπος δράσης της.

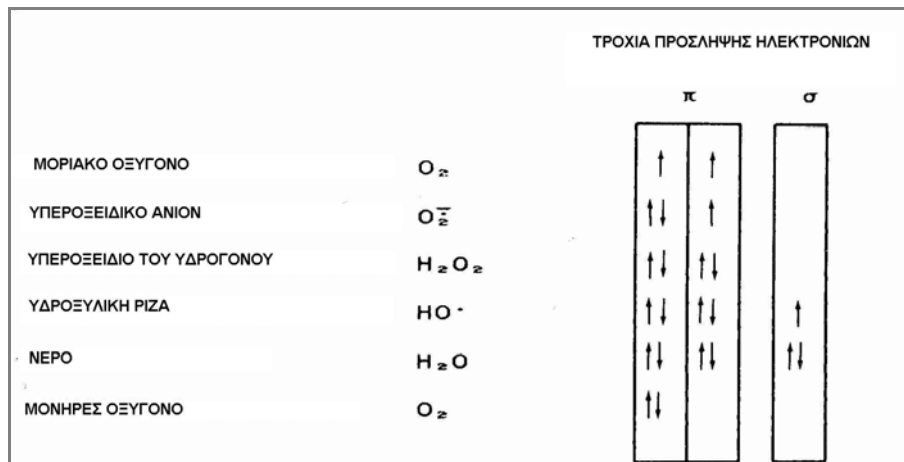
1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

1.1. Κατηγορίες

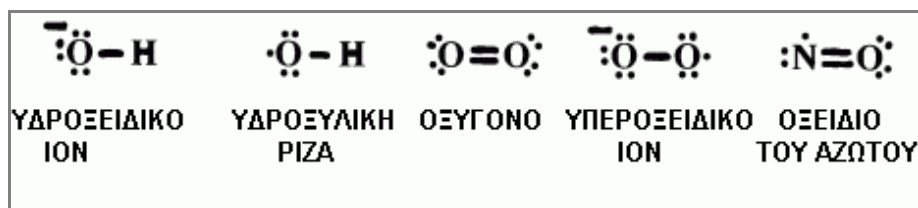
Ελεύθερες ρίζες καλούνται μόρια ή τμήματα μορίων ή στοιχεία που φέρουν ένα μονήρες ασύζευκτο ηλεκτρόνιο (Εικόνα 51 και 52) (Pryor 1986). Σε ορισμένες περιπτώσεις στην εξωτερική τους μοριακή επιφάνεια φέρουν ένα ή περισσότερα αδέσμευτα ηλεκτρόνια τα οποία όμως απέχουν σημαντικά μεταξύ τους ώστε να μην υπάρχει σύζευξη. Η ασταθειά τους τις οδηγεί να παίρνουν ηλεκτρόνια από τα διπλανά τους μόρια και να σταθεροποιούν τις ατομικές τους μορφές. Καλούνται ελεύθερες ρίζες γιατί είναι διαθέσιμες σε μια ελεύθερη χημικά μορφή. Μια τυπική αντίδραση 2 ριζών υδρογόνου είναι η αντίδραση 1. Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με χημικά μόρια αποσπώντας ένα τμήμα του, κυρίως άτομο υδρογόνου, ενώ ιδιαίτερη σημασία έχει η απόσπαση αυτή από οργανικές ενώσεις (RH) (αντίδραση 2).



Οι ελεύθερες ρίζες διακρίνονται σε οξυγονούχες και μη οξυγονούχες καθώς και σε οξυγονούχες δραστικές ενώσεις (Halliwell 1985, Halliwell 1984) (Πίνακας 15). Το είδος των οξυγονούχων ελευθέρων ριζών που απαντούν σε κυτταρικές διεργασίες φέρει το μονήρες ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο οξυγόνο. Οι μη οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες φέρουν το μονήρες ηλεκτρόνιο σε άτομα άνθρακα, αζώτου ή θείου. Οι οξυγονούχες δραστικές ενώσεις δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά πολύ εύκολα παράγουν ελεύθερες ρίζες (Simic 1998, Pryor 1996).



Εικόνα 51: Ηλεκτρονιακή κατάσταση δραστικών μορφών οξυγόνου.



Εικόνα 52: Ηλεκτρονιακή κατάσταση της εξωτερικής στοιβάδας των διαφόρων δραστικών μορφών αζώτου και οξυγόνου.

Πίνακας 15: Κατηγορίες ελευθέρων ριζών (Halliwell 1985).

ΟΞΥΓΟΝΟΥΧΕΣ	ΜΗ ΟΞΥΓΟΝΟΥΧΕΣ	ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ
Ρίζα υδροξυλίου ($OH\cdot$)	Θειλική ρίζα ($RS\cdot$)	Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\cdot-}$)	Μεθυλική ρίζα ($\cdot CH_3$)	Το μονήρες οξυγόνο (1O_2)
Αλκοξυλική ρίζα ($RO\cdot$)	Ρίζα οξειδίου του αζώτου ($NO\cdot$)	Το όζον (O_3)
Ρίζα υπεροξυλίου ($ROO\cdot$)	Ρίζα διοξειδίου του αζώτου ($NO_2\cdot$)	Το νιτρώδες οξύ (HNO_2)
		Το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$)
		Το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ($ONOO^-$)

Εκτός από τις ελεύθερες ρίζες σημαντικό ρόλο παίζουν και τα μεταλλικά ιόντα. Με την ικανότητα τους να αλλάζουν βαθμούς οξειδωσης κατά μια μονάδα και να δέχονται ή να δίνουν ένα μονήρες ηλεκτρόνιο παρουσιάζουν παραμαγνητικές ιδιότητες.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι αρκετά δραστικές γιατί τείνουν να αποσπούν ηλεκτρόνια από τα γειτονικά μόρια για τη δημιουργία ζεύγους. Έχουν μικρή διάρκεια ζωής. Ο χρόνος ημίσειας ζωής τους κυμαίνεται από 10^{-9} έως 10 δευτερόλεπτα (Πίνακας 16) (Halliwell 1985, Halliwell 1992).

Πίνακας 16: Χρόνος ημίσειας ζωής των ελευθέρων ριζών.

Είδος	Χρόνος ημίσειας ζωής σε δευτερόλεπτα
Υδροξυλική ρίζα (OH [·])	10 ⁻⁹
Αλκοξυλική ρίζα(RO [·])	10 ⁻⁶
Ανθρακυλική ρίζα (CO ₃ ^{·-})	10 ⁻⁶
Ρίζα διοξειδίου του αζώτου (NO ₂ [·])	10 ⁻⁶
Υπεροξυνιτρώδες (ONOO [·])	10 ⁻²
Ρίζα μονοξειδίου του αζώτου (NO [·])	1-10
Μονήρες οξυγόνο	10
Αλκοξυλική ρίζα	5-20
Τοκοφερυλική ρίζα	1-100

1.2. Δυναμική της δημιουργίας των ελευθέρων ριζών

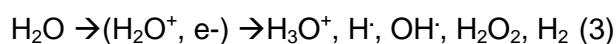
Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται με χημικές αντιδράσεις που παίρνουν μέρος οπουδήποτε: στην ατμόσφαιρα, στη γη και στους ζωντανούς οργανισμούς. Αυτές οι αντιδράσεις είναι οι παρακάτω (Olinescu 2002, Pryor 1986, Pryor 1973).

→ Ομολυτική διάσπαση με θέρμανση: Αυτή συμβαίνει με λιπαρά οξέα, ορισμένα από τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν ελεύθερες ρίζες σε μέτριες θερμοκρασίες, ενεργοποιώντας περαιτέρω αντιδράσεις ελευθέρων ριζών (π.χ. $AB \rightarrow A^{\cdot} + B^{\cdot}$). Η ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού συμβάλλει στη δημιουργία ελευθέρων ριζών γιατί κατά τη διάσπαση του δεσμού το καθένα από τα άτομα κρατά από ένα ηλεκτρόνιο αδέσμευτο (ρίζα). Στην ετερολυτική διάσπαση το ζεύγος ηλεκτρονίων του ομοιοπολικού δεσμού πάει στο ένα από τα 2 άτομα και το φορτίζει αρνητικά, ενώ το άλλο άτομο φορτίζεται θετικά (π.χ ο ιονισμός του νερού είναι η ετερολυτική διάσπαση και δίνει το ιόν του υδρογόνου και το ιόν του υδροξυλίου).

→ Διάσπαση: Τα υδρουπεροξειδία αποσυντίθενται γρήγορα στην παρουσία αλκοολών, οξέων και άλλων υπεροξειδίων. Η συνδυασμένη λύση των ενζυμικά δημιουργημένων υπεροξειδίων είναι μέρος των αντιδράσεων σύνθεσης των προσταγλανδινών.

→ Μεταφορά ηλεκτρονίων: Συμβαίνει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και είναι ο πιο κοινός μηχανισμός της δημιουργίας ελευθέρων ριζών, ειδικά του οξυγόνου. Αυτές οι αντιδράσεις παίρνουν μέρος μέσω μεταλλικών ιόντων που επάγονται από την αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

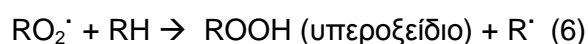
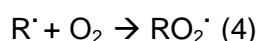
→ Φωτόλυση και ραδιόλυση: Σημαντικές ποσότητες ελευθέρων ριζών παράγονται κατά την έκθεση στην ιοντίζουσα ακτινοβολία και στο ορατό-υπεριώδες. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών κάτω από αυτές τις συνθήκες εξαρτάται από παράγοντες όπως το μήκος κύματος και η ώρα της έκθεσης. Ενώ το ορατό-υπεριώδες δρα μόνο στα συστατικά που απορροφούν το φως, η ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι ικανή να καταστρέψει οποιοδήποτε οργανικό μόριο στους ζωντανούς οργανισμούς. Η δράση του υπεριώδους ορατού περιορίζεται στην περίοδο της έκθεσης, η δράση όμως της ιοντίζουσας ακτινοβολίας συνεχίζεται και μετά την έκθεση και τελειώνει λόγω της ραδιόλυσης του νερού. Από τη στιγμή που το νερό αποτελεί το 70% των ζωντανών οργανισμών, η αντίδραση της ραδιόλυσης του νερού είναι πολύ επιβλαβής για τους ζωντανούς οργανισμούς γιατί μέσω αυτής παράγονται αρκετές ελεύθερες ρίζες στους ζωντανούς οργανισμούς σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση 3:



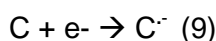
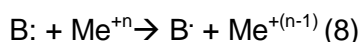
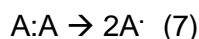
→ Ενζυμικές αντιδράσεις: Είναι μια συνεχόμενη πηγή ελευθέρων ριζών. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είτε αποσυντίθενται είτε συνδέονται με άλλα σταθερά συστατικά.

→ Μεταβολισμός οργανικών συστατικών: Συστατικά που διαπερνούν το κύτταρο, όπως ο τετραχλωράνθρακας ή το χλωροφόρμιο κατά το μεταβολισμό τους στα μιτοχόνδρια παράγουν ελεύθερες ρίζες. Η δημιουργία των ελευθέρων ριζών είναι μια πολύπλοκη συνεχόμενη διεργασία που αν δεν έχει αναστολές μπορεί να συνεχίσει ως μια αδιάρητη αλυσιδωτή αντίδραση. Αυτή η αντίδραση αποτελείται από ευδιάκριτες φάσεις που καθεμία κρατά μια μεταβλητή περίοδο χρόνου, εξαρτώμενη από τοπικές καταστάσεις. Έτσι ξεκινώντας με ένα οργανικό συστατικό μπορούμε να διαχωρίσουμε τις ακόλουθες φάσεις.

A. Φάση Έναρξης: Το συστατικό χάνει ένα ηλεκτρόνιο και δημιουργεί ελεύθερη ρίζα. Από τη στιγμή που η ελεύθερη ρίζα δημιουργείται μπορεί τυχαία να αντιδράσει με άλλες ελεύθερες ρίζες ή με το οξυγόνο (αντιδράσεις 4,5,6).



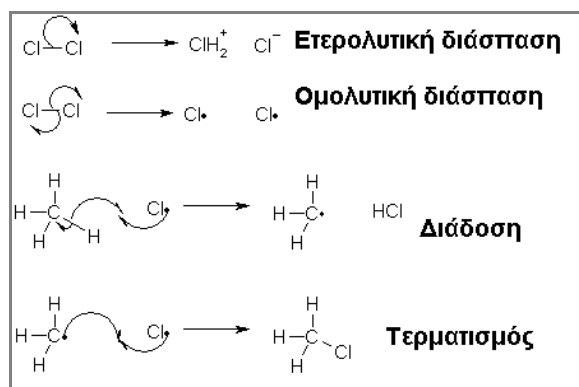
Τα είδη των αντιδράσεων που συμβάλλουν στην έναρξη είναι η ομολυτική διάσπαση (αντίδραση 7), η οξειδωση ενός ηλεκτρονίου (αντίδραση 8) και η αναγωγή ενός ηλεκτρονίου (αντίδραση 9).



Β. Φάση Διάδοσης: Η διάδοση των ελευθέρων ριζών είναι ο παράγοντας που είναι ο πιο σημαντικός στους ζωντανούς οργανισμούς. Μια νεοσχηματιζόμενη ρίζα μπορεί γρήγορα να διασπαστεί για να αντιδράσει με το οξυγόνο, έξω από το κύτταρο ή από το σώμα. Στους ζωντανούς οργανισμούς όμως η ελεύθερη ρίζα αν δημιουργηθεί μπορεί να αντιδράσει όχι μόνο με το οξυγόνο, αλλά και με τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια ή τους υδατάνθρακες. Τέτοιες αντιδράσεις παίρνουν μέρος κατά το μεταβολισμό των χλωριωμένων υδατανθράκων. Η ίδια αντίδραση παίρνει μέρος όταν το άτομο του θείου εκτεθεί στην ιοντίζουσα ακτινοβολία. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα ένζυμα που έχουν ελεύθερη σουλφυδριλική ομάδα αδρανοποιούνται λόγω της δημιουργίας της θειλικής ελεύθερης ρίζας που αδρανοποιεί το ένζυμο (αντίδραση 10). Οι ελεύθερες ρίζες έχουν μια μεγάλη συγγένεια έναντι των ακόρεστων δεσμών όπως υπάρχουν στα ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η προσθήκη των ελευθέρων ριζών σε ένα διπλό δεσμό παρέχει μια γρήγορη διάδοση νέων ελευθέρων ριζών. Αυτό έχει δειχθεί σε ζωντανούς οργανισμούς και έχει βρεθεί να εμπεριέχει τα λιπίδια ή τα νουκλεϊνικά οξέα (αντίδραση 11). Οι αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών με κάθε ακόρεστο διπλό δεσμό και με τις βάσεις των πουρινών ή των πυριμιδινών γίνεται με γρήγορους ρυθμούς που είναι κοντά στο βαθμό διάχυσης ($10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).



Γ.Φάση Τερματισμού: Η δημιουργία των ελευθέρων ριζών είναι ένα τυχαίο γεγονός. Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες αποσυντίθενται γρήγορα με το να αντιδρούν με τα γύρω συστατικά. Οι ζωντανοί οργανισμοί εξοπλίζονται με ποικίλους και αποτελεσματικούς μηχανισμούς που καλούνται αντιοξειδωτικά. Οι αντιδράσεις με τα αντιοξειδωτικά σταματούν τις αντιδράσεις πολλαπλασιασμού. Στην παρακάτω Εικόνα 53 φαίνονται συνοπτικά οι παραπάνω φάσεις (Del Masterov 1980).

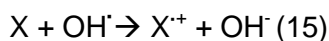
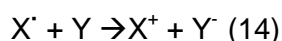
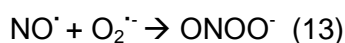
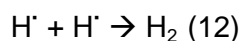


Εικόνα 53: Οι διάφορες φάσεις δημιουργίας των ελευθέρων ριζών.

1.3. Αντιδράσεις δημιουργίας ελευθέρων ριζών

Εάν αντιδράσουν 2 ελεύθερες ρίζες δημιουργούν έναν ομοιοπολικό δεσμό ή μια μη-ρίζα (αντιδράσεις 12, 13). Όμως τα περισσότερα μόρια είναι μη ρίζες και αν αντιδράσουν 2 μη-ρίζες, τότε δημιουργούνται νέες ρίζες και αρχίζουν οι αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών. Αναλυτικά οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγηθούν στα παρακάτω (Acworth 1997, Pryor 1986):

- ➔ Μια ρίζα μπορεί να προστεθεί σε ένα άλλο μόριο, οπότε το νέο σύμπλεγμα είναι πάλι ρίζα (αντίδραση 14).
- ➔ Μια ρίζα μπορεί να είναι ένας αναγωγικός παράγοντας που να μπορεί να δώσει ένα ηλεκτρόνιο σε μια μη-ρίζα. Ο δέκτης έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο.
- ➔ Μια ρίζα μπορεί να είναι ένας παράγοντας οξειδωσης που παίρνει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο από μια μη-ρίζα. Η μη-ρίζα πρέπει να έχει ένα αδέσμευτο ηλεκτρόνιο. Η μη ρίζα πρέπει να έχει ένα αδέσμευτο ηλεκτρόνιο αφημένο πίσω (αντίδραση 15).
- ➔ Μια ρίζα μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από το δεσμό άνθρακα-υδρογόνου. Μια ρίζα υδρογόνου έχει μόνο ένα ηλεκτρόνιο οπότε ένα αδέσμευτο ηλεκτρόνιο αφήνετε πίσω στον άνθρακα (αντίδραση 16).



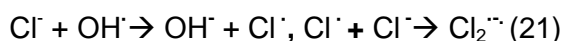
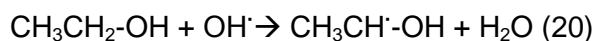
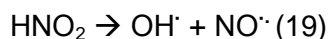
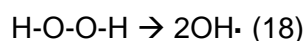
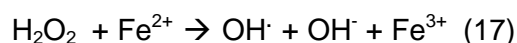
1.4. Τύποι οξυγονούχων ελευθέρων ριζών

1.4.1 Η υδροξυλική ρίζα $\text{H} : \text{O} \cdot$

Η ρίζα υδροξυλίου είναι πολύ δραστική και ο χρόνος ημιζωής της είναι 10^{-9} δευτερόλεπτα (37°C) ενώ των άλλων ελευθέρων ριζών ο χρόνος είναι μεγαλύτερος ($\text{RO}\cdot$: 10^{-6} δευτερόλεπτα, $\text{O}_2\cdot^-$: 10^{-6} δευτερόλεπτα, $\text{ROO}\cdot$: 7 δευτερόλεπτα). Η ρίζα υδροξυλίου λόγω της δραστικότητας της δεν έχει σε βιολογικά συστήματα συγκέντρωση σταθερής κατάστασης, αλλά μόλις σχηματιστεί αντιδρά διασχίζοντας λίγα Angstrom ($A=10^{-10}\text{m}$) με οποιοδήποτε βιομόριο (λιπίδια, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, DNA) (Gutteridge 1996). Αιτίες δημιουργίας της υδροξυλικής ρίζας είναι οι παρακάτω (Purpo 1988):

- Η αντίδραση των μεταλλικών ιόντων με το H_2O_2 (αντίδραση 17) (Halliwell 1978).
- Η ομολυτική διάσπαση του δεσμού O-O του H_2O_2 από την ακτινοβολία UV και την ιοντίζουσα ακτινοβολία. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και στο δέρμα που εκτίθεται στο ηλιακό φως (Takeshita 2006) (αντίδραση 18).
- Το όζον και το υπεροξινιτρώδες (Borek 1998).
- Οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις των φαγοκυττάρων (Halliwell 1982, McCord 1978).
- Μεταβολισμός αραχιδονικού οξέος (Singh 1981).
- Η υδροξυλίωση αρωματικών συστατικών (Richmond 1981).
- Η φωτόλυση του νιτρώδους οξέος της ατμόσφαιρας (αντίδραση 19).

Η υδροξυλική ρίζα μπορεί να ιονιστεί σε οξυγόνο και υδρογόνο σε πολύ υψηλά αλκαλικά pH. Οι αντιδράσεις που κάνει η υδροξυλική ρίζα είναι: 1) Αντιδράσεις αφαίρεσης υδρογόνου (αντίδραση 20). 2) Αντιδράσεις προσθήκης: είναι συνήθως οι αντιδράσεις με τα αρωματικά συστατικά και με διπλούς δεσμούς και 3) Αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων (αντίδραση 21). Η ρίζα υδροξυλίου δεν έχει κάποιο ενζυμικό εκκαθαριστή και αντιμετωπίζεται μόνο από τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά (Bergtold 1991). Τα στοιχεία δείχνουν ότι η υδροξυλική ρίζα από τη στιγμή που δημιουργείται εξαφανίζεται ακολουθώντας την αντίδραση με την αλβουμίνη του πλάσματος και με τη γλυκόζη. Η αλβουμίνη του πλάσματος είναι παρούσα σε υψηλές συγκεντρώσεις και η γλυκόζη έχει φυσιολογικά επίπεδα γύρω στα 4,5 mM.



4.2. Το υπεροξειδικό ανιόν $\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$

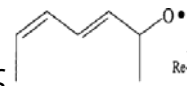
Είναι λιγότερο δραστικό από την υδροξυλική ρίζα και δεν αντιδρά με τα περισσότερα βιολογικά μόρια στα υδατικά διαλύματα. Αντιδρά γρήγορα με κάποιες άλλες ρίζες όπως είναι το $\text{NO}\cdot$, δεσμίδες σιδήρου-θείου και ορισμένες φαινοξυλικές ρίζες (π.χ αυτές που δημιουργούνται όταν αφαιρείται το υδρογόνο από την υδροξυλική ομάδα της τυροσίνης). Δεν μπορεί να διαπεράσει μεμβράνες, αλλά μπορεί να διαπεράσει τις ιονοανταλλακτικές πρωτεΐνες που υπάρχουν στα ερυθροκύτταρα και στον πνεύμονα (Halliwell 1981, Von Sonntag 1987).

Η δραστικότητα του υπεροξειδικού ανιόντος με τις μη-ρίζες εξαρτάται από το pH και από την υδροφοβικότητα ή υδροφιλικότητα του μέσου που βρίσκεται. Στα υδατικά διαλύματα, σε ουδέτερο pH είναι πολύ ασθενώς δραστικό. Στα οργανικά διαλύματα η υπεροξειδική ρίζα δρα ως οξειδωτικός παράγοντας έναντι συστατικών που μπορούν να προσφέρουν υδρογονοιόντα, όπως το ασκορβικό οξύ, η κατεχόλη και η α-τοκοφερόλη. Σε υδατικά διαλύματα δεν αντιδρά με την α-τοκοφερόλη γιατί η τελευταία είναι ελάχιστα διαλυτή στο νερό (Zabłocka 2008). Η ρίζα του υπεροξειδικού ανιόντος παράγεται από:

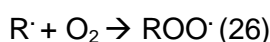
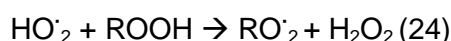
- Ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, ηωσινόφιλα και από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Babior 2000, Halliwell 1982, McCord 1978).
- Ένζυμα που ανάγουν το οξυγόνο: Παραδείγματα ενζύμων είναι οι υπεροξειδάσες (φυτά, βακτήρια), η 2,3 διοξυγενάση της ινδολεάμης, η διοξυγενάση της τρυπτοφάνης (ήπαρ), η αλδεϋδική οξειδάση (ήπαρ), η οξειδάση της γαλακτόζης (μύκητες), η οξειδάση της ξανθίνης, η γαλακτοσιδική οξειδάση, η οξειδάση της μονοαμίνης, η οξυγενάση της τρυπτοφάνης, η κυκλοοξυγενάση και η λιποοξυγενάση (Halliwell 1978, Halliwell 1977).

- Βιοχημικές αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Σε φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου υπολογίζεται ότι το 1-3% του οξυγόνου μετατρέπεται σε ρίζα του υπεροξειδικού ιόντος. Επίσης βλάβες στα μιτοχόνδρια ευνοούν τη διαρροή ηλεκτρονίων και την αυξημένη παραγωγή της ρίζας του υπεροξειδικού ανιόντος (Serpillon 2009).
- Βιομόρια που οξειδώνουν το οξυγόνο σε υπεροξειδικό ανιόν, όπως η γλυκεραλδεϋδη και η ορμόνη αδρεναλίνη. Οι αντιδράσεις αυτές της αυτο-οξειδωσης επιταχύνονται με την παρουσία μεταλλικών ιόντων (σίδηρος, χαλκός) (Misra 1972).
- Την οξειδωση των οργανικών συστατικών (π.χ. παρακουάτ και αλλοξάνη).
- Την έκθεση σε ραδιενέργεια και στο ορατό-υπεριώδες (Ray 1996).

1.4.3. Οι Υπεροξυλικές και αλκοξυλικές ρίζες



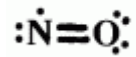
Οι ρίζες αυτές υπόκεινται σε ταχύτατη μοριακή μετάθεση προς άλλες οργανικές ρίζες. Έχουν την ικανότητα απόσπασης ριζών υδρογόνου από τα λιπίδια και έτσι οδηγούνται στη λιπιδική υπεροξειδωση (Von Sonntag 1987, Forni 1986). Η έναρξη γίνεται συνήθως με την απόσπαση ενός πρωτονίου (H) από τη μεθυλενική ομάδα (-CH₂-) από αλυσίδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Γενικά είναι καλοί οξειδωτικοί παράγοντες, οξειδώνουν το ασκορβικό οξύ και το νικοτιναμιδοαδενινοδινουκλεοτίδιο (NADH) και αφαιρούν ρίζες υδρογόνου από άλλα μόρια, μια αντίδραση σημαντική για τη λιπιδική υπεροξειδωση. Οι αρωματικές ρίζες είναι λιγότερο δραστικές από τις αλειφατικές υπεροξυλικές και αλκοξυλικές ρίζες. Οι αλκοξυλικές και υπεροξυλικές ρίζες παράγονται από 1) Την αποσύνθεση των οργανικών υπεροξειδίων όταν αυτά εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες, στο υπεριώδες ορατό, ή σε μεταλλικά ιόντα (αντιδράσεις 22, 23, 24). 2) Την προσβολή οργανικών ουσιών από την ρίζα υδροξυλίου (αντιδράσεις 25,26) (Fu 2006):





Οι θειόλες *in vivo* έχουν κυρίως αντιοξειδωτική δράση. Η ομάδα H-SH είναι ένα σηματοδοτικό μόριο και δρα ως αντιοξειδωτικό στον εγκέφαλο (Whiteman 2004). Εντούτοις, οι θειόλες μπορούν να δημιουργήσουν ελεύθερες ρίζες. Οι θειυλικές ρίζες δημιουργούνται από τις αντιδράσεις των θειολών με τις ρίζες του άνθρακα και τις ρίζες του οξυγόνου καθώς και με την επίδραση μετάλλων μετάπτωσης. Επίσης, παράγονται και κατά την ομολυτική διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών συμπεριλαμβανομένου τις γέφυρες δισουλφιδίου στις πρωτεΐνες.

Οι θειυλορίζες συμμετέχουν στις βλαβερές αντιδράσεις διαφόρων τοξινών (γλοιοτοξίνης, διφαινυλοδισουλφιδίου) σε ζώα. Οι θειυλικές ρίζες κυστεΐνης μπορούν να αποσπάσουν υδρογόνα από το λινολεϊκό οξύ, λινολενικό και αραχιδονικό οξύ ξεκινώντας τη λιπιδική υπεροξειδωση. Οι θειόλες είναι ασταθείς στα κοινά μέσα καλλιέργειας και οξειδώνονται παράγοντας ελεύθερες ρίζες και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Ο χαλκός και ο σίδηρος επιταχύνουν την οξείδωση της κυστεΐνης με το χαλκό να την επιταχύνει πιο γρήγορα. Αν προστεθούν όμως ίχνη σιδήρου τότε μειώνεται ο ρυθμός οξείδωσης (Grant 2001).



Το οξειδίο του αζώτου (ή το μονοξειδίο του αζώτου: NO) είναι ένα άχρωμο αέριο, μέτρια διαλυτό στο νερό και περισσότερο διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες. Παράγεται στους ζωντανούς οργανισμούς από μια ομάδα ενζύμων που καλούνται συνθάσες του νιτρικού οξέος και μετατρέπουν την L-αργινίνη σε μονοξειδίο του αζώτου (Beckman 1991).

Η δραστηριότητα της συνθάσης του NO ρυθμίζεται προσεκτικά στα φυσιολογικά κύτταρα. Υπάρχουν 3 συνθάσες η ενδοθηλιακή, η επαγώμενη και η νευρωνική. Το NO ενώνεται με τη γουανυλική κυκλάση, παράγοντας την κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη. Η τελευταία μειώνει το ενδοκυτταρικό ελεύθερο ασβέστιο, χαλαρώνει τους μύες, διαστέλλει τα αγγεία και μειώνει την πίεση του αίματος. Το NO λειτουργεί και ως νευροδιαβιβαστής και παίζει σημαντικό ρόλο στη μνήμη. Μπορεί να απελευθερωθεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα και σε ενεργοποιημένα μακροφάγα. Μπορεί να διαπεράσει τις μεμβράνες και να διαχυθεί μεταξύ των κυττάρων. Έχει ένα αδέσμευτο

ηλεκτρόνιο στην π*2p αντιδεσμική τροχιά (Baccari 2008). Το NO παρουσιάζει ορισμένες ενδιαφέρουσες αντιδράσεις:

- Απομάκρυνση του αδέσμευτου ηλεκτρονίου παράγει το νιτροσινικό κατιόν (nitrosonium) NO⁺.
- Μείωση σε ένα ηλεκτρόνιο δίνει το νιτροζυλικό ανιόν NO⁻.
- Το NO βρίσκεται χαμηλά στη διαδικασία δραστηριότητας και αντιδρά αργά με τα περισσότερα βιολογικά μόρια, συμπεριλαμβανομένου και των θειολών. Εμπλέκεται σε αντιδράσεις νιτροσυλίωσης και νίτρωσης. Νιτροσυλίωση είναι η προσκόλληση της νιτροσοομάδας (NO) στη θειόλη (S-νιτροσυλίωση) ή σε ένα μέταλλο και συνήθως είναι αντιστρεπτή. Νίτρωση είναι η προσκόλληση της νιτροομάδας (-NO₂) σε βιομόρια και δεν είναι εύκολα αντιστρέψιμη.

Αρκετές επιδράσεις της ρίζας του NO σχετίζονται με το ρυθμό της δημιουργίας του. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η μόνιμη δημιουργία χαμηλών επιπέδων του NO από το αγγειακό ενδοθήλιο αναπαριστούν μια συνεχόμενη πηγή αντιοξειδωτικών που καταστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση (Denicola 1999). Η ρίζα του NO όταν οξειδώνεται μπορεί να παράγει το νιτρώδες ιόν που απαντάται στις τροφές σε συγκέντρωση 30 μM. Επίσης, το νιτρικό ιόν που βρίσκεται στα φυτά και στο έντερο μετατρέπεται σε νιτρώδες ιόν. Το νιτρώδες ιόν χρησιμοποιείται ως συντηρητικό κρεάτων (είναι μικροβιοκτόνο και αναστέλλει την οξείδωση της αίμης σε μεθομυογλοβίνη που αλλάζει το χρώμα του κρέατος σε σκούρο κόκκινο) και έχει θετικές και αρνητικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου.

Οι ωφέλιμες δράσεις του είναι (Gao 2010): 1) Δεσμεύει το υποχλωριώδες οξύ και έτσι προστατεύει τις θέσεις φλεγμονής από την επίδραση του (Wink 1993). 2) Αντιδρά πολύ εύκολα με την υδροξυλική και τις αλκοξυλικές ρίζες και τις αδρανοποιεί. 3) Διακόπτει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης. 4) Μειώνει τις προοξειδωτικές ιδιότητες των αιμοπρωτεϊνών στην παρουσία των υπεροξειδίων, δεσμεύοντας τις ρίζες των αμινοξέων. 5) Δεσμεύεται με το δισθενή σίδηρο. Από τη μια αυτό είναι μια ωφέλιμη δράση του. Όταν όμως δεσμεύεται και με ένζυμα που φέρουν μέταλλα μετάπτωσης στα ενεργά τους κέντρα τα απενεργοποιεί (π.χ κυττοχρωμική-c-οξειδάση, καταλάση και το κυτόχρωμα P450) (Cooper 1999).

Οι υπόλοιπες αρνητικές επιδράσεις του είναι: 1) Αντιδρά στο στομάχι με άλλες αμίνες των τροφών και παράγει τις νιτροσαμίνες, που είναι εν δυνάμει καρκινογόνες. 2) Αντιδρά με το

μοριακό οξυγόνο για να παράγει το υπεροξυνιτρώδες. 3) Ενεργοποιεί το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και την έκλυση του κυτοχρώματος c προκαλώντας απόπτωση (Li 2005) και 4) Απαμινώνει το DNA (Larosche 2010).

1.4.6. Το Υπεροξειδίο του Υδρογόνου $H : O-O : H$

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) είναι μέτρια δραστικό και έχει ένα σχετικά μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής. Αναμειγνύεται εύκολα με το νερό και μπορεί να διαχέεται μέσα και ανάμεσα στα κύτταρα (Vranova 2002). Μπορεί να διαχέεται σε απόσταση από τη θέση παραγωγής του και κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης. Αντιδρά με ανηγμένα μεταλλικά ιόντα όπως ο σίδηρος ή ο χαλκός για να παράγει την υψηλής δραστηριότητας υδροξυλική ρίζα (αντίδραση Fenton) (Winston 1983). Μπορεί να διασπάσει ορισμένες πρωτεΐνες της αίμης και διασπάται εύκολα με το υπεριώδες φως προς τις δραστικές ρίζες υδροξυλίου (ομολυτική διάσπαση) (Halliwell 2000).

Το H_2O_2 είναι τοξικό σε αρκετά κύτταρα σε επίπεδα 10 έως 100 μM προκαλώντας γήρανση ή απόπτωση (Watt 2004), αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα μπορεί να προάγει τον πολλαπλασιασμό αρκετών κυτταρικών τύπων και σε υψηλότερα επίπεδα καταστέλλει την απόπτωση και προάγει το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο (Groeger 2009). Μπορεί επίσης να δράσει ως σηματοδοτικό μόριο (Forman 2010).

Αρκετά ένζυμα παράγουν H_2O_2 , συμπεριλαμβανομένου της της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της οξειδάσης της ξανθίνης, του ουρικού, του κοπροπορφυνογόνου και της γλυκόζης (Halliwell 1982). Επιπλέον σε οποιοδήποτε βιολογικό σύστημα παράγεται υπεροξειδικό ανιόν θα δημιουργηθεί και H_2O_2 με τη συνένωση δύο μορίων υπεροξειδικού ανιόντος και δυο κατιόντων υδρογόνου (αντίδραση 27).



Τα μιτοχόνδρια που συνεισφέρουν σημαντικά στην κυτταρική παραγωγή του H_2O_2 (Boveris 1977) έχουν αρκετούς μηχανισμούς προστασίας από το H_2O_2 . Αυτοί είναι η γλουταθειόνη, η γλουταρεδοξίνη, ηθειορεδοξίνη, η αναγωγάση τηςθειορεδοξίνης και η υπεροξυρεδοξίνη. Στα ερυθροκύτταρα, ο κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης του είναι η καταλάση (Yasmineh 1993).

1.4.7. Το όζον

Το όζον είναι ο αέριος ρύπος στην ατμόσφαιρα. Είναι ισχυρά οξειδωτικό αέριο που παράγεται δευτερογενώς από τη φωτοχημική ρύπανση. Σε υδατικά διαλύματα διασπάται σε ρίζες υδροξυλίου. Διασπά το DNA και οξειδώνει τις βάσεις (ειδικά τη γουανίνη και τη θυμίνη) ευθέως, αλλά και μέσω δημιουργίας της υδροξυλικής ρίζας σε υδατικά διαλύματα (Borek 1998).

1.4.8. Το Μονήρες Οξυγόνο

Το οξυγόνο είναι διατομικό μόριο το οποίο θα μπορούσε να καταταχθεί στην κατηγορία των ελευθέρων ριζών γιατί έχει 2 ασύζευκτα ηλεκτρόνια σε δυο διαφορετικά αντιδεσμικά π τροχιακά. Τα δυο αυτά ηλεκτρόνια έχουν τον ίδιο κβαντικό αριθμό της ιδιοστροφορμής (spin). Αυτήν είναι η πιο σταθερή κατάσταση του οξυγόνου. Υπάρχουν όμως και δυο δραστικές μορφές οξυγόνου που είναι γνωστές ως μονήρη οξυγόνα και παράγονται με την εισαγωγή ενέργειας (Foote 1995). Το μονήρες οξυγόνο δεν έχει αδέσμευτα ηλεκτρόνια και έτσι δεν είναι ελεύθερη ρίζα, αλλά είναι ένας ισχυρά οξειδωτικός παράγοντας, ικανός να οξειδώνει γρήγορα αρκετά μόρια (π.χ. πολυακόρεστα λιπαρά οξέα).

1.4.9. Το υποχλωριώδες οξύ

Το υποχλωριώδες είναι ασθενές οξύ (pKa=7.5) και ιονίζεται κατά 50% σε pKa=7.4. Παράγεται από το ένζυμο μυελοϋπεροξειδάση (MPO) σε ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα (αντίδραση 28). Το υποχλωριώδες οξύ είναι ικανό να ξεκινήσει αντιδράσεις τροποποίησης, στοχεύοντας στα λιπίδια, στο DNA και στις λιποπρωτεΐνες (Hawkins 2003). Συγκεκριμένα αντιδρά με:

→ Διπλούς δεσμούς που βρίσκονται είτε στη χοληστερόλη ή σε ποικίλα ακόρεστα εστερικά και αιθερικά φωσφολιπιδικά είδη. Παράγει τις χλωροϋδρίνες και την 2-χλωροεξαδεκανάλη, μια χλωρινιωμένη αλδεΐδη που προσελκύει τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα στο σημείο της φλεγμονής και βρίσκεται στις αθηροσκληρωτικές πλάκες και στο μυοκάρδιο που έχει υποστεί έμφραγμα. Αυτά τα προϊόντα επηρεάζουν επίσης τη δυναμική της μεμβράνης και προκαλούν κυτταρική λύση. Η MPO μαζί με τους τροποποιημένους επίτοπους επικάθεται στο ενδοθηλιακό

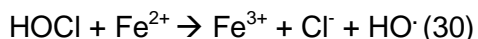
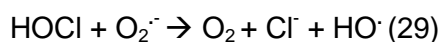
υπόστρωμα που υπάρχει πάνω στο αγγείο και συμβάλλει στην αθηρωματική δυσλειτουργία (Spickett 2000).

→ Νουκλεοβάσεις, συμβάλλοντας στη δημιουργία της 5-χλωροουρακίλης, ένα δείκτη για τη DNA κυτταρική βλάβη κατά τη φλεγμονή ο οποίος βρίσκεται στις αθηρωματικές τομές.

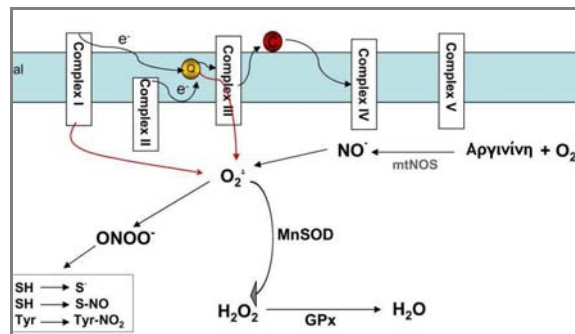
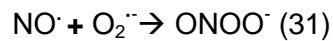
→ Τις πρωτεΐνες, παράγοντας τις χλωραμίνες (RNHCl). Αυτές παρεμποδίζουν επιδιορθωτικές διεργασίες στο DNA (Pero 1996). In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι οι λιποπρωτεΐνες που τροποποιούνται από το υποχλωριώδες οξύ εκθέτουν έναν αριθμό παθοφυσιολογικών επιδράσεων στα φαγοκύτταρα και στα αγγειακά κύτταρα συνεισφέροντας στην έναρξη και στη διατήρηση της φλεγμονώδους κατάστασης. Η πρόσληψη και η αποσύνθεση των τροποποιημένων από το υποχλωριώδες οξύ λιποπρωτεϊνών από τα μακροφάγα είναι ένα γεγονός που συμβάλλει στη δημιουργία των αφοροκυττάρων της χοληστερόλης (Bergt 2004).

→ Την τυροσίνη, παράγοντας την 3-χλωροτυροσίνη (Hazen 1997).

Το υποχλωριώδες οξύ μπορεί να απενεργοποιήσει την α1-αντιπρωτεάση καθώς και τη θρομβομοδουλίνη (μια γλυκοπρωτεΐνη στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων που ρυθμίζει την πήξη του αίματος). Οξειδώνει τις θειόλες, το ασκορβικό ανιόν, το νικοτινάμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο (Pullar 1999). Επίσης με την οξειδωτική του δράση απελευθερώνει μέταλλα από πρωτεΐνες. Η αντίδραση του με το υπεροξειδικό ανιόν ή με το δισθενή σίδηρο συμβάλλει στο σχηματισμό της ρίζας υδροξυλίου (αντιδράσεις 29,30).



Το υπεροξειδωτικό οξυγόνο παράγεται από τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα κύτταρα Kupffer. Η μεγαλύτερη προσοχή δίνεται όμως στο υπεροξειδωτικό οξυγόνο που παράγεται από την αντίδραση του NO με το υπεροξειδικό ανιόν (αντίδραση 31, Εικόνα 54) (Beckman 1996, Beckman 1991).



Εικόνα 54: Η παραγωγή του υπεροξειδωτικού οξυγόνου από το υπεροξειδικό ανιόν και το μονοξειδίο του αζώτου στα μιτοχόνδρια. Το υπεροξειδωτικό οξυγόνο αντιδρά με τις σουλφυδρυλικές ομάδες και με τα υπολείμματα τυροσίνης στις πρωτεΐνες.

Αυτή η αντίδραση συμβαίνει μόνο όταν η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του NO πλησιάσει τη συγκέντρωση της υπεροξειδικής δισμουτάσης των μιτοχονδρίων. Το NO έχει χρόνο ζωής μερικά δευτερόλεπτα, ενώ η υπεροξειδική ρίζα έχει χρόνο ζωής μερικά χιλιοστά του δευτερολέπτου. Συνεπώς το υπεροξειδωτικό οξυγόνο παράγεται μόνο στη θέση παραγωγής της υπεροξειδικής ρίζας που είναι κυρίως τα μιτοχόνδρια. Είναι ισχυρό οξειδωτικό με κυτταροτοξικές ιδιότητες. Η παρουσία της υπεροξειδικής δισμουτάσης που μειώνει το υπεροξειδικό ανιόν μειώνει την παραγωγή του υπεροξειδωτικού οξυγόνου και αυξάνει την παραγωγή του NO (Kirsch 2002). Το υπεροξειδωτικό οξυγόνο αντιδρά με βιολογικά μόρια αλλά σε χαμηλότερους ρυθμούς από την υδροξυλική ρίζα. Είναι όμως αρκετά τοξικό γιατί παραμένει σταθερό και διαχέεται μεταξύ των μεμβρανών (Radi 1998). Οι δράσεις του είναι οι παρακάτω:

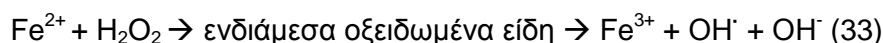
- Οξειδώνει τις σουλφυδρυλικές ομάδες της κυστεΐνης και της γλουταθειόνης, το άτομο θείου της μεθειονίνης, το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ, το λιποϊκό οξύ, την πουρίνη, την πυριμιδίνη και τις ανηγμένες μορφές του νικοτινάμιδου αδένινου δινουκλεοτιδίου (Radi 1998).
- Ξεκινά τη διαδικασία λιπιδικής υπεροξειδωσίας στις λιπιδικές μεμβράνες (Rubbo 2009).

- Νιτροσυλιώνει τις αρωματικές και αλειφατικές ενώσεις. Η πιο σημαντική νίτρωση είναι της τυροσίνης που μετατρέπεται σε 3-νιτροτυροσίνη. Η νίτρωση αλλάζει την τυροσίνη σε αρνητικά φορτισμένη επιφέροντας αλλαγές στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης που βρίσκεται (αδρανοποίηση ένζυμων και μείωση δραστηριότητας) (Gow 1996).
- Παρεμβαίνει στα φωσφορυλιωτικά-αποφωσφορυλιωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια (Radi 1996).
- Οξειδώνει την αιμοσφαιρίνη σε μεθαιμοσφαιρίνη (Wang 2010).

1.5. Τα Μεταλλικά στοιχεία

1.5.1. Ο Σίδηρος

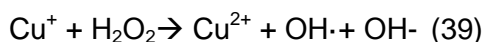
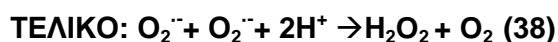
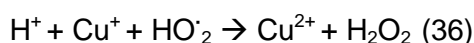
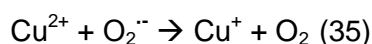
Ο σίδηρος βρίσκεται σε 2 οξειδοαναγωγικές καταστάσεις, το δισθενή και τον τρισθενή. Ο δισθενής έχει 4 αδέσμευτα ηλεκτρόνια στο 3d τροχιακό και ο τρισθενής έχει 5 αδέσμευτα ηλεκτρόνια. Ο σίδηρος που είναι συνδεδεμένος στις πρωτεΐνες δεν είναι οξειδωτικός. Όμως αναγωγικά μέσα όπως είναι η υπεροξειδική ρίζα μπορούν να τον κινητοποιήσουν. Ο ελεύθερος σίδηρος είναι σε φυσιολογικές συνθήκες πολύ λίγος στο αίμα (σχεδόν μηδενικός). Αυξάνεται σε παθολογικές καταστάσεις (σε μM συγκεντρώσεις) όπως είναι η αιμοχρωμάτωση και η θαλασσαιμία (Anderson 2000). Ο δισθενής σίδηρος αντιδρά με το υπεροξειδίο του υδρογόνου και δημιουργεί την υψηλά δραστική ρίζα του υδροξυλίου και μπορεί να ξεκινήσει τη λιπιδική υπεροξειδωση (αντίδραση 33) (Stadtman 1990, Halliwell 1984, Gutteridge 1989, Aruoma 1989). Ο τρισθενής σίδηρος που προσκολλάται σε κάποιους προσδέτες μπορεί να αντιδράσει με το H_2O_2 , αν και αυτή η αντίδραση είναι συνήθως πιο αργή από την αντίδραση του H_2O_2 με το δισθενή σίδηρο (αντίδραση 34).



1.5.2. Ο Χαλκός

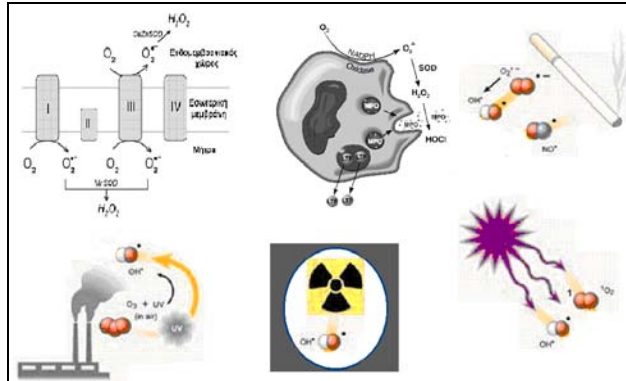
Ο χαλκός έχει 3 κοινούς αριθμούς οξειδωσης, το μονοσθενή, το δισθενή και τον τρισθενή. Ο μονοσθενής δεν είναι ρίζα. Ο δισθενής είναι ρίζα και έχει 1 αδέσμευτο ηλεκτρόνιο, ενώ ο τρισθενής έχει 2 αδέσμευτα ηλεκτρόνια. Η διαφορά στο ένα ηλεκτρόνιο μεταξύ μονοσθενή και δισθενή επιτρέπει στο χαλκό να προάγει τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών (αντιδράσεις 35, 36, 37, 38). Ο χαλκός με το να αλλάζει τους αριθμούς οξειδωσης καταλύει τη μετατροπή δύο ριζών υπεροξειδικού ανιόντος και δύο ιόντων υδρογόνου σε H_2O_2 και σε οξυγόνο (αντίδραση 39).

Ο χαλκός συνδέεται στενά σε αρκετά βιολογικά μόρια και προάγει την εξαρτώμενη βλάβη από το H_2O_2 . Η $OH\cdot$ που παράγεται δεν μπορεί να ανιχνευθεί από τα αντιοξειδωτικά για να το εξουδετερώσουν γιατί οι θέσεις δέσμωσης του είναι κατειλημμένες από το χαλκό. Έτσι δεν μπορεί να ανασταλθεί η βλάβη που προκαλείται από την $OH\cdot$ (Halliwell 1984).



1.6. Πηγές ελευθέρων ριζών

Οι πηγές ελευθέρων ριζών (οξυγόνου, αζώτου, χλωρίου και άνθρακα) είναι αρκετές και χωρίζονται σε ενδογενείς και σε εξωγενείς (Εικόνα 55) (Fulbert 1992, McCord 1993).



Εικόνα 55: Οι πηγές των ελευθέρων ριζών διακρίνονται σε ενδογενείς και εξωγενείς. Οι κύριες ενδογενείς πηγές είναι τα μιτοχόνδρια και η φλεγμονή. Οι κύριες εξωγενείς πηγές είναι το κάπνισμα, η ιοντίζουσα ακτινοβολία και η μόλυνση της ατμόσφαιρας.

1.6.1. Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών

1. Μιτοχόνδρια

Στα μιτοχόνδρια γίνεται η κατανάλωση οξυγόνου που μετατρέπεται σε ΔΜΟ. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο μιτοχόνδριο καταναλώνει περίπου το 85% του O_2 που χρειάζεται το κύτταρο. Γύρω στο 1-5% του οξυγόνου που περνά διαμέσου της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (μεταξύ του συμπλόκου 1 και 3) μετατρέπεται σε ΔΜΟ ως παραπροϊόν. Αναλυτικά, η παραγωγή ελευθέρων ριζών γίνεται από διάφορα μιτοχονδριακά ένζυμα που βρίσκονται στις παρακάτω περιοχές του μιτοχονδρίου (Kowaltowski 2009):

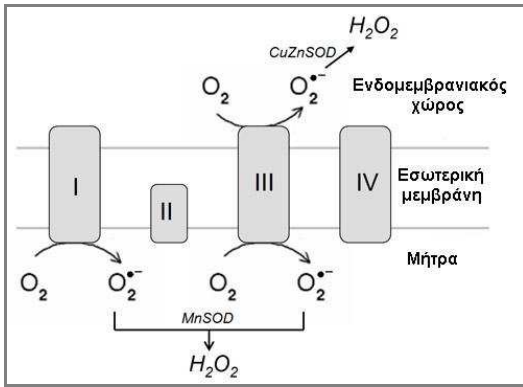
α. Μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων

→ Σύμπλοκο I: Σε αυτό το σύμπλοκο γίνεται η αντίστροφη μεταφορά ηλεκτρονίων (ΑΜΗ). Είναι ένας όρος που χαρακτηρίζει μια ομάδα οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων που επιτρέπει στα ηλεκτρόνια να ρέουν από το συνένζυμο Q στο NAD^+ , αντί να πάνε στο O_2 . Η ΑΜΗ απαιτεί μόνο την παρουσία του συνδεδεμένου με το $FADH_2$ υπόστρωμα (ηλεκτρικό ή α-γλυκεροφωσφορικό) για να ανάγει άμεσα το συνένζυμο Q, καθώς και το υψηλό μεμβρανικό δυναμικό. Η ΑΜΗ υποστηρίζει υψηλούς ρυθμούς παραγωγής ελευθέρων ριζών και συμβαίνει όταν δεν γίνεται φωσφορυλίωση στο μιτοχόνδριο ή όταν αναστέλλεται η φωσφορυλίωση από τοξικούς

παράγοντες. Αυτό το φαινόμενο αναστέλλεται από κάθε διαδικασία απώλειας ενέργειας όπως και από την οξίνιση της μιτοχονδριακής μήτρας (Kushnareva 2002). Τα παραπάνω έχουν αποδειχτεί μόνο *in vitro* σε απομονωμένα μιτοχόνδρια και όχι *in vivo*. Έτσι το κατά πόσο το σύμπλοκο I συμβάλλει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι ένα περίπλοκο θέμα.

→ Σύμπλοκο III: Ιστορικά, η πρώτη θέση που διαπιστώθηκε ότι παράγει ελεύθερες ρίζες είναι το σύμπλοκο III (bc₁ σύμπλοκο, ουβικινόνη, αναγωγάση του κυτοχρώματος c). Η κύρια ρίζα που παράγεται σε αυτή τη θέση είναι το ιόν υπεροξειδίου (Εικόνα 56) που μετατρέπεται σε H₂O₂ (Turrens 1980). Μια ασταθής ημικινόνη που δημιουργείται στο Q_o κέντρο πιστεύεται να είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία του ιόντος υπεροξειδίου. Όμως, αυτή η ημικινόνη δεν ανιχνεύθηκε ποτέ. Αποδείχθηκε η θέση παραγωγής του ιόντος υπεροξειδίου από τη χρήση αναστολέων διαφόρων τμημάτων του συμπλόκου III που αναστέλλουν και την παραγωγή του O₂⁻. Η αντίδραση ξεκινά από την οξείδωση της κινόλης (QH₂) μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων στην Q_o θέση του συμπλόκου. Το πρώτο ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στην αλυσίδα υψηλού δυναμικού που αποτελείται από το κυτόχρωμα c και c₁ και την οξειδάση του κυτοχρώματος c. Η αντίδραση αφήνει μια πολύ ασταθή ημικινόνη (Q_o^{*}), που δίνει το δεύτερο ηλεκτρόνιο στην αλυσίδα χαμηλού αναγωγικού δυναμικού.

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών αυξάνεται μετά από μια περίοδο ανοξίας, κατά την ισχαιμία αναρρόφησης, κατά την ελαττωματική οξειδωτική φωσφορυλίωση και όταν αυξάνεται ο βαθμός των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Σε μελέτες όπου δημιούργησαν ποντίκια που τους έλλειπε η μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση του μαγγανίου πέθαιναν λίγο μετά τη γέννα, ενώ σε αυτά που τους έλλειπε η κυτταροπλασματική υπεροξειδική δισμουτάση χαλκού, ψευδαργύρου επιβίωναν.



Εικόνα 56: Παραγωγή υπεροξειδικής ρίζας στα μιτοχόνδρια. Τα κύρια σύμπλοκα που συμβάλλουν στην παραγωγή της υπεροξειδικής ρίζας είναι το σύμπλοκο I και το σύμπλοκο III.

β. Εξωτερική πλευρά του μιτοχονδρίου

→ Η αναγωγή του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος b5: Εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Οξειδώνει το κυταροπλασματικό NADPH και παράγει O_2^- με γρήγορο ρυθμό 300 nmole/min/mgr protein (Whatley 1998). Επίσης αναγεννά το ασκορβικό οξύ επειδή καταλύει την αναγωγή της ασκορβυλικής ρίζας σε ασκορβικό, στο ήπαρ των θηλαστικών.

→ Η οξειδάση μονοαμινών (MAO): Καταλύει την οξείδωση των βιογενών αμινών που συνοδεύεται από την απελευθέρωση του H_2O_2 . Η ποσότητα του H_2O_2 που παράγεται υπερέχει της ποσότητας που παράγεται από οποιαδήποτε άλλη μιτοχονδριακή πηγή ελευθέρων ριζών. Η αύξηση της δραστηριότητας των MAO είναι υπεύθυνη για τη μιτοχονδριακή βλάβη στη νόσο.

→ Η μιτοχονδριακή δεϋδρογονάση του α-γλυκεροφωσφορικού: Είναι ένα συζευγμένο με το FAD ένζυμο που καταλύει την οξείδωση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης σε φωσφορική δεϋδροξυακετόνη και χρησιμοποιεί το μιτοχονδριακό συνένζυμο Q ως αποδέκτη ηλεκτρονίων. Κατά την οξείδωση παράγεται H_2O_2 (Miwa 2003).

γ. Μήτρα μιτοχονδρίου

→ Μιτοχονδριακή ακονιτάση: Μετατρέπει το κιτρικό σε ισοκιτρικό. Το ένζυμο περιέχει μια ομάδα σιδήρου και θείου που μπορεί να οξειδωθεί παράγοντας υδροξυλικές ρίζες. Η οξείδωση του ενζύμου συμβάλλει στην αδρανοποίηση του (Gardne 2002).

→ Το σύμπλοκο της δεϋδρογονάσης του πυροσταφυλικού και α-κετογλουταρικού μπορούν να δημιουργήσουν υπεροξειδικές και υδροξυλικές ρίζες. Και στα δύο την παραγωγή των ελευθέρων ριζών την προκαλεί η διυδρολιποαμιδική δεϋδρογονάση (μέρος των συμπλόκων). Αυτό το φαινόμενο επάγεται με τη μείωση του NAD^+ (φυσικού αποδέκτη ηλεκτρονίων) (Starkov 2004).

Όλα τα παραπάνω ένζυμα που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs έχει δείχθει να παράγουν ελεύθερες ρίζες όταν είναι απομονωμένα στο εργαστήριο ή σε απομονωμένα μιτοχόνδρια. Σε φυσιολογικές συνθήκες μέσα στον οργανισμό δεν έχει μελετηθεί τι συμβαίνει.

2. Υπεροξεισώματα

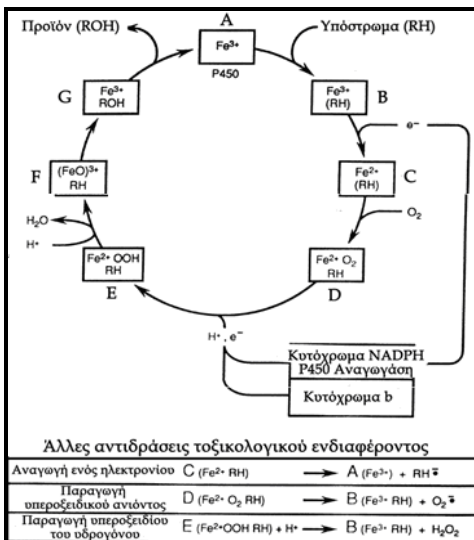
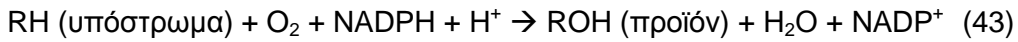
Τα υπεροξεισώματα παράγουν μεγάλες ποσότητες H_2O_2 . Βρίσκονται στους νεφρούς, στο έντερο, στην καρδιά και στο ήπαρ. Ο βασικός ρόλος αυτών των ενζύμων είναι η δημιουργία του H_2O_2 , ως συνέπεια της οξειδωσης των αμινοξέων και των α-υδροξυλικών οξέων. Η δευτερογενής πηγή του H_2O_2 είναι η β-οξειδωση των λιπαρών οξέων, μια σημαντική διεργασία που παρέχει χημική ενέργεια και λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Μετά από δίαιτα υψηλή σε λιπαρά, η ποσότητα των υπεροξεισωμάτων στο ήπαρ και η ποσότητα των λιπαρών οξέων που μεταβολίζονται από αυτά τα όργανα αυξάνεται σημαντικά. Για κάθε δυο άτομα άνθρακα των λιπαρών οξέων παράγεται ένα μόριο H_2O_2 . Εάν η ποσότητα του H_2O_2 ξεπεράσει την ικανότητα της καταλάσης να διασπά αυτό το μόριο δημιουργούνται οι συνθήκες για την υπεροξειδωση των λιπιδίων των μεμβρανών (Schrader 2006).

3. Μικροσώμια

Στα μικροσώμια βρίσκονται αρκετά ένζυμα. Τα ένζυμα που συμβάλλουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι η εποξειδική υδρατάση και το κυτόχρωμα P450. Η εποξειδική υδρατάση απαιτείται για την αποσύνθεση των εποξειδίων που προέρχονται από αλειφατικά ή αρωματικά προϊόντα διάσπασης από το μεταβολισμό ξένων ουσιών. Τα εποξειδία είναι δυνατόν να προκαλέσουν τοξικές, μεταλλαξιογόνες, καρκινογενείς και άλλες επιδράσεις.

Το κυτόχρωμα P450 αποτελείται από ένα συνδυασμό ποικίλων ισοενζύμων. Μέχρι τώρα, έχουν διαφοροποιηθεί γύρω στα 30 ισοένζυμα, για παράδειγμα 1A, 1A1, 1A2, 2A, 2A6, 2B, 2B1, 2B4, 2B6, 2B7, 2C, 2C3, 2C6-2C9, 2C11, 2C18, 2C19, 2D, 2D1, 2D6, 2E1 κ.τ.λ (=αριθμός από την ενζυμική ομάδα, γράμμα από την ενζυμική υπομονάδα, αριθμός από το αντιπροσωπευτικό είδος ενζύμου). Το κυτόχρωμα P450 είναι το κύριο μέλος της κλάσης των ενζύμων που βρίσκεται στα μικροσώμια και στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων. Είναι οξειδάσες μικτού τύπου που παίζουν κύριο ρόλο στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών (Cooper 2003) και συμβάλουν στην παραγωγή ΔΜΟ. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενζύμων του συστήματος P450

βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο του ήπατος, αλλά ένζυμα του P450 είναι παρόντα σε όλους τους ιστούς. Η βασική αντίδραση που καταλύεται από το P450 είναι η μονοοξυγόνωση, όπου το οξυγόνο ενσωματώνεται στο υπόστρωμα (RH), ενώ το δεύτερο οξυγόνο ανάγεται σε νερό μέσω της οξειδοαναγωγής της NADPH (αντίδραση 43 και Εικόνα 57).



Εικόνα 57: Κυρίαρχο ρόλο μεταξύ των αντιδράσεων βιομετασχηματισμού της φάσης I παίζει το σύστημα ενζύμων κυτόχρωμα P450 του ήπατος.

4. Οξειδωτικά ένζυμα

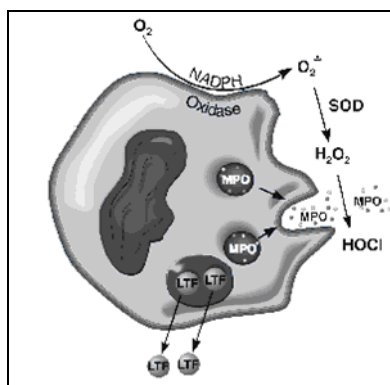
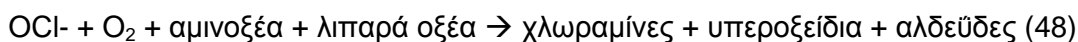
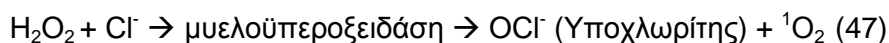
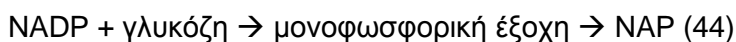
Στα οξειδωτικά ένζυμα περιλαμβάνονται η οξειδάση της ξανθίνης, η διοξυγενάση της ινδολεαμίνης, η διοξυγενάση της τρυπτοφάνης, η οξειδάση της γαλακτόζης, η κυκλοοξυγενάση, η λιποξυγενάση, η MPO και η οξειδάση της μονοαμίνης. Τα παραπάνω ένζυμα παράγουν υπεροξειδίο του υδρογόνου (Halliwell 1977).

5. Πρωτεΐνες αίμης

Το κυτόχρωμα C, η αιμοσφαιρίνη και η μυοσφαιρίνη οξειδώνουν αρκετά βιομόρια συμπεριλαμβανομένου των λιπιδίων. Αντιδράσεις των αιμοπρωτεϊνών με τα υπεροξειδία δημιουργούν τις ρίζες των αμινοξέων στις πρωτεΐνες και υψηλότερες καταστάσεις οξείδωσης του σιδήρου στο δακτύλιο της αίμης (Purpo 1988).

6. Φαγοκυττάρωση

Η φαγοκυττάρωση που συμβαίνει στα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και στα ιστικά μακροφάγα είναι η καλύτερη μεταβολική διεργασία που παράγει ελεύθερες ρίζες (Babior 2000, Halliwell 1982) (Εικόνα 58). Η κύρια πηγή ελευθέρων ριζών είναι η οξειδάση του NADPH (McCord 1978). Κατά τη φαγοκυττάρωση αυξάνεται η κατανάλωση οξυγόνου και γλυκόζης και συμβαίνουν οι ακόλουθες αντιδράσεις (44-48). Τα συνολικά συστατικά που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα φαίνονται στον Πίνακα 17.



Εικόνα 58: Ανάμεσα στα αντιμικροβιακά συστήματα που είναι παρόντα στο φαγόσωμα, ένα μεγάλο ποσοστό κατέχει η μυελοϋπεροξειδάση (MPO) με το H₂O₂ και ένα αλογόνο, ιδιαίτερα το χλώριο. Το αρχικό προϊόν του συστήματος MPO-H₂O₂-Cl⁻ είναι το αντιμικροβιακό οξειδωτικό υποχλωριώδες οξύ (HOCl/OCl⁻, pKa 7.53).

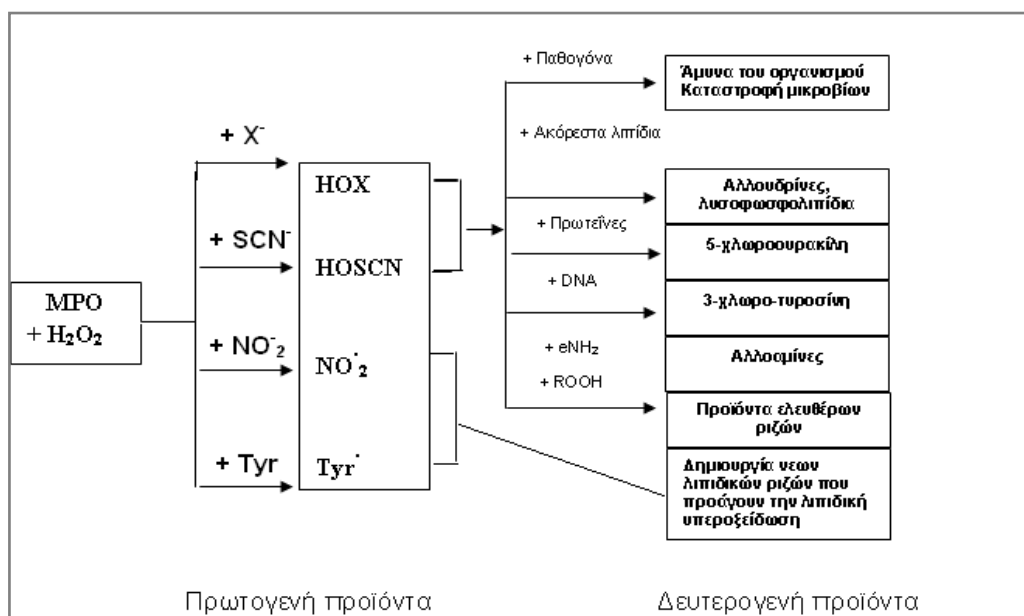
Πίνακας 17: Τα συνολικά συστατικά που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα.

Ελεύθερες ρίζες	Ένζυμα
Ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος	Λυσοένζυμα
Υδροξυλική ρίζα	Ουδέτερες πρωτεάσες (ελασάση)
Υπεροξειδίο του υδρογόνου	Όξινες πρωτεάσες (φωσφατάση)
Μονήρες οξυγόνο	Μυελοϋπεροξειδάση
	Οξειδάσες
Βιοενεργά λιπίδια	Συστατικά του συμπληρώματος
Μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος (προσταγλανδίνες, λευκοτριένια, θρομβοξάνες)	Παράγοντας P και D C1, C2, C4, C3b, C7 Προπερδίνη
Παράγοντας συσσώρευσης αιμοπεταλίων	Παράγοντες
Συνδεδεμένες πρωτεΐνες	Διεγερτικός παράγοντας των ινοβλαστών
Τρανσφερίνη	Διεγερτικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων
Φιμπρονεκτίνη	Αναστολέας ανάπτυξης όγκου
Νουκλεοσίδια	Παράγοντας νέκρωσης όγκων
Θυμιδίνη	Διεγερτικός παράγοντας αγγειογένεσης
Ουρακίλη	Ισταμίνη
Ουρικό οξύ	
Αδενοσίνη	

Η ΜΡΟ είναι μια ισχυρά κατιονική γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη που έχει μοριακό βάρος 144 κD. Αποτελείται από 2 πανομοιότυπα διμερή που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Κωδικοποιείται από ένα απλό γονίδιο (ακριβώς 14kb σε μέγεθος) που αποτελείται από 11 ιντρόνια και 12 εξόνια και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 στο κομμάτι q12-24. Είναι μια ισχυρά κατιονική πρωτεΐνη (δεσμεύεται εύκολα από την αλβουμίνη). Βρίσκεται στα πρωτογενή κοκκία των λευκών και κατέχει το 5% της συνολικής πρωτεΐνης των ουδετεροφίλων. Η ΜΡΟ είναι μοναδική στα ουδετερόφιλα και στα μονοκύτταρα. Τα μονοκύτταρα περιέχουν μόνο το ένα τρίτο της ΜΡΟ που βρίσκεται στα πολυμορφοπύρρηνα. Τα ηωσινόφιλα περιέχουν ένα σχετικό ένζυμο που ονομάζεται ηωσινοφιλική υπεροξειδάση (ΕΡΟ). Η ΕΡΟ είναι λιγότερο δραστική με τα ιόντα χλωρίου αλλά περισσότερο δραστική με τα ιόντα βρωμίου, ιωδίου και θειοκυανίου. Ο ρόλος και των δυο όμως είναι να παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες.

Το κάθε διμερές αποτελείται από μια ελαφριά και μια βαριά υπομονάδα, όπου η τελευταία αποτελείται από ένα άτομο ασβεστίου και ένα άτομο σιδήρου συνδεδεμένου με την πρωτοπορφυρίνη IV. Και οι δυο ομάδες της αίμης της ΜΡΟ είναι λειτουργικά πανομοιότυπες. Η ΜΡΟ είναι ικανή να δημιουργήσει μια ευρεία ποικιλία οξειδωτικών (Arnhold 2003). Επιπλέον, οι ενεργοποιημένες θέσεις του ενζύμου είναι ικανές να οξειδώνουν διάφορα υποστρώματα. Στο ανενεργό μόριο, ο σίδηρος της αίμης της ΜΡΟ είναι στη σιδηρή κατάσταση. Η ανενεργή ΜΡΟ

συνδέει είτε το ιόν του υπεροξειδίου είτε το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Στην πρώτη περίπτωση δημιουργείται ένα σύμπλεγμα που εμπλέκεται στην υδροξυλίωση των αρωματικών υποστρωμάτων (Klebanoff 1999). Το αρχικό προϊόν του συστήματος MPO-H₂O₂-Cl⁻ είναι το αντιμικροβιακό οξειδωτικό υποχλωριώδες οξύ (HOCl/OCl⁻, pKa 7.53). Όμως κάτω από παθολογικές καταστάσεις η ενεργοποίηση της MPO επιδρά αρνητικά στους ιστούς. Το υποχλωριώδες οξύ είναι ικανό να ξεκινήσει αντιδράσεις τροποποίησης στοχεύοντας στα λιπίδια, στο DNA και στις λιποπρωτεΐνες, συμπεριλαμβάνοντας αλογονοποίηση και νίτρωση (Lau 2006, Spickett 2007) (Εικόνα 59).



Εικόνα 59:
Το υποχλωριώδες οξύ είναι

ικανό να ξεκινήσει αντιδράσεις τροποποίησης στοχεύοντας στα λιπίδια, στο DNA και στις λιποπρωτεΐνες, συμπεριλαμβάνοντας αλογονοποίηση και νίτρωση.

1.6.3.Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών

1. Ξενοβιοτικές ουσίες

Οι ξενοβιοτικές ουσίες παράγουν ελεύθερες ρίζες κυρίως με το μεταβολισμό τους. Τα ένζυμα που μεταβολίζουν τα φάρμακα και τις ξενοβιοτικές ουσίες εκθέτουν κυρίως οξειδωτικές ιδιότητες. Αυτά περιλαμβάνουν το κυτόχρωμα P450, δεϋδρογονάσες και υδρολάσες. Άλλες ξενοβιοτικές ουσίες παράγουν οξειδοαναγωγικές ανακυκλώσεις (π.χ το παρακουάτ, η αλλοξάνη και η δοξορουβισίνη). Αρκετά αντιβιοτικά δεσμεύουν το χαλκό και το σίδηρο. Τέτοια αντιβιοτικά είναι οι αμινογλυκοσίδες, οι τετρακυκλίνες και οι κινόνες. Κυτταροστατικά φάρμακα όπως η αδριαμυκίνη μπορούν να παράγουν επίσης ελεύθερες ρίζες (Schradler 2006).

2. Άσκηση

Μηχανικό και μεταβολικό στρες που σχετίζεται με οποιαδήποτε τύπου άσκηση μπορεί να συμβάλλει στη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Κάθε δυναμικό κατά μήκος του μυϊκού κυττάρου συνοδεύεται από δημιουργία ρίζας του υπεροξειδικού ανιόντος (Bassot 1995). Η υψηλής έντασης μυϊκή σύσπαση απαιτεί συνεχόμενη εκπόλωση κατά μήκος του σαρκολείμματος που ακολουθείται από κίνηση του ασβεστίου έξω από το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Η περίσσεια του ενδοκυτταρικού ασβεστίου ενεργοποιεί την ασβεστιοεξαρτώμενη πρωτεάση που μετατρέπει τη δεϋδρογονάση της ξανθίνης σε οξειδάση της ξανθίνης. Αυτή η αντίδραση παράγει την ρίζα του υπεροξειδικού ανιόντος (Jackson 1993). Γενικά η άσκηση αυξάνει τη μιτοχονδριακή αναπνοή (Sacheck 2003).

Οξειδωτικό στρες κατά την άσκηση συμβαίνει υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Η αναερόβια άσκηση είναι συνήθως μικρής διάρκειας και υψηλής έντασης. Και στις δυο παράγεται ενέργεια με τη μορφή του ATP. Όταν μεγάλες ποσότητες ATP διασπώνται, το ADP συνεχίζει τις καταβολικές αντιδράσεις για να παράγει ξανθίνη και ουρικό οξύ. Η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει αυτήν την αντίδραση και παράγει το H₂O₂.

Η αναερόβια άσκηση συνοδεύεται από αυξημένη έκκριση των κατεχολαμινών, της νορεπινεφρίνης και της επινεφρίνης. Αυτές δρουν ως νευροδιαβιβαστές και ως πρώτα μηνύματα στη μεταφορά ενεργείας και στη δράση των σκελετικών μυών. Οι κατεχολαμίνες μπορούν να υποστούν αυτοοξειδωση με και χωρίς οξυγόνο και να παράγουν την υπεροξειδική ρίζα (Miller 1996). Σε ένα αερόβιο περιβάλλον η υπεροξειδική ρίζα μπορεί να παραχθεί από το οξυγόνο που

δεν έχει αναχθεί πλήρως σε νερό. Στην αναερόβια άσκηση το γαλακτικό οξύ συσσωρεύεται κατά την υψηλής έντασης άσκηση και συμμετέχει στη μετατροπή της υπεροξειδικής ρίζας σε υδροξυλική ρίζα.

Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών ενισχύεται κατά τη γήρανση (Fielding 1997). Η μιτοχονδριακή θεωρία της γήρανσης περιγράφει το φαινόμενο ως ένα φαύλο κύκλο, όπου η μιτοχονδριακή παραγωγή ελευθέρων ριζών οδηγεί σε οξειδωτική βλάβη, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Υπέρμετρη παραγωγή ελευθέρων ριζών προκαλεί δυσλειτουργία συστολής, αποικοδόμηση μυϊκών πρωτεϊνών και σαρκοπενία. Τα γηρασμένα μιτοχόνδρια έχουν λιγότερο κυτόχρωμα aa_3 σε σχέση με τους άλλους μεταφορείς ηλεκτρονίων, θέτοντας έτσι έναν εν δυνάμει κίνδυνο ότι τα ηλεκτρόνια ίσως να μεταφέρονται έξω από την ακολουθία και έτσι να δημιουργούν ελεύθερες ρίζες στο εσωτερικό της μεμβράνης. Με την ηλικία αυξάνονται και οι υδροφοβικές ιδιότητες της μιτοχονδριακής μεμβράνης και η υδροφοβικότητα της.

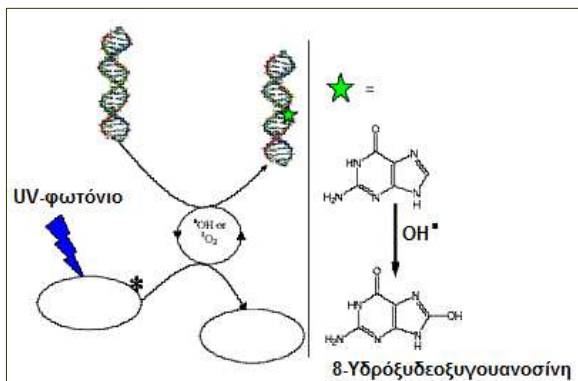
3. Ιοντίζουσα Ακτινοβολία

Ο κύριος στόχος της ιοντίζουσας ακτινοβολίας είναι το DNA. Η διαδικασία του κυτταρικού θανάτου εμπλέκει δυο μηχανισμούς: άμεση δράση στην οποία η ραδιενέργεια απορροφάται από το κυτταρικό DNA απευθείας και έμμεσα στην οποία η ακτινοβολία αλληλεπιδρά με άλλα μόρια ή άτομα του κυτάρου (κυρίως το νερό) για να παράγει ελεύθερες ρίζες οι οποίες είναι ικανές να διαχέονται αρκετά μακριά για να φτάσουν και να καταστρέψουν τους στόχους τους π.χ DNA (Hall 1994).

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία συμβάλλει στην ομολυτική διάσπαση του νερού και στην παραγωγή της υδροξυλικής ρίζας (Buettner 1996, Charman 1980). Τα αρχικά κυτταρικά γεγονότα που προκαλούνται από τη ραδιενέργεια παίρνουν μέρος σε μικροδευτερόλεπτα και ακολουθούνται από επιδιόρθωση του DNA. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία ενεργοποιεί το μονοπάτι που οδηγεί στην έκφραση του FAS και του p53, συμβάλλοντας στην απόπτωση (Hengartner 2000, Kuwabara 2003, Ruvolo 2001).

4. Ηλιακή ακτινοβολία

Η υπεριώδης ακτινοβολία απορροφάται από τα βιομόρια και προκαλεί βλάβη σε αυτά. Επίσης παράγει ελεύθερες ρίζες καταλήγοντας στο οξειδωτικό στρες (Wenk 2001) (Εικόνα 60).



Εικόνα 60: Τα μόρια της ηλιακής ακτινοβολίας απορροφώνται από το DNA και παράγουν την υδροξυλική ρίζα, που υδροξυλιώνει τις βάσεις του DNA (Wenk 2001).

5. Αλκοόλ

Η αιθανόλη είναι διαλυτή στο νερό και διαπερνά εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες. Σε μικρές συγκεντρώσεις ωφελεί γιατί αυξάνει τα επίπεδα της HDL χοληστερίνης και προάγει τη σύνθεση του NO. Η παρατεταμένη όμως λήψη αλκοόλης βλάπτει αρκετούς ιστούς και ιδιαίτερα το ήπαρ (Dan 2007).

Στα ζώα μεταβολίζεται στο ήπαρ από την αλκοολική δεϋδρογονάση και από την καταλάση που εντοπίζεται στα υπεροξεισωμάτια. Η αλκοόλη διασπάται σε ακεταλδεΐδη για να δημιουργήσει την αιθανάλη (ακεταλδεΐδη) (αντίδραση 49). Η ακεταλδεΐδη είναι πιο τοξική από την αιθανόλη και έχει τις παρακάτω βιοχημικές δράσεις (Quertemont 2006).

- συνδέεται με φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες.
- προκαλεί απελευθέρωση προσταγλανδινών.
- διαχωρίζει την 6-φωσφορική πυριδοξάλη από το δεσμό της με την πρωτεΐνη.
- διεγείρει τη σύνθεση κολλαγόνου από τα κύτταρα Ito (Mello 2008).
- αναστέλλει την έκκριση λιποπρωτεϊνών από το ήπαρ.
- εκθέτει ανοσογονική δράση.

Η ακεταλδεΐδη μπορεί γρήγορα να μεταβολισθεί στα μιτοχόνδρια από την αλδεϋδική δεϋδρογονάση ή από την οξειδάση της ξανθίνης για τη δημιουργία οξικού οξέος (αντίδραση 50). Υψηλή πρόσληψη αλκοόλ μετακινεί το κυτταρικό πηλίκιο NAD⁺/NADH σε όφελος της ανηγμένης

κατάστασης στο κυτοσόλιο και στα μιτοχόνδρια. Αυτό μπορεί να προάγει παθολογική συσσώρευση λίπους στο ήπαρ (Waluga 2003). Μικρότερες ποσότητες αιθανόλης μπορούν να οξειδωθούν από την υπεροξειδική δράση της καταλάσης στα υπεροξεισώματα και από συγκεκριμένα κυτοχρώματα (Crabb 1995).



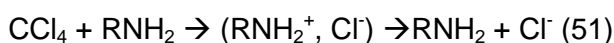
Η επαναλαμβανόμενη έκθεση στην αιθανόλη επάγει τη σύνθεση του KYTP4502E1 στα ηπατοκύτταρα και στα κύτταρα Kupffer για την οξείδωση της, συμβάλλοντας στη δημιουργία ελευθέρων ριζών (Albano 2006).

6. Ατμοσφαιρικοί ρύποι

Οι ατμοσφαιρικοί ρύποι περιλαμβάνουν ο όζον, το μονοξειδίο του αζώτου και το διοξείδιο του θείου. Το όζον προστίθεται στους διπλούς δεσμούς των λιπιδίων και δημιουργεί τα οζονίδια, τα οποία αποσυντίθεται στις κυτταροτοξικές αλδεΐδες. Επίσης προσβάλλει τις πρωτεΐνες και μπορεί να δημιουργήσει το μονήρες οξυγόνο και την υδροξυλική ρίζα. Τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες είναι στόχοι του όζοντος στην αναπνευστική οδό (Borek 1998). Το διοξείδιο του θείου είναι ένα έγχρωμο αέριο που δημιουργείται από την έφλεξη των καυσίμων που περιέχουν θείο. Δεν περιέχει αδέσμευτα ηλεκτρόνια και είναι περισσότερο οξειδωτικός παρά αναγωγικός παράγοντας (Romero 1998).

7. Τα βιομηχανικά απόβλητα

Τα βιομηχανικά απόβλητα και τα βιομηχανικά ατυχήματα μπορούν να απελευθερώσουν τετραχλωράνθρακα και χλωροφόρμιο. Αυτοί οι διαλύτες αντιδρούν με τις πρωτεΐνες και με τις αμίνες (αντίδραση 51). Η ελεύθερη ρίζα του τετραχλωράνθρακα ($\text{C}\cdot\text{Cl}_3$) προάγει την ηπατική βλάβη συμπεριλαμβανομένου της κίρρωσης (Weber 2003). Δευτερευόντως, μέσω μεταβολισμού αρκετοί καρκινογόνοι υδατάνθρακες παράγουν ενδιάμεσα προϊόντα ελευθέρων ριζών. Παραδείγματα τέτοιων υδατανθράκων είναι το βενζανθρακένιο και το μεθυλοχολανδρένιο .



8. Καπνός τσιγάρου

Ο καπνός του τσιγάρου είναι ένα πολύπλοκο μείγμα τοξικών παραγόντων, κάποιοι από τους οποίους είναι ελεύθερες ρίζες, άλλοι είναι παράγοντες που δημιουργούν ελεύθερες ρίζες και άλλοι είναι συστατικά που μειώνουν τη γλουταθειόνη. Η αέρια φάση οξειδώνεται και η στερεά φάση ανάγεται ασθενώς. Και οι δυο φάσεις περιέχουν ελεύθερες ρίζες. Οι ελεύθερες ρίζες στην αέρια φάση του καπνού έχουν μικρότερο χρόνο ζωής από αυτές στη στερεά φάση. Ένα γραμμάριο καπνού περιέχει 10^7 ανιχνεύσιμες ρίζες αρκετών διαφορετικών τύπων, αρκετές από τις οποίες είναι σταθερές για ώρες (Munteanu 2007). Ένας τύπος είναι οι ημικινόνες που υφίστανται οξειδοαναγωγική μετατροπή σε κινόνες και σε υδροξυκινόνες. Αυτή η αντίδραση δημιουργεί το H_2O_2 και την υπεροξειδική ρίζα. Ο καπνός του τσιγάρου έχει επίσης αρκετά μέταλλα $>1\mu g$ που εισπνέονται με τον καπνό.

Η αέρια φάση περιέχει 10^{15} ελεύθερες ρίζες ανά φύσημα συμπεριλαμβανομένου των αλκοξυλικών, υπεροξυλικών και των ριζών άνθρακα. Καθώς εισπνέεται δεν αλλάζει η συγκέντρωσή τους. Η βλάβη από τον καπνό του τσιγάρου συμβαίνει με πολλούς μηχανισμούς (Halliwell 1993, Halliwell 2006).

- Οι υπεροξυλικές ρίζες και οι δραστικές μορφές αζώτου προκαλούν άμεση βλάβη με την ενεργοποίηση της λιπιδικής υπεροξειδωσίας, την οξειδωσία και νιτροσουλίωση πρωτεϊνών, λιπιδίων και DNA. Από μελέτες βρέθηκαν υψηλά επίπεδα ισοπροστανίων στο πλάσμα και στα ούρα και υψηλά επίπεδα 8-υδροξυ-δεοξυγουανωσίνης στα λευκά αιμοσφαίρια, στον πνεύμονα, στο σπέρμα και στα ούρα των καπνιστών (Valavanidis 2009).
- Οι αλδεΐδες (ακρολείνη, ακεταλδεΐδη και φορμαλδεΐδη) μειώνουν τη γλουταθειόνη και τροποποιούν τις θειολικές και τις αμινικές ομάδες.
- Οι υδροκινόνες στην πίσσα δημιουργούν τις ημικινόνες, την υπεροξειδική ρίζα και το H_2O_2 .
- Ο καπνός του τσιγάρου είναι φλεγμονώδης και ερεθιστικός και μπορεί να ενεργοποιήσει τα μακροφάγα να παράγουν την υπεροξειδική ρίζα, το H_2O_2 και πιθανώς το NO (Dwyer 2003).
- Οι ελεύθερες ρίζες αναστέλλουν τη δράση της σουρφακτάνης και της $\alpha 1$ -αντιπρωτεϊνάσης, δημιουργώντας το εμφύσημα (Camp 2009).

9. Σιλικόνη

Η σιλικόνη είναι το δεύτερο πιο άφθονο στοιχείο στη γη που βρίσκεται ως διοξείδιο της σιλικόνης. Παραδείγματα διοξειδίου της σιλικόνης είναι η άμμος και το χαλάζι. Αρκετά υλικά όπως η άσβεστος περιέχουν ιόντα σιλικόνης. Η παρατεταμένη έκθεση σε σκόνη σιλικόνης δημιουργεί χρόνια βλάβη στον πνεύμονα (σιλίωση). Η εισπνοή ινών ασβέστου για παρατεταμένη περίοδο προκαλεί πνευμονική ίνωση και δυο καρκίνους στον πνεύμονα (μεσοθηλίωμα και βρογχογενές καρκίνωμα). Ο σίδηρος είναι ένα ενιαίο κομμάτι της κρυσταλλικής δομής της σιλικόνης στον αμοσίτη. Αυτό το σύμπλεγμα μπορεί να συμβάλλει στη δημιουργία της υδροξυλικής ρίζας και της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Munteanu 2007).

10. Μέταλλα

Το αρσενικό: Είναι ένα στοιχείο της ομάδας V του περιοδικού πίνακα και έχει δυο καταστάσεις οξειδωσης, το αρσενικό (iii) και (v). Βρίσκεται στο έδαφος, στο νερό της θάλασσας και στο νερό των ποταμών, ευτυχώς σε συγκεντρώσεις 0,1 ppm. Δυστυχώς, υψηλότερα επίπεδα αρσενικού υπάρχουν στο πόσιμο νερό στην Ταϊβάν, στη Βαγδαλέσα, στην Ινδία και στην Αργεντινή. Σε υψηλές δόσεις είναι καρκινογόνο και σε επίπεδα ppm μπορούν να οδηγήσει στην αθηροσκλήρυνση. Το οξείδιο του αρσενικού μπορεί να παρθεί από τα κύτταρα σε λάθος του φωσφορικού και να επηρεάσει τα συστήματα μεταγωγής σήματος (Hei 2004).

Το νικέλιο: Το μεταβατικό στοιχείο νικέλιο έχει δυο βασικές καταστάσεις οξειδωσης, τη δισθενή και την τρισθενή και αποτελεί το 0,01% του φλοιού της γης. Χρησιμοποιείται από αρκετούς οργανισμούς ως ένας ενζυμικός συμπαραγοντας, για παράδειγμα στις ουρεάσες στα φυτά και στη βακτηριακή υπεροξειδική δισμουτάση του νικελίου. Η εισπνοή του νικελίου μπορεί να οδηγήσει στη φλεγμονή των πνευμόνων, στην ίνωση και ίσως στον καρκίνο του πνεύμονα. Τα κύτταρα εμφανίζονται να φαγοκυτταρώνουν αυτά τα σωματίδια και ορισμένα από αυτά καταλήγουν στον πυρήνα. Τα υδρογονωμένα ιόντα του νικελίου και τα σύμπλοκα των πυρηνικών πρωτεϊνών με το νικέλιο αντιδρούν αργά με το νερό και δημιουργούν την υδροξυλική ρίζα. Η επώαση της χρωματίνης με το νικέλιο οδηγεί σε μεταλλάξεις στο DNA (Kasprzak 2002).

Κοβάλτιο: Το κοβάλτιο είναι ένα μεταβατικό μέταλλο με βασικές καταστάσεις οξειδωσης την τρισθενή και τη δισθενή. Χρησιμοποιείται στη βιομηχανία μετάλλων και τα άλατα του χρησιμοποιούνται ως χρωμογόνοι παράγοντες. Η αντίδραση του κοβαλτίου με το H_2O_2 , παράγει τα δραστικά είδη που μπορούν να αποσυνθέσουν τη δεσοξυριβόζη και να υδροξυλιώσουν τις φαινόλες (Valko 2005).

Κάδμιο: Χρησιμοποιείται στις μπαταρίες αλλά είναι τοξικό (ιδιαίτερα στα νεφρά) και καρκινογόνο. Συνήθως η τοξικότητα εμφανίζεται από την εισπνοή αερίων που περιέχουν κάδμιο. Ενώνεται με τις σουλφιδρυλικές ομάδες και προκαλεί μείωση της γλουταθειόνης. Η χορήγηση του καδμίου στα ζώα επάγει τη σύνθεση της μεταλλοθειονίνης αλλά οι μεταλλοθειονίνες που περιέχουν κάδμιο αποσυντίθεται στα νεφρά και απελευθερώνουν κάδμιο συμβάλλοντας στην τοξικότητα των νεφρών (Valko 2005).

Υδράργυρος: Είναι τοξικός στους ανθρώπους και στα άλλα ζώα. Ενώνεται με τις σουλφιδρυλικές ομάδες και μπορεί να μειώσει τη γλουταθειόνη που συνεισφέρει στη βλάβη των νεφρών (Valko 2005).

Μόλυβδος: Η έκθεση στο μόλυβδο γίνεται μέσω τις εξατμίσεις των αυτοκινήτων, τις βαφές, τις μπαταρίες που περιέχουν ίχνη μόλυβδου, καθώς και τρόφιμα και πόσιμο νερό που έχουν μολυνθεί από μόλυβδο. Ο μόλυβδος έχει δύο κοινούς αριθμούς οξειδωσης, το δισθενή και τον πεντασθενή. Μεγάλη ποσότητα μόλυβδου μπορεί να προκαλέσει υπέρταση, νεφροτοξικότητα και βλάπτει τα ερυθρά αιμοσφαίρια και το ανοσοποιητικό. Στα παιδιά οι συγκεντρώσεις του μόλυβδου στο αίμα είναι επαρκής για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Οι μηχανισμοί της τοξικότητας του μόλυβδου συμπεριλαμβάνουν την αναστολή του δ-αμινολαβινουλίου οξέος. Τα ιόντα του μόλυβδου επιταχύνουν την οξειδωση της αιμοσφαιρίνης. Ενώνεται με τις θειολικές ομάδες και σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλεί έλλειψη γλουταθειόνης (Valko 2005).

Βανάδιο: Χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες και συνεισφέρει στις προ-οξειδωτικές επιδράσεις. Υπάρχει σε τέσσερις οξειδωμένες μορφές. Το βανάδιο αναστέλλει τις ATPάσες και τη φωσφατάση της φωσφοτυροσίνης. Ανάγει το οξυγόνο στην υπεροξειδική ρίζα, δημιουργεί την υδροξυλική ρίζα από το H_2O_2 και αποσυνθέτει τα λιπιδικά υπεροξειδία (Liochev 1991).

Τιτάνιο: Το διοξείδιο του τιτανίου δημιουργεί την υδροξυλική ρίζα από το H_2O_2 (Liochev 1991).

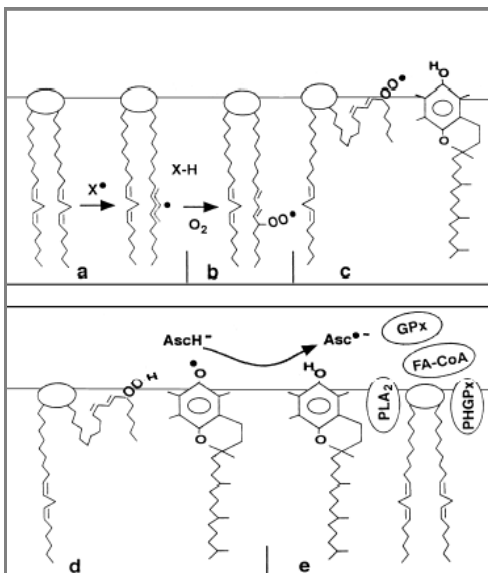
Αλουμίνιο: Είναι το πιο άφθονο μέταλλο στη γη και το τρίτο πιο άφθονο στοιχείο μετά τη σιλικόνη. Τα ζώα εκτίθενται σε αυτό. Καταναλώνεται μέσω του τσαγιού και αρκετών επεξεργασμένων τροφίμων. Μολύνει διαλύματα που χρησιμοποιούνται για παρεντερική χρήση καθώς επίσης και αρκετά εργαστηριακά αντιδραστήρια (ATP και αλβουμίνη). Το αλουμίνιο έχει σταθερούς αριθμούς οξείδωσης. Σε υδατικά διαλύματα υπάρχει ορισμένη ποσότητα με εξαίρεση στα διαλύματα με χαμηλό pH. Από μόνο του δεν προάγει αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών. Όμως παρουσία σιδήρου επιταχύνονται οι αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξειδωσης που επάγει ο σίδηρος (Exley 2004).

2. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ

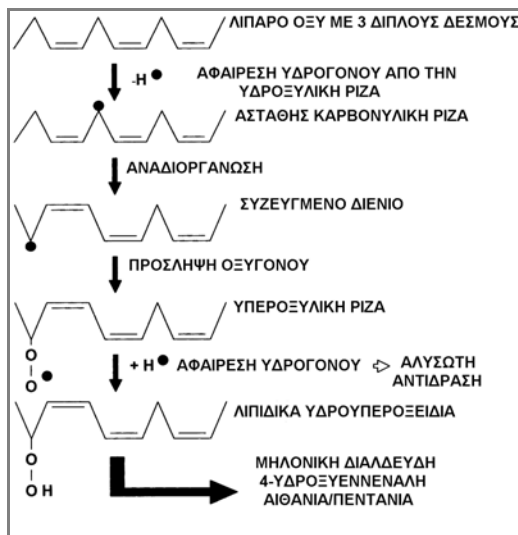
Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ ασταθείς και έχουν πολύ μικρό χρόνο ζωής. Για αυτό στην εκτίμηση του οξειδωτικού στρες μετρώνται τα προϊόντα αντίδρασης τους με τα βιολογικά βιομόρια (πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA).

2.1. Προϊόντα οξειδωτικής βλάβης λιπιδίων

Λιπιδική υπεροξειδωση είναι η οξειδωτική αποσύνθεση των λιπιδίων, όπου οι ελεύθερες ρίζες κλέβουν ηλεκτρόνια από τα λιπίδια στις κυτταρικές μεμβράνες καταλήγοντας σε κυτταρική βλάβη (Εικόνα 61). Επηρεάζει κυρίως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η αντίδραση λιπιδικής υπεροξειδωσης προχωρά με ένα μηχανισμό αλυσιδωτής αντίδρασης (Εικόνα 62) και αποτελείται από 3 στάδια (έναρξη, πολλαπλασιασμός, τερματισμός) (Wagner 1994).

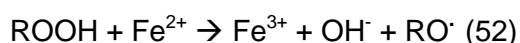


Εικόνα 61: Μεμβρανική λιπιδική υπεροξειδωση: a) έναρξη της διεργασίας υπεροξειδωσης με αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου, δημιουργώντας έτσι την πενταδιενυλική ρίζα, b) οξυγόνωση για να δημιουργηθεί η υπεροξειδική ρίζα και ένα συζευγμένο διένιο, c) Η μειονότητα των υπεροξειδικών υφίσταται επιδιόρθωση από την τοκοφερόλη, d) Η υπεροξειδική ρίζα μετατρέπεται στα λιπιδικά υδρουπεροξείδια και η εναπομένουσα τοκοφερυλική ρίζα μπορεί να επιδιορθωθεί από το ασκορβικό οξύ, e) η τοκοφερόλη μπορεί να ανακυκλωθεί από το ασκορβικό και η εναπομένουσα ασκορβυλική ρίζα μπορεί να ανακυκλωθεί από ενζυμικά συστήματα. Τα ένζυμα φωσφολιπάση A2 (PLA₂), φωσφολιπιδική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (PHGPx), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και το άκυλοσυνένζυμο A συνεργάζονται για να επιδιορθώσουν την οξειδωμένη λιπαρή αλυσίδα των φωσφολιπιδίων (Buettner 1993).



Εικόνα 62: Η προσβολή της υδροξυλικής ρίζας στα ακόρεστα λιπαρά οξέα αφαιρεί υδρογόνα από αυτά και δημιουργούνται οι ασταθείς καρβονυλικές ρίζες και τα συζευγμένα διένια. Τα τελευταία λόγω της αστάθειας τους αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο και παράγουν την υπεροξυλική ρίζα. Αφαίρεση υδρογόνου ξεκινά μια αλυσιδωτή αντίδραση που τερματίζεται με την αντίδραση δυο ριζών για τη δημιουργία μη ριζας. Τα λιπιδικά υδρουπεροξείδια μπορούν να διασπαστούν στη μηλονική διαλδεΰδη, στην 4-υδροξυεπεννάλη, στα αιθάνια και στα πεντάνια (Pryor 1976).

Η έναρξη της λιπιδικής υπεροξειδωσης μπορεί να προκληθεί από την προσθήκη της ρίζας ή από την αφαίρεση υδρογόνου από μια μεθυλική ομάδα με τη βοήθεια ενζύμων (κυκλοοξυγενάση) ή με την προσθήκη μετάλλων (Lippman 1989). Ο τρισθενής σίδηρος αποσυνθέτει τα λιπιδικά υπεροξειδία στις αλκοξυλικές ρίζες (αντίδραση 52) (Aruoma 1989). Η αλκοξυλική ρίζα αφαιρεί H[·] από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και από τα υπεροξειδία (αντίδραση 53) (Russanov 1979).



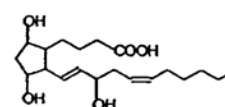
Ο χαλκός είναι ισχυρός προαγωγέας της οξειδωσης λιπιδίων και συγκεκριμένα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (Ozcelik 2009). Το κοβάλτιο, ο μόλυβδος και το αλουμίνιο δεν ξεκινούν από μόνοι τους τη λιπιδική υπεροξειδωση αλλά συνδέονται με τα λιπίδια με ένα τρόπο που διευκολύνει την εξαρτώμενη από το σίδηρο λιπιδική υπεροξειδωση. Τα καθαρά λιπιδικά υπεροξειδία είναι σταθερά σε θερμοκρασία δωματίου αλλά αποσυντίθενται στην παρουσία των μεταβατικών μεταλλικών ιόντων, δημιουργώντας αλκοξυλικές ρίζες, υπεροξυλικές ρίζες και υδρογονάνθρακες (πεντάνιο, αιθάνιο).

Οι συνολικές επιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι η μείωση της ρευστότητας των μεμβρανών, η αύξηση της διαπερατότητας των μεμβρανών σε ουσίες που φυσιολογικά δεν διαπερνούν τη μεμβράνη, η βλάβη σε μεμβρανικές πρωτεΐνες και η αδρανοποίηση ενζύμων και ιοντικών καναλιών. Η συνεχόμενη οξειδωση των λιπαρών οξέων και η διάσπαση τους προς παραγωγή αλδευδών οδηγεί στη διατάραξη της μεμβρανικής ακεραιότητας. Για παράδειγμα η καταστροφή της λυσοσωμικής μεμβράνης συμβάλλει στην έξοδο των υδρολυτικών ενζύμων. Η υπεροξειδωση τη ερυθροκυτταρικής μεμβράνης συμβάλλει στο να χάνουν την ικανότητα να αλλάζουν σχήμα τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά τη δίοδο τους από μικρά αγγεία (Girotti 1985).

Τα οξειδωμένα λιπίδια έχουν επιδράσεις στο κύτταρο παρόμοιες με το H₂O₂ (χαμηλά επίπεδα επάγουν τον πολλαπλασιασμό, μεσαία επίπεδα τον αναστέλλουν και υψηλά επίπεδα επάγουν απόπτωση και νέκρωση) (Hammer 1997). Αρκετά προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης δρουν ως σηματοδοτικά μόρια και ορισμένες φορές έχουν ευεργετικές

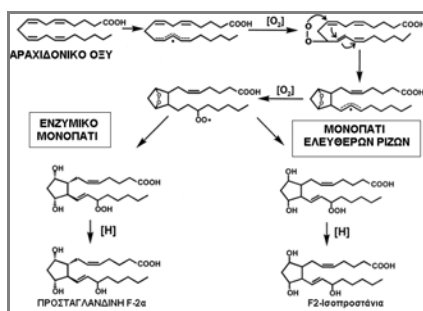
επιδράσεις. Για παράδειγμα, η υπεροξειδωση της φωσφατιδυλοχολίνης δημιουργεί θραύσματα που συνδέονται στους PAF (παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων) και εκθέτουν παρόμοιες δραστηριότητες με τον PAF (ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων, συσσώρευση των αιμοπεταλίων).

Στα λιπίδια δημιουργούνται αρκετά σταθερά προϊόντα από τη δράση των ελευθέρων ριζών σε αυτά (Michel 2008). Τα κύρια παράγωγα είναι τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία (LOOH), η μηλονική διαλδεΐδη (MDA), η 4-ύδροξυνοενάλλη (4-HNE), άλλες αλδεΐδες και τα ισοπροστάνια .



2.1.1. Τα Ισοπροστάνια

Τα ισοπροστάνια ανήκουν στην οικογένεια των παραγώγων της προσταγλανδίνης. Είναι εικοσανοειδή που παράγονται από τη μη-ενzymική τυχαία οξειδωση των φωσφολιπιδίων των ιστών από τις ρίζες οξυγόνου και απελευθερώνονται στο πλάσμα και στα ούρα με τη δράση της φωσφολιπάσης (Εικόνα 63). Δημιουργούνται από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με τουλάχιστον 3 διπλούς δεσμούς (π.χ. λινολενικό, αραχιδονικό οξύ κ.τ.λ.). Διαφέρουν από τις προσταγλανδίνες που παράγονται ενzymικά με την κυκλοοξυγενάση από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Morrow 1997, Morrow 1996).

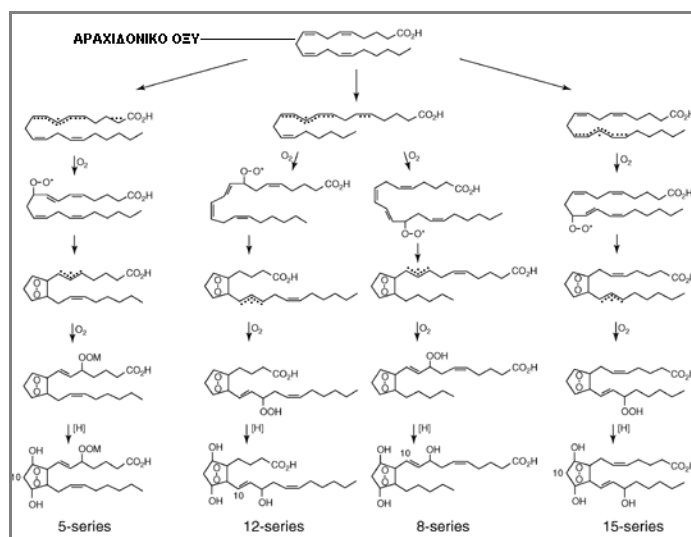


Εικόνα 63: Μονοπάτι ενzymικής σύνθεσης των προσταγλανδινών F_{2α} και έναρξη σύνθεσης των ισοπροστανίων από τις ελεύθερες ρίζες (Morrow 1997).

Το αραχιδονικό οξύ με τους πολλαπλούς διπλούς δεσμούς είναι πολύ ευαίσθητό στην υπεροξειδωση (Roberts 2000). Το αραχιδονικό οξύ υφίσταται αφαίρεση ενός υδρογόνου για να παράγει μια ρίζα. Κατόπιν γίνεται εισαγωγή του οξυγόνου για να δημιουργηθεί η υπεροξυλική ρίζα. Ανάλογα με τη θέση της αφαίρεσης του υδρογόνου και τη θέση εισαγωγής του οξυγόνου,

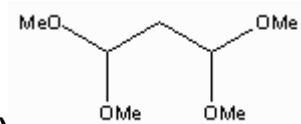
δημιουργούνται τέσσερις διαφορετικές υπεροξυλικές ρίζες

(Fam 2003). Η ενδοκυκλοποίηση των ριζών συμβαίνει ακολουθούμενη από την προσθήκη ενός μορίου οξυγόνου για να παραχθούν τέσσερα δικυκλοϋπεροξειδία εναντιοϊσομερή. Καθένα από τα τέσσερα εναντιοϊσομερή μπορεί να αναπαριστά θεωρητικά οκτώ ρακεμικά διαστερομερή. Έτσι, 64 διαφορετικά συστατικά μπορούν να δημιουργηθούν με αυτή τη διεργασία (Εικόνα 64).



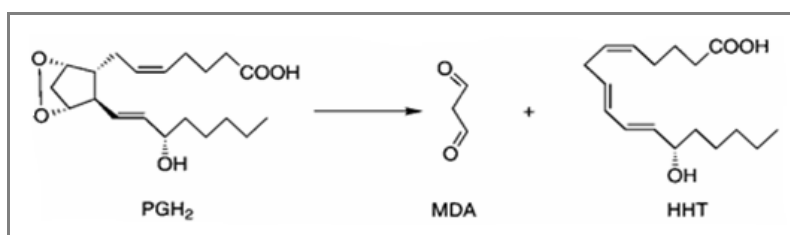
Εικόνα 64: Μηχανισμός δημιουργίας των F₂ ισοπροστανίων. Δημιουργούνται 4 εναντιοϊσομερή (5,12,8,15 series) καθένα από τα οποία αποτελείται από οκτώ ρακεμικά διαστεροϊσομερή.

Τα κυκλοφορούντα ισοπροστανία είναι κυρίως εστεροποιημένα με φωσφολιπίδια και απελευθερώνονται με τη δράση της φωσφολιπάσης A₂. Τα ισοπροστανία μεταβολίζονται και εκκρίνονται στα ούρα και ο χρόνος ημίσειας ζωής τους είναι 20 λεπτά. Ένα από τα κυριότερα ισοπροστανία, το 8-iso-F_{2a} (ανήκει στην οικογένεια των F₂-ισοπροστανίων) έχει συγκεντρώσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον λόγω των κυτταροτοξικών βιολογικών ιδιοτήτων του (έχει ισχυρή αγγειοσυσταλτική δράση στον πνεύμονα και στους νεφρούς) (Basu 2004) και παίζει αιτιοπαθογενετικό ρόλο στην αθηρογένεση. Τα ισοπροστανία είναι χημικά σταθερά και μπορούν να ανιχνευθούν στο πλάσμα και στα ούρα (Morrow 1990). Υφίσταται κατά το μεταβολισμό β-οξειδωση και αναγωγή και παράγουν δυο μεταβολίτες (το 2,3-δίνωρο-5,6-δίυδρο-15-F_{2t}-IsoP και το 2,3-δίνωρο-15-F_{2t}-IsoP). Τα επίπεδα τους αυξάνονται στο οξειδωτικό στρες (Kadiska 2005).



2.1.2. Μηλονική διαλδεΐδη (MDA)

Είναι ένα από τα αρκετά χαμηλού μοριακού βάρους τελικά προϊόντα, που δημιουργούνται κατά την οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Μπορεί να προέλθει και ενζυμικά κατά το μεταβολισμό των εικοσανοειδών (Marnett 1999Γ) και κατά τη σύνθεση των προσταγλανδινών (Εικόνα 65).

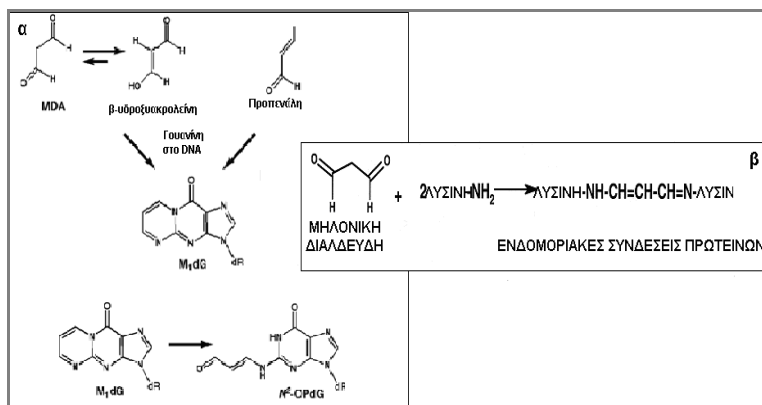


Εικόνα 65: Μετατροπή των ενδοπεροξειδίων των προσταγλανδινών (PGH₂) στο 12-ύδροξυεπταδεκατριονικό οξύ (HHT) και στην MDA.

Η MDA καλείται επίσης δις(διμεθυλική) ακετάλη. Έχει μοριακό τύπο C₇H₁₆O₄ και μοριακό βάρος 164. Το μεγαλύτερο μέρος της MDA δεσμεύεται στις πρωτεΐνες. Αυτό εξηγεί τα πολύ χαμηλά επίπεδα της MDA στο πλάσμα. Υπάρχει σε αρκετές μορφές ανάλογα με το pH. Σε φυσιολογικό pH βρίσκεται με τη μορφή του ενολικού ιόντος που έχει χαμηλή δραστικότητα ενάντια στις περισσότερες αμινομάδες. Καθώς το pH μειώνεται, η δραστικότητα αυξάνεται και η MDA μπορεί να προστεθεί στις πρωτεΐνες, καταλήγοντας στην τροποποίηση αρκετών αμινοξέων και στη δημιουργία νέων σταυροσυνδέσεων μεταξύ των διαφόρων αμινοξέων την πρωτεΐνης (Sevilla 1997).

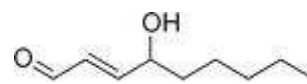
Μια άλλη ιδιότητα που μοιράζεται από αρκετά προϊόντα λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι η επαγωγή διασταυρούμενων συνδέσεων είτε μεταξύ των βάσεων του DNA είτε μεταξύ πρωτεΐνης και DNA. Η αντίδραση της με τις βάσεις του DNA (Εικόνα 66α) δημιουργεί σειρά προθεμάτων όπως είναι η δεοξυαδενοσίνη, η δέοξυκυτιδίνη και η δεοξυγουανοσίνη που δημιουργούν μεταλλάξεις (Cline 2004, Plastaras 2000). Η MDA επίσης αντιδρά με την αμινομάδα της λυσίνης της ιστόνης (Εικόνα 66β) για να δημιουργήσει ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο αντιδρά με την εξωκυκλική αμινομάδα του DNA (Marnett 1999A, Marnett 1999B). Η MDA μεταβολίζεται γρήγορα

στους ιστούς των θηλαστικών, μέσω της δεϋδρογονάσης της αλδεΐδης που οξειδώνει την MDA σε άλας του οξικού οξέος.



Εικόνα 66: α) Δημιουργία M1dG και PdG (ένα συνθετικό ανάλογο της M1dG). Η MDA και το ταυτομέρές του αντιδρούν με τη γουανίνη στο DNA για να δημιουργήσουν τα πυριμιδοπυρίνο σύμπλοκα (M1dG). Όταν η M1dG ταιριάζει σωστά με την κυτοσίνη στο DNA, η M1dG υφίσταται μια μετατροπή στην ακυκλική δομή N2-OPdG, η οποία ως γνωστό είναι υψηλά μεταλαξιγόνος στα βακτήρια και στα κύτταρα των θηλαστικών (Cline 2004). β) Ενδομοριακές συνδέσεις πρωτεϊνών και MDA.

2.1.3. 4-ύδροξυονενάλη (4-HNE)



Η 4-HNE είναι μια από τις ακόρεστες αλδεΐδες που δημιουργούνται κατά την υπεροξειδωση των n-6 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως είναι το λινολεϊκό οξύ και το αραχιδονικό οξύ. Οι επιδράσεις της 4-HNE που παρατηρούνται *in vitro* εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της (Poli 2008).

- Συγκέντρωση 100 μM ή παραπάνω είναι τοξική στα περισσότερα κύτταρα. Σε αυτή τη συγκέντρωση προκαλείται μιτοχονδριακή βλάβη και κυτταρικός θάνατος. Αυτά τα επίπεδα είναι γενικά πιο πάνω από αυτά που μπορούν να υπάρξουν *in vivo*.
- Συγκέντρωση 2 με 20 μM αναστέλλει τη σύνθεση των πρωτεϊνών και του DNA αλλά επάγει τη φωσφολιπάση A₂. Γενικά σε αυτή τη συγκέντρωση αναστέλλεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η επιδιόρθωση των νουκλεοτιδίων.
- Συγκέντρωση 1 μM ή λιγότερο είναι τα φυσιολογικά επίπεδα.

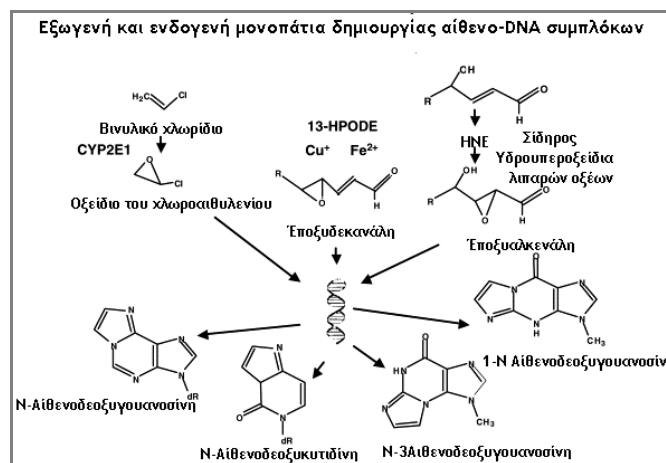
Γενικά η 4-HNE επάγει τη χημειοταξία των φαγοκυττάρων και τη δραστικότητα αρκετών ενζύμων συμπεριλαμβανομένης της αδενυλικής κυκλάσης, της γουανυλικής κυκλάσης, της φωσφολιπάσης C και της πρωτεϊνικής κινάσης C. Επίσης εμπλέκεται στην ινογένεση του ήπατος

με το να αυξάνει τη βιοσύνθεση του κολλαγόνου και τα επίπεδα των φλεγμονωδών κυτταροκινών (Cadenas 1983).

Οι υδροξυαλκενάλες κατέχουν τη χημική δραστηριότητά τους σε τρία κύρια χαρακτηριστικά: στην αλδεϋδική ομάδα, στο διπλό δεσμό και στη υδροξυλική ομάδα. Η ικανότητα τους να αντιδρούν γρήγορα με τις θειολικές ομάδες σε φυσιολογικό pH ευθύνεται για την κυταροτοξικότητά τους (Zarkovic 2003). Όταν η 4-HNE δημιουργείται in vivo αντιδρά γρήγορα με τις πρωτεΐνες και τα άλλα βιομόρια.

Τα κύτταρα καταβολίζουν την 4-HNE με την αναγωγή της σε αλκοόλη από την αλδολική αναγωγή και την οξειδωση της σε καρβοξυλικό οξύ από την αλδεϋδική δεϋδρογονάση (Hartley 1995). Το καρβοξυλικό οξύ δημιουργεί συμπλέγματα με τη γλουταθειόνη τα οποία διασπώνται σε μερκαππουρικό οξύ και εκκρίνονται στα ούρα (Petras 1995).

Τα καρβονυλικά τελικά προϊόντα των λιπιδικών υδροπεροξειδίων, συμπεριλαμβανομένου της MDA, της 4-HNE, της γλυοξάλης, της ακρολεΐνης, της κροτοναλδεϋδης, της 4-όξο-2-αλκενάλης σχηματίζουν σύμπλοκα με το DNA. Διακρίνονται σε 3 κατηγορίες, τα πρόπανο-σύμπλοκα (υδροξυονεννάλης, ακρολεΐνης, κροτοναλδεϋδης), τα MDA σύμπλοκα και τα αίθανο-σύμπλοκα (από μεταβολίτη της 4-HNE μέσω οξειδωτικού μεταβολισμού) (Chung 1996) (Εικόνα 67).



Εικόνα 67: Μονοπάτι δημιουργίας των αιθανοσυμπλόκων στο DNA από εξωγενή (βινυλοχλωριδίο) και ενδογενείς παράγοντες (4-υδροξυονεννάλη). Το 13-υδροπεροξυ-οκταδεκαδιενικό οξύ (13-HPODE), ένα προϊόν λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι ο προαγωγέας της εποξυδεκανάλης που έχει δεχτεί να αντιδρά με τις βάσεις του DNA για να δημιουργήσει τα εξωκυκλικά (αίθινο) σύμπλοκα in vitro (Chung 1996).

2.2. Προϊοντα βλάβης πρωτεϊνών

Η βλάβη στις πρωτεΐνες μπορεί να προκληθεί με άμεση δράση των ελευθέρων ριζών στις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων (Requena 2003) ή με δευτερογενή βλάβη συμπεριλαμβανομένου της επίδρασης των τελικών προϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσης όπως είναι οι ισοκετάλες, η MDA και η 4-HNE (Grune 2000, Dalle-Donne 2003).

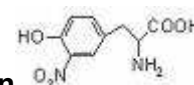
Η αντίδραση αρκετών δραστικών μορφών αζώτου και αλογόνου (ONOO^- , NO_2^- , HOCl , HOBr) με την τυροσίνη (την ελεύθερη και την πρωτεΐνοσυνδεδεμένη) οδηγεί στη δημιουργία της 3-νίτρο, βρώμο και χλώρο τυροσίνης (Ischiropoulos 1992). Η νίτρωση της φαινυλαλαίνης και της τρυπτοφάνης μπορεί επίσης να συμβεί. Οι θειολικές ομάδες οξειδώνονται εύκολα από τις ελεύθερες ρίζες και από τα μεταβατικά μέταλλα δημιουργώντας τις θειυλικές ρίζες, τα δισουλφίδια και περαιτέρω προϊόντα οξειδωσης όπως είναι οι σουλφόνες και τα σουλφονικά οξέα. Η μεθειονίνη οξειδώνεται εύκολα από την υδοξυλοομάδα, το οξυγόνο, το υποχλωριώδες οξύ, τις χλωραμίνες και από το υπεροξινιτρώδες. Η ιστιδίνη, η τρυπτοφάνη, η μεθειονίνη και τα υπολείμματα φαινυλαλαίνης οξειδώνονται αντίστοιχα στην όξο-ιστιδίνη, στο ασπαραγινικό, στις κινιρενίνες, στα σουλφοξειδία μεθειονίνης, στην όρθο και στη μετατυροσίνη. Η οξειδωτική βλάβη σε υπολείμματα ιστιδίνης συχνά οδηγεί σε αδρανοποίηση των ενζύμων που έχουν ιστιδίνη (Fernández-Irigoyen 2005).

Κάποιες βλάβες των πρωτεϊνών είναι αντιστρεπτές όπως η δημιουργία των σουλφοξειδίων της μεθειονίνης, η γλουταθειοποίηση και πιθανόν η νίτρωση. Η οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε δευτερογενή βλάβη σε άλλα βιομόρια και να ενεργοποιήσει νουκλεάσες (Lushchak 2007). Οξειδωτική βλάβη στα ένζυμα που επιδιορθώνουν το DNA αυξάνει τη συχνότητα των μεταλλάξεων ενώ βλάβη στην πολυμεράση του DNA μειώνει την πιστότητα της αντιγραφής. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες μπορούν να αναγνωριστούν ως ξένες από το ανοσολογικό σύστημα, να ενεργοποιήσουν τη δημιουργία αντισωμάτων και να προκαλέσουν αυτοανοσία (Wang 2007).

Το κύτταρο όμως έχει μηχανισμούς προστασίας από τις οξειδωμένες πρωτεΐνες. Όταν μια πρωτεΐνη οξειδώνεται μαρκάρεται με πρωτεολυτική απομάκρυνση. Αυτό είναι σημαντικό επειδή η

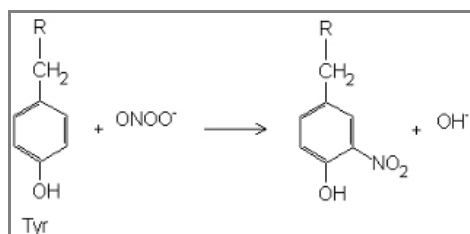
συσσώρευση των πρωτεϊνών με μη σωστό συνδυασμό μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο, ειδικά εάν αυτό συμβαίνει στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Σε αντίθεση οι βαριά οξειδωμένες πρωτεΐνες αντιστέκονται στην πρωτεολυτική επίθεση και δημιουργούν συσσωματώματα μια διαδικασία που μειώνει την τοξικότητα τους με το να τις μετατρέπει σε αδιάλυτα συσσωματώματα.

Υπάρχουν αρκετοί τρόποι για να καταστραφούν οι τροποποιημένες πρωτεΐνες. Ένας τρόπος είναι να πάνε στα λυσοσώματα όπου περιέχονται υδρολυτικά ένζυμα οι καθεψίνες. Τα λυσοσώματα αποσυνθέτουν τις πρωτεΐνες που παίρνει το κύτταρο με την ενδοκύτωση.



2.2.1. 3-Νιτροτυροσίνη

Η 3-νιτροτυροσίνη δημιουργείται στους οργανισμούς με νίτρωση των υπολειμμάτων τυροσίνης μέσω της δράσης του υπεροξυνιτρώδους (Εικόνα 68). Είναι ο πιο σημαντικός βιοδείκτης βλάβης των πρωτεϊνών (Schewemmer 2000). Η συγκέντρωση της 3-νιτροτυροσίνης στα ούρα είναι 1,6-33,2 nM (Tsikas 2005) και στο πλάσμα της τάξης του 1-4 nM (Schwedhelm 1999).



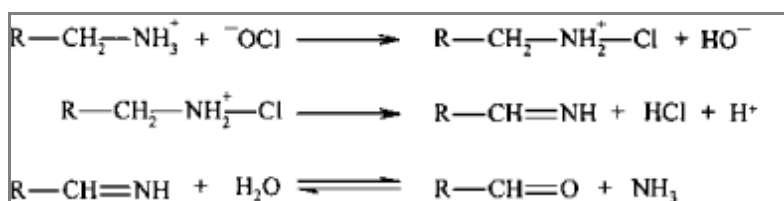
Εικόνα 68: Δημιουργία 3-νιτροτυροσίνης.

Η παρουσία της 3-νιτροτυροσίνης στις πρωτεΐνες μεταβάλλει την ενζυμική δραστηριότητα και τη λειτουργία τους. Παραδείγματα ενζύμων που επηρεάζονται είναι τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, η επιφανειοδραστική πρωτεΐνη A (Van der liet 1994, MacMillan-Crow 1998). Γενικά η 3-νιτροτυροσίνη εμπλέκεται σε αρκετές διεργασίες, σε πολλές φλεγμονώδεις καταστάσεις, σε νευροεκφυλιστικά νοσήματα και στις κακοήθειες νεοπλασίες (Goto 1999, Singer 1996, Tohgi 1999). Υπάρχουν όμως και μελέτες που δείχνουν ότι η συγκέντρωση της 3-νιτροτυροσίνης δεν μεταβάλλεται με την ασθένεια (Evans 1996). Η 3-νιτροτυροσίνη μπορεί να είναι τοξική με το να υφίσταται οξειδοαναγωγική ανακύκλωση και με το

να παρεμβαίνει σε σηματοδοτικά μονοπάτια ή με το να ενσωματώνεται στην τουμπουλίνη και να καταστρέφει τον κυτταροσκελετό. Νιτροσυλιωμένες πρωτεΐνες μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα (αυτοανοσία) (Ohmori 2005).

2.2.2. Πρωτεϊνικά καρβονύλια R—CH=O

Ένα άλλο προϊόν βλάβης των πρωτεϊνών είναι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (Εικόνα 69). Τα καρβονύλια μπορούν να προέλθουν ως αποτέλεσμα της γλυκοσυλίωσης, από σύνδεση των αλδεϋδών (συμπεριλαμβάνοντας αρκετές από αυτές που προέρχονται από τη λιπιδική υπεροξειδωση) στις πρωτεΐνες καθώς επίσης και με την απευθείας οξειδωση των αμινοξέων από ελεύθερες ρίζες. Οι παραπάνω αντιδράσεις δημιουργούν προϊόντα όπως είναι ο εστέρας του γλουταμινικού οξέος και οι αμινοαδιπτικές ημιαλδεΐδες (Dalle-Donne 2003).

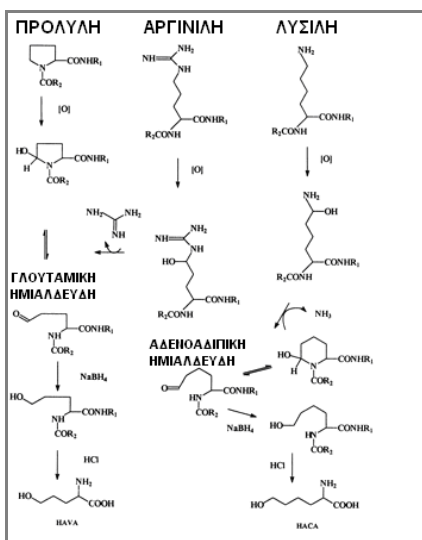


Εικόνα 69: Δημιουργία πρωτεϊνικών καρβονυλίων από τις χλωραμίνες. Τα υπολείμματα τυροσίνης είναι οι κύριοι στόχοι για το υποχλωριώδες οξύ με την αντίδραση να δίνει σταθερές χλωραμίνες (N—Cl) μέσω πυρηνόφιλης προσθήκης (Visors 1991).

Η πλειοψηφία των καρβονυλικών ομάδων στις πρωτεΐνες είναι γλουταμικές και σε ένα χαμηλότερο βαθμό είναι αμινοαδιπτικές ημιαλδεΐδες (Εικόνα 70). Στις πρωτεΐνες του ήπατος τα δυο αλδεϋδικά προϊόντα συνιστούν γύρω το 60% των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Η εναπομείναντα αναλογία των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο δείγμα αποτελείται από προϊόν ή από προϊόντα της οξειδωσης των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων όπως είναι η αργινίνη, η προλίνη και η λυσίνη. Στην περίπτωση των ηπατικών πρωτεϊνών αναμένουμε τη συνεισφορά από σύμπλοκα που περιέχουν καρβονύλια και δημιουργούνται κατά την αντίδραση των πρωτεϊνών με τα σάκχαρα (γλυκοσυλίωση) και τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης όπως είναι η 4-HNE και η MDA (Requena 2001).

Ο πιο σημαντικός όμως μηχανισμός της οξειδωτικής βλάβης στις πρωτεΐνες είναι η καταλυόμενη οξειδωση μέσω μετάλων (Dubinina 2001, Shiraishi 2005, Stefek 1999). Αυτή η

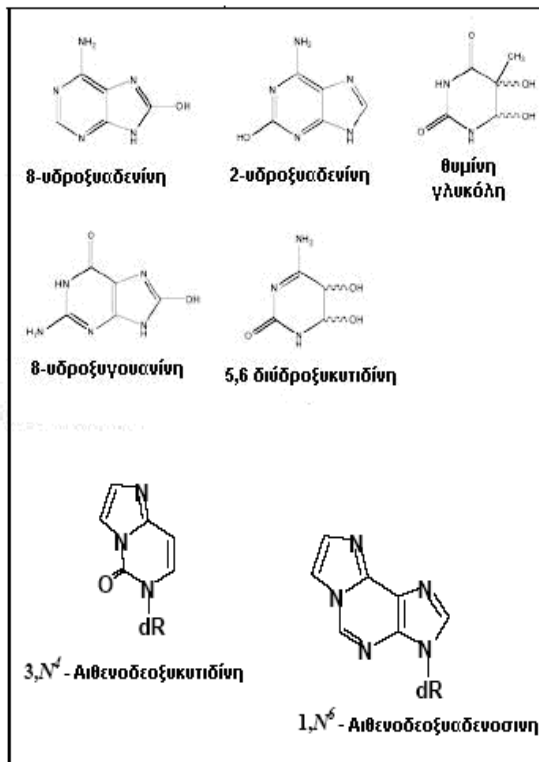
διεργασία εμπριέχει τη δημιουργία του H₂O₂ και την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου και του δισθενούς χαλκού από κατάλληλους δότες ηλεκτρονίων όπως το NADH, το NADPH, το ασκορβικό οξύ, οι μερκαπτάνες κ.α. Τα ιόντα του δισθενή σιδήρου και του μονοσθενούς χαλκού συνδέονται σε ειδικές θέσεις δέσμμευσης μεττάλων στις πρωτείνες και αντιδρούν με το υπεροξειδίο του υδρογόνου για να δημιουργήσουν την υδροξυλική ρίζα. Αυτήν η υψηλά δραστική ελεύθερη ρίζα προσβάλλει τα γειτονικά υπολείμματα των αμινοξέων, ορισμένα από τα οποία μετατρέπονται στα παράγωγα που περιέχουν καρβονύλια (Requena 2001).



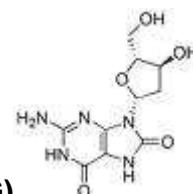
Εικόνα 70: Σχήμα αντίδρασης της δημιουργίας των γλουταμινικών και αμινοαδιπικών ημιαλδευδών. Τα κύρια προϊόντα της καταλύμενης οξειδωσης μέσω μεττάλων της πολυαργινίνης και της πολυπρολίνης (γλουταμικής ημιαλδευδής) και της πολυλυσίνης (αμινοαδιπικής ημιαλδευδής).

2.3. Προϊόντα οξειδωτικής βλάβης του DNA

Οι ελεύθερες ρίζες αλληλεπιδρούν απευθείας με το γενωμικό DNA, καταστρέφοντας ανάμεσα στα άλλα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και της διαφοροποίησης ή αυξάνουν τη δραστικότητα των καρκινογόνων ξενοβιοτικών. Όλα τα δομικά συστατικά που δομούν το DNA μπορούν να οξειδωθούν, παράγοντας τροποποιήσεις στη δεσοξυριβόζη (Εικόνα 71). Από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου, οι πιο δραστικές είναι οι υδροξυλικές ρίζες (Breen 1995). Η υδροξυλική ρίζα έχει δειχθεί να είναι υπεύθυνη για πολλές τροποποιήσεις που συμπεριλαμβάνουν την 5-υδροξυμεθυλική ουρακίλη (5-OHMU) και την 8-υδροξυδεοξυγουανοσίνη (8-OHdG). Οι δυο κύριες μορφές της οξειδωτικής βλάβης στο DNA είναι η 8-OHdG και η δημιουργία των διακένων στους δύο κλώνους (Shen 2000).



Εικόνα 71: Αλληλεπίδραση της υδροξυλικής ρίζας με την πουρίνη και τις βάσεις πυριμιδίνης μπορούν να δώσουν γένεση σε πολλαπλά προϊόντα. Η αδενίνη και η γουανίνη μπορούν να αντιδράσουν με τις υδροξυλικές ρίζες στην 4,5 και 8 θέση των ατόμων άνθρακα στον πυριμιδινικό δακτύλιο. Η θυμίνη μπορεί να υποστεί την προσθήκη υδροξυλικών ριζών στη θέση 4 και 5 των ατόμων άνθρακα για να δώσει τις αντίστοιχες ρίζες, που σε αντίδραση με το οξυγόνο δίνει τα υπεροξειδία. Η αναγωγική αποκοπή των τελευταίων υπεροξειδίων μπορεί να δημιουργήσει της *cis*- και *trans*-θυμίνη της γλυκόλης. Η θυμίνη μπορεί να υποστεί αφαίρεση υδρογόνου από τη μεθυλενική ομάδα για να δώσει τις αντίστοιχες ελεύθερες ρίζες, που σε αντίδραση με το οξυγόνο ακολουθούν την αναγωγική αποκοπή που δίνει τις αντίστοιχες αλκοόλες. Η κυτοσίνη παρόμοια δίνει γένεση σε αρκετά προϊόντα συμπεριλαμβανομένου την κυτοσίνη της γλυκόλης και την 5,6-διυδροξυκυτοσίνη. Έτσι, υπάρχουν πάνω από 20 διαφορετικά προϊόντα οξείδωσης του DNA που έχουν χαρακτηριστεί (Gajewski 1990).



2.3.1. 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG)

Η 8-OHdG είναι ο πρωταρχικός σταθερός βιοδείκτης της βλάβης του DNA από τις ρίζες υδροξυλίου, λόγω της υψηλής ιδιαιτερότητας του, της πιθανής μεταλαξιγόνου δράσης και της σχετικής αφθονίας του στο DNA (Floyd 1990). Η έκκριση της στα ούρα παρέχει μια εκτίμηση της συνολικής οξειδωτικής βλάβης στο DNA (Sperati 1999) και είναι ο καλύτερος δείκτης στα ούρα που υπάρχει μέχρι στιγμής (Ravanat 1999). Η συγκέντρωση της στα ούρα είναι 5-26 ng/ml (Shigenaga 1991).

Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA, η 8-OHdG αντί να ενωθεί με κυτοσίνη ενώνεται με την αδενίνη και προκαλεί μεταλλάξεις GC→TA που οδηγούν σε μεταλαξιγένεση και καρκινογένεση. Σε διάφορα πειράματα έχει δείχτεί ότι η 8-OHdG προκαλεί απόπτωση μέσω αρνητικής ρύθμισης του bcl-2 (μιας αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης) και ενεργοποίησης της κασπάσης 8. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο

κυτταρόπλασμα που με τη σειρά του ενεργοποιεί την κασπάση 9 και μετά την κασπάση 3 (Hyun 2003).

Όμως τα επιδιορθωτικά ένζυμα μπορούν να μετακινήσουν τις βάσεις του DNA που έχουν μεταλλαχθεί και να διατηρήσουν τη γενετική σταθερότητα. Υπάρχουν 3 επιδιορθωτικά ένζυμα: Η 1-γλυκοσυλάση της 8-οξογουανίνης που έχει δράση γλυκοσυλάσης και δράση λυάσης. Η ομόλογη με την *Escherichia coli* γλυκοσυλάση, η οποία αφαιρεί τις λάθος συνδέσεις της αδενίνης. Η ομόλογη με την *Escherichia coli* dGTPάση υδρολύει την τριφωσφορική δεοξυγουανοσίνη σε μονοφωσφορική δεοξυγουανοσίνη και έτσι δεν μπορεί να ενσωματωθεί στο DNA. Το γεγονός ότι υπάρχουν 3 ειδικά ένζυμα να ασχολούνται με μια τροποποιημένη βάση δείχνει πόσο σημαντική είναι η απομάκρυνση της από το γενετικό υλικό (Shibutani 1991).

Εκτός από το μηχανισμό εποδιόρθωσης βάσεων υπάρχει και ο μηχανισμός επιδιόρθωσης νουκλεοτιδίων που χρησιμοποιεί τη γλυκοσυλάση. Η τελευταία αποκόβει την κατεστραμμένη βάση και η απουρινική ή απυρινιδική βάση που απομένει επεξεργάζεται και το κενό συμπληρώνεται με τα φυσιολογικά νουκλεοτίδια (Shibutani 1991).

3. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Κατά την πορεία της φυλογενετικής εξέλιξης, οι οργανισμοί διάλεξαν βιομόρια που να αντέχουν στις οξειδώσεις και έτσι υπάρχουν δομές πρωτεϊνών που αντέχουν στην οξειδωτική πρωτεόλυση με την κατάλληλη αναδίπλωση της δομής τους (Dukan 2000). Τα κύτταρα και οι ιστοί προσπαθούν να βρίσκονται τον περισσότερο χρόνο σε οξειδοαναγωγική ομοιόσταση και αυτό επιτυγχάνεται με προσωρινή μετατόπιση ή αύξηση της ενδοκυτταρικής κατάστασης μεθειλοδισουλφίδο ενώσεις (Slund 1999). Η οξειδοαναγωγική ομοιόσταση επιτυγχάνεται όταν οι ελεύθερες ρίζες ενεργοποιούν καταρράκτη ευαίσθητων μηνυμάτων που μέσω της γονιδιακής έκφρασης αυξάνουν την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων (Limaye 2003).

Οι ενδογενείς πηγές ΔΜΟ/ΔΜΑ αντιμετωπίζονται με τους ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και τις μικρού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικές ουσίες (κυρίως στο πλάσμα του αίματος). Ο τρόπος με τον οποίο λειτουργούν οι ενζυμικοί και μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες είναι αρκετά διαφορετικός και σε πολλές περιπτώσεις εξειδικευμένος, εξαρτώμενος από το βιολογικό περιβάλλον. Η κατάταξη των αντιοξειδωτικών, η δράση τους και οι μηχανισμοί εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών είναι ακόμη υπό μελέτη, ενώ υπάρχουν και επιστημονικές διαφοροποιήσεις ως προς το ρόλο τους. Η δράση των αντιοξειδωτικών ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών ουσιών διακρίνεται στις παρακάτω κατηγορίες (Halliwell 1996A, Halliwell 1992, Halliwell 1990).

- 1.Καταλυτική απομάκρυνση ΔΜΟ/ΔΜΑ από ενδοκυττάρια περιοχές. Αυτό γίνεται με τη βοήθεια αντιοξειδωτικών ενζύμων.
- 2.Πρωτεϊνικής φύσης δέσμευση δραστικών μεταλλικών ιόντων (ιδιαίτερα σίδηρος, χαλκός) για τον περιορισμό προ-οξειδωτικών μηχανισμών και παραγωγή ελευθέρων ριζών (παραδείγματα τρανσφερίνες, αιμοσφαιρίνες, αιμοπηξίνη, μεταλλοθειονίνες, σεουροπλασμίνη ή χαλκοπλασμίνη).
- 3.Εκκαθάριση ή εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών μέσω αντιοξειδωτικών μηχανισμών και μείωση των οξειδωτικών βλαβών σε βιομόρια.

4. Αποσύνθεση υπεροξειδίων και άλλων δραστικών μορίων ώστε να περιορισθούν οι οξειδωτικές δράσεις και μείωση των συγκεντρώσεων οξυγόνου.

3.1 Ορισμός και χαρακτηριστικά

Αντιοξειδωτικό είναι κάθε ουσία που όταν είναι παρόν σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με τα οξειδωμένα υποστρώματα καθυστερεί σημαντικά ή παρεμποδίζει την οξείδωση του υποστρώματος. Ο όρος οξειδωμένο υπόστρωμα εμπερικλείει οτιδήποτε (εκτός νερού) που βρίσκεται στα τρόφιμα και στους ζωντανούς ιστούς (πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και DNA). Τα αντιοξειδωτικά πρέπει να μπορούν να εξαλείφουν δραστικά το οξειδωτικό αλλά η ρίζα του αντιοξειδωτικού πρέπει να είναι αβλαβής. Τα αντιοξειδωτικά βρίσκονται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο ενδοκυττάριο υγρό από ότι στο εξωκυττάριο (Halliwell 1990, Halliwell and Gutteridge 1990). Οι ουσίες που οξειδώνονται πιο εύκολα μπορούν να λειτουργήσουν καλύτερα ως αντιοξειδωτικά.

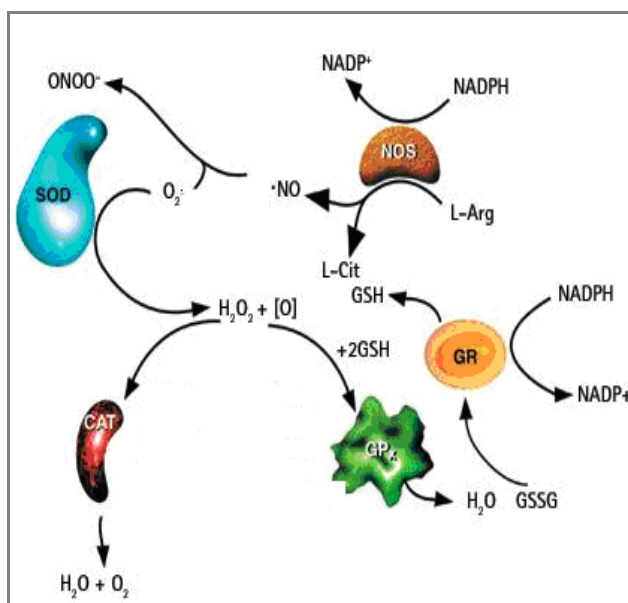
Για να εκτιμήσουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα των ουσιών πρέπει να λάβουμε υπόψη τους ρυθμούς σταθεράς με τις διάφορες ελεύθερες ρίζες (Halliwell 1990). Για να εκτιμηθεί το αντιοξειδωτικό δυναμικό ενός αντιοξειδωτικού πρέπει να λάβουμε υπόψη τη σταθερότητα των ριζών που παράγονται από τα αντιοξειδωτικά και τη στοιχειομετρία τους. Τα αντιοξειδωτικά ελαχιστοποιούν την οξειδωτική βλάβη στα βιολογικά συστήματα είτε μέσω παρεμπόδισης της δημιουργίας ελευθέρων ριζών είτε μέσω αναχαίτισης των ΔΜΟ πριν αντιδράσουν με άλλα βιομόρια. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να είναι είτε ενδογενή συστατικά που παράγονται από οργανισμούς ως μέρος την άμυνας έναντι των ελευθέρων ριζών, είτε εξωγενή συστατικά που προέρχονται από τη διατροφή. Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν ενζυμικούς και μη ενζυμικούς παράγοντες. Τα εξωγενή αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνουν διαιτητικά αντιοξειδωτικά και μικρά μόρια (Halliwell 1996A).

3.2. Ενζυμικοί παράγοντες

Η πρώτη γραμμή άμυνας είναι τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Άμεση αντιοξειδωτική δράση παρέχουν τα παρακάτω ένζυμα (Πίνακας 18, Εικόνα 72).

Πίνακας 18: Τα είδη των αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Ένζυμο	Αντίδραση που καταλύει
Υπεροξειδική δισμουτάση	$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Καταλάση	$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	$2 GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$



Εικόνα 72: Η υπεροξειδική ρίζα που παράγεται από τις μεταβολικές διεργασίες μετατρέπεται με τη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και οξυγόνο. Η υπεροξειδική ρίζα αντιδρά επίσης με το μονοξειδίο του αζώτου (NO) και μετατρέπεται στο υπεροξυνιτρώδες. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου διασπάται με τη δράση της καταλάσης (CAT) και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) προς νερό και οξυγόνο. Η GPx διασπά επίσης, τα λιπιδικά υπεροξειδία προς νερό και οξυγόνο. Για να δράσει χρησιμοποιεί ως δότη ηλεκτρονίων την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) που μετατρέπεται στην οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Η τελευταία αναγεννιέται προς την ανηγμένη γλουταθειόνη με τη δράση της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR).

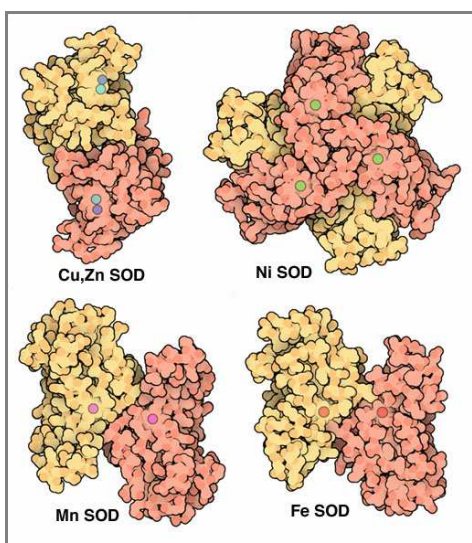
Έμμεση αντιοξειδωτική δράση διαμεσολαβείται από τα ένζυμα που αποκαθιστούν τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών, για παράδειγμα τα επίπεδα της γλουταθειόνης αντικαθίσταται από την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.

3.2.1 Υπεροξειδική δισμουτάση

Όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (SOD). Το ένζυμο αυτό ενισχύει κατά 10.000 φορές την αντίδραση μετατροπής της υπεροξειδικής ρίζας σε H_2O_2 διαβεβαιώνοντας ότι στην πραγματικότητα δεν θα υπάρχει καθόλου υπεροξειδική ρίζα στο κύτταρο. Είναι το μοναδικό γνωστό αντιοξειδωτικό που παράγει χρήσιμη μεταβολική ενέργεια ενώ αδρανοποιεί την υπεροξειδική ρίζα (παραγωγή ATP) και δεν παράγει τοξικά προϊόντα. Όλα τα άλλα αντιοξειδωτικά με εξαίρεση την καταλάση ή καταναλώνουν ενέργεια για την αναγέννηση τους ή παράγουν τοξικά προϊόντα (Fridovich 1995). Η υπεροξειδική ρίζα ανάγει το κυτόχρωμα c και αναγεννάται από το φυσικό αποδέκτη ηλεκτρονίων του (την οξειδάση του κυτοχρώματος c).

Η υπερβολική ή ανεξέλεγκτη παραγωγή του υπεροξειδικού ιόντος σίγουρα επιφέρει το οξειδωτικό στρες στους οργανισμούς αλλά η σημαντικότερη πλευρά της κυτταροτοξικότητάς του οφείλεται στην παραγωγή δευτερογενών ριζών (π.χ η υδροξυλική ρίζα). Η υπεροξειδική δισμουτάση έχει βρεθεί σε αρκετά κύτταρα θηλαστικών. Όμως σε αρκετές ασθένειες, η δραστηριότητα της μπορεί να είναι μειωμένη λόγω της μειωμένης σύνθεσης της ή λόγω αναστολής της δραστηριότητάς της. Η υψηλότερη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης βρίσκεται στα ερυθροκύτταρα. Αυτά τα επίπεδα μπορούν να είναι φυσιολογικά αν σε κάποιο άλλο ιστό είναι μειωμένα λόγω αναστολής.

Υπάρχουν τεσσάρων ειδών υπεροξειδικές δισμουτάσες, η υπεροξειδική δισμουτάση χαλκού-ψευδαργύρου, μαγγανίου, νικελίου και σιδήρου (Fridovich 1995), (Εικόνα 73).

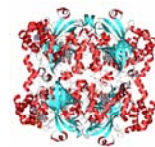


Εικόνα 73: Τεταρτοταγής δομή των διαφόρων μορφών της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Η υπεροξειδική δισμουτάση χαλκού-ψευδαργύρου είναι ένζυμο αρκετά σταθερό, ανθεκτικό στη θερμοκρασία, στις πρωτεάσες και στη μετουσίωση από διάφορες ουσίες. Οι δισμουτάσες χαλκού-ψευδαργύρου βρίσκονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα ιδιαίτερα στο κυτοσόλιο, στα λυσοσώματα, στον πυρήνα και στο διάστημα μεταξύ των μεμβρανών των μιτοχονδρίων (Okado-Matsumoto 2001). Έχουν σχετικές μάζες των 32.000 D και περιέχουν 2 υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες έχει μια ενεργό θέση με ένα ιόν χαλκού και ένα ιόν ψευδαργύρου. Όλες οι δισμουτάσες καταλύουν την ίδια αντίδραση που η ταχύτητα της εξαρτάται από το pH. Τα ιόντα χαλκού κατά την αντίδραση δείχνουν ότι υπόκεινται σε εναλλασσόμενη οξειδωση και αναγωγή, ενώ το ιόν ψευδαργύρου βοηθάει στη σταθερότητα του ενζύμου, χωρίς να εκθέτει κάποια καταλυτική δράση (Bertini 1998).

Η υπεροξειδική δισμουτάση μαγγανίου έχει παρόμοια δραστηριότητα με την υπεροξειδική δισμουτάση χαλκού-ψευδαργύρου, αλλά διαφέρει ως προς την ακολουθία των αμινοξέων και έχει τετραμερή ή διμερή δομή. Στους ζωικούς ιστούς και στους ζυμομύκητες βρίσκεται στα μιτοχόνδρια. Όμως όταν το κύτταρο έχει έλλειψη της υπεροξειδικής δισμουτάσης χαλκού-ψευδαργύρου, αυτό το ένζυμο βρίσκεται και στο κυτοσόλιο. Είναι λιγότερο ανθεκτικό από την υπεροξειδική δισμουτάση χαλκού-ψευδαργύρου, στο pH και στη θερμοκρασία. Η σύνθεση της επάγεται από τις ελεύθερες ρίζες (Suzuki 1993, Wong 1988). Πειράματα με διαγονιδιακά ζώα, στα οποία έχουν απομακρυνθεί τα γονίδια που κωδικοποιούν την υπεροξειδική δισμουτάση του μαγγανίου δείχνουν ότι η έλλειψη του ενζύμου δημιουργεί καρδιακά προβλήματα και υπέρσυσσώρευση λίπους στο ήπαρ (Lebovitz 1996).

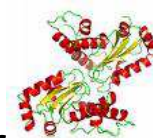
Η υπεροξειδική δισμουτάση σιδήρου βρίσκεται στα βακτήρια, στους μύκητες και στα ανώτερα φυτά (Pennington 1986).



3.2.2 Καταλάση

Η καταλάση των ζώων περιέχει 4 υπομονάδες καθεμία από τις οποίες έχει ένα σίδηρο στο ενεργό της κέντρο. Κάθε πρωτεϊνική υπομονάδα έχει και ένα μόριο NADPH. Ο ρόλος της είναι να διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο (Yasmineh 1993). Η καταλάση κατά την αποθήκευση και κατά την εκθεσή της σε αλκαλικό ή όξινο περιβάλλον αποσυναρμολογείται στις υπομονάδες της και αδρανοποιείται. Αναστέλλεται από την αζίδη, την κυανιδίνη, το υπεροξυνιτρώδες και από το υποχλωριώδες οξύ. Ο πιο σημαντικός όμως αναστολέας της είναι η αμινοτριαζόλη (Kirkman 1987). Η καταλάση επίσης καταλύει την οξειδωση της μεθανόλης και της αιθανόλης στις αντίστοιχες αλδεΐδες (φορμαλδεΐδη, μεθανάλη, ακεταλδεΐδη και αιθανάλη).

Η καταλάση στα κύτταρα των ζώων βρίσκεται στα υπεροξυσώματα και στο κυτταρόπλασμα των ερυθροκυττάρων. Τα υπεροξυσώματα έχουν αρκετά ένζυμα που δημιουργούν υπεροξειδίο του υδρογόνου όπως είναι η γλυκολική οξειδάση και η οξειδάση του ουρικού. Τα μιτοχόνδρια αντίθετα περιέχουν λίγη καταλάση. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την καταλάση βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 και μετάλλαξη σε αυτό συμβάλλει στην “ακαταλασαιμία” (Góth 2004). Η έλλειψη καταλάσης δεν επιδρά αρνητικά στο κύτταρο γιατί για την αποσύνθεση του H_2O_2 , χρησιμοποιούνται και άλλα 2 ένζυμα: η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η υπεροξειδάση των λευκοκυττάρων (Gutteridge 1996).



3.2.3.Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης δρα όταν βρίσκεται σε αφθονία ένα μικρό αντιοξειδωτικό μόριο η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) (Vranova 2002). Καταλύει την αναγωγή των λιπιδικών υδροπεροξειδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες τους και αντιδρά με το H_2O_2 , τα υπεροξειδία της χοληστερόλης (Maiorino 1991) και με το υπεροξειδίο της θυμίνης (Bao 1997). Βρίσκεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου, στο διαμεμβρανικό χώρο και σε αρκετά κυτταρικά τμήματα. Η δραστηριότητά της είναι υψηλή στο ήπαρ, στα νεφρά και στα μιτοχόνδρια της καρδιάς. Από μελέτες

σε διαγονιδιακά ποντίκια δείχθηκε πως το ένζυμο εμπλέκεται περισσότερο στην προστασία των ιστών και των μιτοχονδρίων έναντι στο οξύ οξειδωτικό στρες που επάγεται από ξενοβιοτικά παρά στην κύρια προστασία έναντι στις χαμηλού επιπέδου ενδογενείς ΔΜΟ (Kozhemiakin 1993).

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης περιέχει την καταλυτική τριάδα που αποτελείται από τη σεληνοκουστεΐνη, τη γλουταμίνη και την τρυπτοφάνη. Η σεληνοομάδα της σεληνοκουστεΐνης ενεργοποιείται από τη δέσμευση του υδρογόνου και αντιδρά με το H_2O_2 ή άλλα διαλυτά υδροϋπεροξειδία. Τα ενδιάμεσα των ελευθέρων ριζών δεν εμπλέκονται στην κατάλυση (Flohe 1978). Υπάρχει η φωσφολιπιδική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (PHGPx), η κυτταροπλασματική (cGPx), η πλασματική (pGPx) και η γαστρεντερική (GI-GPx). Η κάθε υπεροξειδάση κωδικοποιείται από ξεχωριστό γονίδιο. Τυπικές θέσεις έκφρασης της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης του πλάσματος είναι τα νεφρά, η επιδιδυμίδα, ο πλακούντας και το σώμα των φακών. Η ειδικότητα της πλασματικής υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης είναι παρόμοια με της κυτταροπλασματικής με τη διαφορά ότι η πλασματική επιπλέον ανάγει τα υδροϋπεροξειδία. Μια δομική σύγκριση των υπεροξειδασών μεταξύ τους δείχνει μια λιγότερο ισχυρή σύνδεση της γλουταθειόνης στην πλασματική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Aumann 1997). Εναλλακτικά υποστρώματα της είναι η θυορεδοξίνη και η γλουταρεδοξίνη. Η γαστρεντερική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι η λιγότερο καλά χαρακτηρισμένη. Εκθέτει παρόμοια ειδικότητα υποστρωμάτων. Ανιχνεύεται στα επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα αλλά ανιχνεύεται και στο ήπαρ. Στο έντερο επικρατεί στο τυφλό (Chu 1993).

Η φωσφολιπιδική υπεροξειδάση βρίσκεται στη λιπιδική διπλοστοιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών και αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στη λιπιδική υπεροξειδωση των μεμβρανών. Είναι η μοναδική που ανάγει όλα τα είδη υδροϋπεροξειδίων (από το H_2O_2 μέχρι το υδροϋπεροξειδίο της φωσφατιδυλοχολίνης) και των υδροϋπεροξειδίων των εστέρων της χοληστερόλης στις λιποπρωτεΐνες. Δρα συνεργιστικά με τη βιταμίνη Ε που αντιδρά με τις αλκυλικές ρίζες και τις μετατρέπει σε αλκυλικά υδροϋπεροξειδία (υπόστρωμα της υπεροξειδάσης) (Ursini 1987). Αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF-κΒ από την ιντερλευκίνη-1 (Brigelius-Flohe 2003). Το ένζυμο επάγεται στους καπνιστές, στις φλεγμονές και στην έκθεση στους χημικούς επιμολυντές και γενικά σε όλες τις καταστάσεις του χρόνιου οξειδωτικού στρες (Fernando 1992).

3.3. Μη ενζυμικοί παράγοντες

Τα φυσικά μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά διακρίνονται στα υδροφιλικά που είναι η γλουταθειόνη, το ασκορβικό οξύ, τα φλαβονοειδή, η χολερυθρίνη και στα λιποφιλικά. Τα τελευταία συμπεριλαμβάνουν τα καροτενοειδή, την α-τοκοφερόλη, τα φλαβονοειδή και την ουβικινόλη-10.

Οι ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενδοκυτταρικά από ότι εξωκυτταρικά (Mates 2000). Στα εξωκυτταρικά υγρά δεν υπάρχει σχεδόν καθόλου καταλάση, εκτός από διαρροές από τα κύτταρα, ενώ οι δραστηριότητες της υπεροξειδικής δισμουτάσης, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της ανηγμένης γλουταθειόνης είναι εξαιρετικά χαμηλές. Αντίθετα στα εξωκυττάρια υγρά υπάρχουν διαφορετικής δομής και δράσης υπεροξειδικές δισμουτάσες (χαλκού-ψευδαργύρου και μαγγανίου) με σχετικά υψηλότερο μοριακό βάρος που ορισμένες φορές είναι δεσμευμένες στην ηπαρίνη. Στα εξωκυτταρικά υγρά, την αντιοξειδωτική δράση αναλαμβάνουν μικρού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικές ουσίες. Τέτοιες ουσίες είναι οι τοκοφερόλες (βιταμίνη Ε), η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C και το ουρικό ανιόν στο πλάσμα του αίματος, η αλβουμίνη, η τρανσφερίνη, η φερριτίνη, η λακτοφερίνη, η σερουροπλασμίνη, η χολερυθρίνη και άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες (Halliwell and Gutteridge 1990).

Η διαφορά αντιοξειδωτικών μηχανισμών των ενζυμικών και μη ενζυμικών ουσιών στο ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό περιβάλλον των βιολογικών οργανισμών είναι δύσκολο να εξηγηθεί. Η διαφορά πρέπει να αναζητηθεί στο διπλό ρόλο της ρίζας του υπεροξειδικού ανιόντος, του NO και του H₂O₂. Το ανιόν του υπεροξειδικού ανιόντος βοηθάει στην προσέλευση των φαγοκυττάρων σε περιοχές φλεγμονής ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου διευκολύνουν διάφορους φυσιολογικούς μηχανισμούς, όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την προσκόλληση των φαγοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο. Η παρουσία των αντιοξειδωτικών ουσιών σε μέτριες συγκεντρώσεις επιτρέπει από τη μια μεριά να λειτουργήσουν δημιουργικά οι παραπάνω ρίζες και οι δραστικές μορφές οξυγόνου, ενώ από την άλλη είναι ικανές να περιορίσουν το σχηματισμό των βλαβερών ριζών υδροξυλίου και το τοξικό υπεροξινιτρώδες ανιόν. Σε περιπτώσεις εξωτερικής εισβολής ξеноβιοτικών ουσιών,

δημιουργίας φλεγμονών, τραυμάτων και γήρανσης του βιολογικού οργανισμού, οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δεν επαρκούν με αποτέλεσμα να απαιτείται επαύξηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων ή μεγαλύτερη ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών λειτουργιών. Επίσης, η αντιοξειδωτική δραστικότητα στον ανθρώπινο οργανισμό μπορεί να ενισχυθεί με πρόσθετες λήψεις αντιοξειδωτικών ουσιών μέσω της διατροφής (Halliwell 1999, Halliwell 1992, Halliwell 1996A).

3.3.1. Πρωτεΐνες δέσμευσης μεταλλικών ιόντων

Η αντιοξειδωτική προστασία σε βιολογικούς οργανισμούς δεν επιτυγχάνεται μόνο με ενζυμικές και μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες αλλά και με τον περιορισμό βιοχημικών μηχανισμών με μεταλλικά ιόντα που δημιουργούν τις οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες. Μέταλλα και ενώσεις τους, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός παίζουν σημαντικό ρόλο στο ανθρώπινο σώμα για τη βιοσύνθεση μεγάλου αριθμού ενζύμων και πρωτεϊνών που παίρνουν μέρος στο αναπνευστικό σύστημα, στη μεταφορά οξυγόνου και στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις.

Τα μέταλλα είτε είναι ελεύθερα, είτε δεσμευμένα μπορούν να αποβούν επικίνδυνα όταν αντιδράσουν με το H_2O_2 , τη ρίζα του υπεροξειδικού ανιόντος και άλλες ουσίες λόγω της παραγωγής οξυγονούχων ελευθέρων ριζών. Ο σίδηρος είναι το πιο άφθονο μέταλλο στον ανθρώπινο οργανισμό όπου το 2/3 της ποσότητας του σιδήρου είναι συμπλοκοποιημένα στην αιμοσφαιρίνη, ενώ καθημερινά ο άνθρωπος απορροφά περίπου 1mg από τη διατροφή του και εκκρίνει παρόμοια ποσότητα, ώστε να υπάρχει ισορροπία σιδήρου. Το μεγαλύτερο ποσοστό του σιδήρου στα τρόφιμα είναι κυρίως με τη μορφή του τρισθενούς σιδήρου, τη σταθερή οξειδωμένη μορφή. Η κύρια απορρόφηση του σιδήρου γίνεται στο δωδεκαδάκτυλο υπό τη δισθενή μορφή με κάποια πρωτεΐνη-μεταφορά.

Οι κυριότερες πρωτεΐνες που συγκρατούν το σίδηρο δεσμευμένο για την προφύλαξη του οργανισμού και τον απελευθερώνουν όταν το απαιτούν οι φυσιολογικές συνθήκες είναι οι παρακάτω (Loehr 1989, Gutteridge 1986B).

Η τρανσφερίνη συγκρατεί 3 mg σιδήρου από το συνολικό του ανθρώπινου οργανισμού (4,5 gr) αλλά ο σίδηρος αυτός ανακυκλώνεται περίπου 10 φορές καθημερινά. Είναι γλυκοπρωτεΐνη που συντίθεται στο ήπαρ και συγκρατεί σφικτά άτομα τρισθενούς σιδήρου. Σε φυσιολογικούς

ανθρώπους η τρανσφερίνη είναι συνήθως μόνο 20-30% συνδεδεμένη με σίδηρο και έχει περιθώριο για δέσμευση σιδήρου εάν υπάρξουν ελεύθερα ιόντα σιδήρου στο πλάσμα (Loehr 1989).

Η λακτοφερίνη έχει βρεθεί στο σάλιο, στο σπερματικό υγρό, στα δάκρυα και στο ανθρώπινο γάλα. Επίσης η λακτοφερίνη εκκρίνεται από ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα σε περιοχές φλεγμονής και δεσμεύει το σίδηρο πιο σφικτά από την τρανσφερίνη που φέρει δυο άτομα τρισθενούς σιδήρου ανά μόριο (Gutteridge 1981).

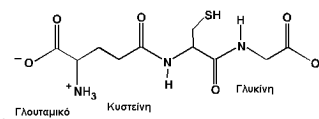
Η φερριτίνη είναι η πιο σημαντική ενδοκυττάρια πρωτεΐνη. Ο σίδηρος εισέρχεται με τη μορφή του δισθενούς σιδήρου και οξειδώνεται σε τρισθενή, εναποτιθέμενος στο κέντρο του πρωτεϊνικού μορίου ως αδιάλυτο ένυδρο οξειδίο του σιδήρου. Οι φερριτίνες των θηλαστικών αποτελούνται από 24 υπομονάδες καθεμία των οποίων έχει περίπου 20.000 μοριακή μάζα (Harrison 1996).

Η αλβουμίνη: Ο χαλκός που απορροφάται εισέρχεται στο σώμα δεσμευμένος με αλβουμίνη (λευκωματίνη) και μεταφέρεται στο ήπαρ. Οι αλβουμίνες μέσω της ομάδας -SH εξουδετερώνουν το υποχλωριώδες οξύ και το υπεροξυνιτρώδες. Η χρησιμότητά τους είναι ότι προμηθεύουν σχεδόν το σύνολο των θειολοενώσεων στο πλάσμα του αίματος (Halliwell 1988B).

Σερουροπλαμίνη (χαλκοπλασμίνη): Δεσμεύει το χαλκό στο ήπαρ. Έχει μοριακό βάρος 130.000 D και 7 άτομα χαλκού ανά μόριο. Τα 6 άτομα χαλκού είναι σφικτά προσδεμένα και απελευθερώνονται σε χαμηλό pH, παρουσία μιας αναγωγικής ένωσης. Η σερουροπλασμίνη θεωρείται ότι παίζει βασικό ρόλο στο μεταβολισμό του σιδήρου, μιας και οξειδώνει καταλυτικά το δισθενή σίδηρο σε τρισθενή, χωρίς την απελευθέρωση οξυγονούχων ελευθέρων ριζών (ρίζες υδροξυλίου). Καταλύει την οξείδωση μιας ποικιλίας υποστρωμάτων πολυαμινών και πολυφαινολών in vitro (Gutteridge 1978).

Μεταλλοθειονίνες: Είναι πρωτεϊνικής φύσης ουσίες με μοριακή μάζα 6500 D και βρίσκονται στο κυτοσόλιο των ευκαρυωτικών κυττάρων, ειδικά στο ήπαρ, στους νεφρούς και στο έντερο. Είναι πλούσιες σε θείο και κάθε μόριο μπορεί να δεσμευτεί με 5-7 ιόντα μετάλλων, όπως ο ψευδάργυρος, ο άργυρος, ο χαλκός, το κάδμιο και ο υδράργυρος μέσω της σουλφυδρυλομάδας της κυστεΐνης. Η λειτουργία τους περιλαμβάνει αποθήκευση μεταλλικών ιόντων σε μη τοξική

μορφή, ρύθμιση του μεταβολισμού του κυτταρικού χαλκού και ψευδαργύρου και απορρόφηση τους από το έντερο (Sato 1993).



3.3.2 Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτιδίο που αποτελείται από τα αμινοξέα γλουταμινικό, κυστεΐνη και γλουκίνη. Η σύνδεση του γλουταμικού με την κυστεΐνη είναι περισσότερο μέσω του γ-καρβοξυλικού παρά με το α-καρβοξυλικό που βρίσκεται στις πρωτεΐνες. Αυτή η σύνδεση είναι ανθεκτική στις πρωτεάσες και στις πεπτιδάσες που αποσυνθέτουν τις πρωτεΐνες (Meister 1998).

Η γλουταθειόνη είναι παρούσα σε μεγάλες συγκεντρώσεις στην τάξη του mM σε διάφορους ιστούς συμπεριλαμβανομένου και του ήπατος. Εκκρίνεται από το ήπαρ στη χολή. Μέρος της αποσυντίθεται για τη μεταφορά της στο μικρό έντερο, αλλά η υπόλοιπη γλουταθειόνη είναι επαρκής για να διατηρήσει συγκεντρώσεις 200 μM στην κοιλότητα του εντέρου όπου και δρα άμεσα για την αποτοξίνωση των ουσιών (Anderson 1980).

Η σύνθεση της γλουταθειόνης συμβαίνει σε δυο μονοπάτια που συμμετέχουν δύο ένζυμα: η συνθετάση της γ-γλουταμιλικής κυστεΐνης και η συνθετάση της γλουταθειόνης (Lu 2009). Και οι 2 μορφές εξαρτώνται από το ATP και είναι παρόντες στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων των θηλαστικών. Αν και η γλουταθειόνη συντίθεται στο κυτταρόπλασμα, ένα μικρό κλάσμα εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια (10-15%) όπου προστατεύει ενάντια στο H₂O₂ και σε άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου. Η αποσύνθεση της γλουταθειόνης συμβαίνει από ένα ένζυμο, τη γ-γλουταμιλική τρανσφεράση, που είναι γνωστή ως τρανσπεπτιδάση και μετακινεί το γλουταμικό για να παράγει την κυστεΐνογλουκίνη. Αυτό το ένζυμο είναι παρών κυρίως ως ακτινοένζυμο, σχετίζεται με την πλασματική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων που έχει πολύ υψηλή δραστηριότητα στα νεφρικά σωληνάρια (Meister 1974). Το μεγαλύτερο μέρος της αποσύνθεσης της γλουταθειόνης συμβαίνει εξωκυτταρικά και έτσι τα συνδυασμένα μονοπάτια των ενζύμων επιτρέπουν την ανακύκλωση της γλουταθειόνης να είναι ανεξάρτητη της πρωτεϊνικής σύνθεσης και διάσπασης (Meister 1988).

Η γλουταθειόνη είναι παρούσα στα κύτταρα στην ανηγμένη (GSH) και στην οξειδωμένη μορφή (GSSG). Λόγω της δράσης της NADPH-εξαρτώμενης αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR), το κυτταρικό περιεχόμενο της γλουταθειόνης βρίσκεται υπέρ της μορφής της GSH υπό φυσιολογικές συνθήκες. Όμως παθοφυσιολογικές καταστάσεις που προκαλούν οξειδωτικό στρες, συμβάλλουν σε μια αύξηση του λόγου GSSG/GSH (Comporti 1991).

Μέθοδοι που μπορούν να μετράνε ακριβώς και ειδικά και τις δυο μορφές στα βιολογικά δείγματα είναι σημαντικές για την κατανόηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου. Τα επίπεδα της GSH στο ήπαρ αρουραίου είναι περίπου ~6 $\mu\text{mol/g}$ (mM) (Asensi 1994, Tietze 1969), ενώ σε άλλες μελέτες έχουν αναφερθεί επίπεδα της τάξεως 3.6 έως 7.7 mM (Jones 1998B, Tietze 1969). Τα επίπεδα της οξειδωμένης γλουταθειόνης είναι πολύ χαμηλότερα (0.019–0.316 mM). Γενικά, καταστάσεις όπου η αυτο-οξείδωση της GSH σε GSSG δεν ελέγχεται αποτελεσματικά κατά τη διάρκεια της κατεργασίας του δείγματος, όπως η απουσία ενός θειολοδεσμευτικού παράγοντα, καταλήγει σε σημαντικά υψηλά επίπεδα οξειδωμένης γλουταθειόνης και χαμηλότερες αναλογίες GSH/GSSG (Alpert 1985). Είναι επίσης λογικό να υποθέσουμε ότι οι θειολοδεσμευτικοί παράγοντες λόγω της αργής δράσης τους επιτρέπουν ως ένα βαθμό αυτοοξείδωση.

Η συνολική γλουταθειόνη του πλάσματος, που αντικατοπτρίζει την ενδοηπατική συγκέντρωση γλουταθειόνης είναι ένας δείκτης της ισορροπίας μεταξύ εκροής γλουταθειόνης από το ήπαρ και λήψης από τα νεφρά (Akerboon 1981). Ο χρόνος ημίσειας ζωής της στα ερυθροκύτταρα είναι 4 ημέρες και στο ήπαρ 3 ώρες. Το ήπαρ συνεχώς εκκρίνει γλουταθειόνη στο πλάσμα. Η GSH είναι σημαντική για την ενεργότητα του ενζυμικού συστήματος του κυτοχρώματος P450, τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, τη διατήρηση της φυσιολογικής οξειδοαναγωγικής κατάστασης, την ηπατική αναγέννηση μέσω της επαγωγής του NF-Kb και έχει ραδιοπροστατευτικό ρόλο. Επίσης συμβάλλει στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών και παίζει σημαντικό προστατευτικό ρόλο στο μεταβολισμό τοξικών παραγόντων, όπως είναι ο τετραχλωράνθρακας, η ακεταμινοφαίνη και τα βενζοπυρένια (Meister 1988).

Επίσης, αυξημένη GSH και χαμηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών συμβάλλουν στο να δρα το NO ευεγερτικά (αναστολή απόπτωσης, λιπιδικής υπεροξειδωσης και ηπατικής νέκρωσης).

Αντίθετα, χαμηλά επίπεδα GSH και αυξημένα επίπεδα ελευθέρων ριζών καθιστούν το NO επιβλαβές (ηπατική νέκρωση, αυξανόμενη λιπιδική υπεροξειδωση, απόπτωση, θρυμματισμός του DNA) (Karlowitz 2000). Το πεπτιδίο κατέχει σημαντικό ρόλο σε αντιδράσεις αποτοξίνωσης, όπως στο να αδρανοποιεί το κυτταρικό H_2O_2 και συζευγνύεται με τους ηλεκτροφιλικούς μεταβολίτες των ξενοβιοτικών (Karlowitz 1985). Συνήθως, η σύνδεση τους με τη γλουταθειόνη που καταλύεται από την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης είναι το πρώτο βήμα στην αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών. In vitro η GSH μπορεί να αντιδράσει με την υδροξυλική ρίζα, το υποχλωριώδες οξύ, το υπεροξυνιτρώδες, την αλκοξυλική ρίζα, την ανθρακική ρίζα, τη ρίζα του NO και τα ιόντα χαλκού. Οι αντιδράσεις της GSH με τις ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργήσουν τις θειυλικές ρίζες (Hogg 2002).

Η λειτουργικότητα της GSH οφείλεται στη σουλφυδρυλική ομάδα της κυστεΐνης. Η τελευταία είναι ένα αμινοξύ που παρέχει μια μεγάλη ευελιξία σε χημική δραστηριότητα που οφείλεται στο θειολικό άτομο που είναι παρόν στη θειόλη. Αυτή η θειόλη είναι σημαντική για τις βιολογικές λειτουργίες των περισσότερων ενζύμων. Στη GSH, η κυστεΐνη οξειδώνεται για να παράγει το δισουλφίδιο όταν η γλουταθειόνη δρα ως αναγωγικό. Η θειόλη επίσης χρησιμοποιείται για την αποτοξίνωση των δραστικών ηλεκτροφιλικών χημικών που καταλύονται από την τρανσφεράση της γλουταθειόνης.

Η θειολική ομάδα της κυστεΐνης είναι 10 φορές πιο δραστική από τη γλουταθειόνη και οξειδώνεται γρήγορα για να παράγει ΔMO. Αυτή η δραστηριότητα οφείλεται στην ελεύθερη αμινοομάδα και στον α-άνθρακα που μεταφέρει την πυκνότητα των ηλεκτρονίων από τη θειολική ομάδα στο β-άνθρακα. Αυτή η δραστηριότητα μειώνεται στη γλουταθειόνη, επειδή το γλουταμινικό προσκολλάται στην αμινοομάδα. Αν και η γλουταθειόνη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση, η μειωμένη δραστηριότητα σε σχέση με την κυστεΐνη προτείνει ότι η κύρια λειτουργία της γλουταθειόνης είναι στο να λειτουργεί ως μικρής διάρκειας δεξαμενή της κυστεΐνης. Η διάσπαση της γλουταθειόνης συμβάλλει στην απελευθέρωση της κυστεΐνης.

Ένα γεγονός πιο σημαντικό είναι ότι η λειτουργία της ως μέσο αποτοξίνωσης είναι δευτερεύουσα σε σχέση με τη λειτουργία της ως δεξαμενή κυστεΐνης. Για αυτό μετά από μερικές

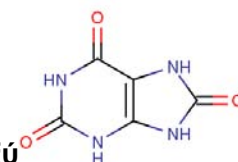
ημέρες νηστείας, οι μηχανισμοί αποτοξίνωσης που εξαρτώνται από τη γλουταθειόνη αναστέλλονται (Dahm 1993).

Η γλουταθειόνη είναι παρούσα σε συγκεντρώσεις 150 mgr/day στην ανθρώπινη δίαιτα και μπορεί να απορροφηθεί άθικτη από το έντερο. Ο ποσοτικός υπολογισμός δείχνει ότι στα υγιή άτομα με επαρκή αμινοξέα που έχουνθειολομάδες στη δίαιτα τους, η ποσότητα της γλουταθειόνης που παίρνουν από τις τροφές δεν αυξάνει τα εσωτερικά επίπεδα της γλουταθειόνης. Συγκεντρωτικά στοιχεία δείχνουν ότι η γλουταθειόνη που παρέχεται από τις τροφές μπορεί να απορροφηθεί από τα επιθηλιακά κύτταρα της στοματικής κοιλότητας και της γαστρεντερικής οδού.

Οι περισσότερες τροφές περιέχουν γλουταθειόνη ποσότητας 15 mgr/100 gr. Σε αυτές τις τροφές περιλαμβάνονται τα φρέσκα και φρεσκομαγειρεμένα λαχανικά, η πατάτα, το σπανάκι, το σπαράγγι, η ντομάτα και το αβοκάντο, φρούτα όπως τα πορτοκάλια, το γκρέιπφρουτ και το ραδάκινο, φρεσκομαγειρεμένα κρέατα, πουλερικά και ψάρια. Όσοι καταναλώνουν τα παραπάνω τρόφιμα φρέσκα, η ημερήσια πρόληψη γλουταθειόνης φτάνει στα 100-150 mgr/ημέρα (Gutteridge 1996).

3.3.3. Χολερουθρίνη

Μελέτες in vitro δείχνουν ότι η χολερουθρίνη είναι ισχυρός εκκαθαριστής υπεροξυλο-ριζών και μονήρους οξυγόνου. Σύμπλοκα χολερουθρίνης-αλβουμίνης προστατεύουν πρωτεΐνες και λιπαρά οξέα απέναντι από τις ελεύθερες ρίζες (Neuzil 1988).

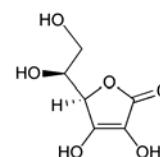


3.3.4. Το ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι αντιοξειδωτική ένωση μικρού μοριακού βάρους που βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος. Παράγεται από την οξειδωση της υποξανθίνης και ξανθίνης, μέσω ενζυμικής δράσης της οξειδάσης και αφυδρογονάσης της ξανθίνης. Σε φυσιολογικό pH βρίσκεται με τη μορφή ανιόντος με το αρνητικό φορτίο στο οξυγόνο του πενταμελούς δακτυλίου. Το κύριο αντιοξειδωτικό χαρακτηριστικό του ουρικού οξέος σε βιολογικά συστήματα είναι ότι αντιδρά με

οργανικές ρίζες και υπεροξυλορίζες. Επίσης το ουρικό ανιόν εξουδετερώνει ικανοποιητικά το υπεροξυνιτρώδες και έτσι προστατεύει μεγάλο αριθμό βιομορίων από την οξειδωτική του δράση. Δημιουργεί σύμπλοκα με τα ιόντα σιδήρου και έτσι αποτρέπει τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Επίσης, δεσμεύει τα ιόντα χαλκού και προστατεύει από την ενδοκυτταρική παραγωγή ελευθέρων ριζών (Davies 1986).

Από έρευνες βρέθηκε ότι το ουρικό ανιόν παίζει σημαντικό ρόλο στην αρχική προστασία των λιπιδίων των μεμβρανών των κυττάρων. Κατά την εισπνοή του όζοντος προκαλείται σε σύντομο διάστημα μείωση της συγκέντρωσης του ουρικού και του ασκορβικού ανιόντος, καθώς και της γλουταθειόνης (Meadows 1986). Το ασκορβικό και το ουρικό ανιόν στο πλάσμα του αίματος παίζουν συμπληρωματικό αντιοξειδωτικό ρόλο, όπου το ουρικό προστατεύει “εθελοντικά” το ασκορβικό σε οξειδωτικές καταστάσεις που υπερβαίνουν τους ενδογενείς αμυντικούς μηχανισμούς (Davies 1986).



3.3.5. Η Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C σε ορισμένα ζώα παράγεται από τη γλυκόζη στο ήπαρ (θηλαστικά) και στους νεφρούς (πουλιά και ερπετά). Στους ανθρώπους το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο για τη σύνθεση του ασκορβικού οξέος έχει πολλαπλές μεταλλάξεις και έτσι δεν μπορεί να παραχθεί λειτουργική πρωτεΐνη (Smirhoff 2000). Η βιταμίνη C βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο γαστρικό υγρό (150-210 μM) και η συγκεντρωσή της είναι 3 φορές υψηλότερη σε σχέση με το πλάσμα. Στο στομάχι, παρεμποδίζει τη δημιουργία των N-νιτροσυλιωμένων συστατικών που είναι μεταλλαξιογόνα. Σε δόσεις 40-60 mgr βιταμίνης C, προάγεται η απορρόφηση του σιδήρου από το έντερο.

Το ασκορβικό οξύ δρα ως συμπαραγοντας σε 8 διαφορετικά ένζυμα. Είναι δότης ηλεκτρονίων σε αρκετές ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές αντιδράσεις. Δρα προστατευτικά έναντι των οξειδωτικών παραγόντων και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων (Chou 1983). In vitro, η βιταμίνη C παρεμποδίζει την οξείδωση των LDL μέσω της ένωσης της, με τις ελεύθερες ρίζες. Το κατά

πόσο όμως αυτές οι δράσεις της συμβαίνουν και *in vivo* είναι άγνωστο. Στο δοκιμαστικό σωλήνα, οι συγκεντρώσεις των μετάλλων είναι υψηλότερες και οι οξειδώσεις συμβαίνουν πολύ αργά (κάτι το οποίο είναι απίθανο να συμβεί στον ανθρώπινο οργανισμό). Οι αντιοξειδωτικοί ρόλοι του ασκορβικού οξέος όπως έχουν μελετηθεί *in vitro* είναι πολυάριθμοι και εμφανίζονται σε συνδυασμό με άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες στα εξωκυττάρια υγρά. Συνοπτικά οι δράσεις του ασκορβικού οξέος, είναι οι παρακάτω:

- 1.Εξουδετερώνει τις δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (Πίνακας 19) (Bendich 1986).
- 2.Το ασκορβικό οξύ απομακρύνει τις υδατοδιαλυτές υπεροξυλορίζες (Wayner 1986).
- 3.Λιποφιλική εστέρες του ασκορβικού οξέος μπορούν να απομακρύνουν λιποδιαλυτές υπεροξυλο-ρίζες (Nihro 1991).
- 4.Αναγεννά την α-τοκοφερόλη από τις τοκοφερολυορίζες της, τόσο σε βιολογικές μεμβράνες όσο και σε λιποπρωτεΐνες (Bisby 1995).
- 5.Προστατεύει τα λιπίδια του πλάσματος από την υπεροξειδωση που προκαλείται από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα (Dwegger 1992).
- 6.Προστατεύει μεμβράνες και λιποπρωτεΐνες από τη λιπιδική υπεροξειδωση που προκαλούν οι οξειδωτικές ουσίες του καπνού του τσιγάρου (Panta 2000).

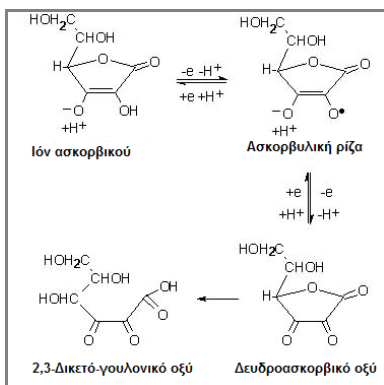
Πίνακας 19: Είδη δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου που εξουδετερώνονται από τη βιταμίνη C.

Δραστικές μορφές οξυγόνου
Αλκοξυλικές ρίζες (RO [·])
Υδροξυλικές ρίζες (·OH)
Όζον (O ₃)
Υπεροξυλικές ρίζες (RO ₂ [·])
Μονήρες οξυγόνο (¹ O ₂)
Υπεροξειδικό ανιόν (O ₂ ^{-·})
Δραστικές μορφές αζώτου
Διοξειδίο του αζώτου (NO ₂ [·])
Νιτροξειδίο (NO)
Υπεροξυνιτρώδες (ONOO ⁻ /ONOOH)
Δραστικές μορφές χλωρίου
Χλωραμίνες (RNHCl)
Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)
Θειύλο και σουλφένυλο ρίζες

Το ασκορβικό οξύ όμως έχει και αρκετές προοξειδωτικές δράσεις (Schwartz 1996, Halliwell 1996B). Ο συνδυασμός ασκορβικού οξέος και μετάλλων (χαλκού και σιδήρου) σε διάφορα χάπια

συμβάλλει στην παραγωγή της υδροξυλικής ρίζας όταν το χάπτι διαλύεται. In vino αυτό μπορεί να συμβεί μόνο σε νοσήματα που είναι αυξημένα αυτά τα μέταλλα (Gerster 1999).

Αρκετά όργανα περιέχουν ποσότητες βιταμίνης C σε mM συγκεντρώσεις. Το ήπαρ είναι η μεγαλύτερη αποθήκη βιταμίνης C. Υψηλότερη λήψη ισοδυναμεί με υψηλότερη αποθήκευση στα όργανα (De Zwart 1999). Οι ΔΜΟ οξειδώνουν το ασκορβικό σε δευδροασκορβικό οξύ. Το δευδροασκορβικό οξύ εισέρχεται στα ουδετερόφιλα μέσω μεταφορέων γλυκόζης και μετατρέπεται σε ασκορβικό οξύ από τη γλουταρεδοξίνη (εξαρτώμενη πρωτεΐνη από τη γλουταθειόνη) (Morrow 1995). Οι συνεχόμενες όμως οξειδώσεις διασπούν την ασκορβυλική ρίζα σε άλλα προϊόντα οδηγώντας σε μείωση του ασκορβικού ((Kashiba-Iwatsuki 1996), (Εικόνα 74).



Εικόνα 74: Μεταβολισμός ασκορβικού οξέος. Το ιόν ασκορβικού μετατρέπεται στο 2,3 δικετό γουλονικό οξύ.

Ο άνθρωπος δεν έχει το γονίδιο που κωδικοποιεί τη βιταμίνη C, με αποτέλεσμα η μοναδική πηγή του να είναι η διατροφή. Η βιταμίνη C βρίσκεται στα φρούτα (φράουλες, πορτοκάλια, παπάγια, ακτινίδιο, μανικό, πεπόνι) και στα λαχανικά (μπρόκολο, ντομάτα, λαχανικά βρυξελλών, κόκκινο και πράσινο πιπέρι, λάχανο και κουνουπίδι). Επαρκής λήψη βιταμίνης C εκτιμάται να είναι 200 mgr καθημερινώς (Woodside 2005, García-Closas 2004).

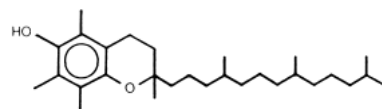
3.3.6. Συνένζυμο Q



Το συνένζυμο Q, είναι ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον μόριο με ποικίλες εξωκυτταρικές διεργασίες. Το όνομα του είναι 2,3-διεθοξυ-5-μέθυλο-6-μουλτιπρένυλο-βενζοκινόνη ή ουβικινόνη. Η ουβικινόνη στην ανηγμένη μορφή της επιδρά στη σχετική ταχύτητα απελευθέρωσης ενέργειας διαφόρων δευδρογονασών. Από έρευνες σε υποκυτάρια συστήματα, πειραματόζωα και σε ανθρώπους με διάφορες κλινικές καταστάσεις, το συνένζυμο κυρίως στην ανηγμένη του μορφή

λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό, προστατεύοντας κυτταρικές μεμβράνες από βλάβες ελευθέρων ριζών (Ozawa1985).

3.3.7. Τοκοφερόλη



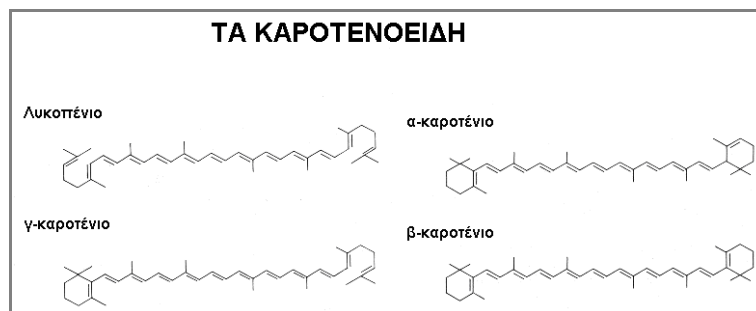
Οκτώ φυσικά αντιοξειδωτικά έχουν δραστικότητα βιταμίνης E, οι α,β,γ,δ τοκοφερόλες και α,β,γ,δ τοκοτριενόλες. Το όνομα τοκοφερόλη προέρχεται από την ελληνική λέξη τόκος (γέννηση παιδιού) και φέρω. Κάθε τοκοφερόλη έχει τρία ασύμμετρα άτομα άνθρακα (Diplock 1985).

Η τοκοφερόλη ανάγει τα λιπιδικά υπεροξειδία μέσω επαφής πιο γρήγορα από ότι αυτά τα λιπίδια μπορούν να αντιδράσουν με τα διπλανά λιπαρά οξέα ή με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες (Chow 1991). Η σχετική ταχύτητα αντίδρασης της τοκοφερόλης είναι αρκετά υψηλή με το μονήρες οξυγόνο, το υπεροξειδικό ανιόν και με ρίζες υδροξυλίου. Η τοκοφερόλη ως λιποδιαλυτή βιταμίνη είναι γνωστή για τη δράση της στη διάσπαση αλυσιδωτών λιπιδικών υπεροξειδώσεων και η ριζική της μορφή μπορεί να ανακυκλωθεί φυσιολογικά πίσω στην αρχική μορφή (Sharma 1993). Οι ιστοί της καρδιάς είναι πλούσιοι σε βιταμίνη E, σχεδόν σε συγκέντρωση παρόμοια με αυτή του ήπατος. Η βιταμίνη E απαιτεί αναγέννηση για συνεχή λειτουργία. Αναγεννάται από το συνένζυμο Q στις μεμβράνες και από το ασκορβικό οξύ στο ενδιάμεσο μεταξύ νερού και μεμβράνης (Chan 1993). Από τη τροφή απορροφάται το 25 με 50%. Τροφές πλούσιες σε βιταμίνη E είναι τα φυτικά έλαια, οι ξηροί καρποί, τα σιτηρά και τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά (Woodside 2005, García-Closas 2004).

Η τοκοφερόλη εκθέτει και προ-οξειδωτικές δράσεις. Είναι αναγωγικός παράγοντας και η αντίδραση της με το τρισθενή σίδηρο και το δισθενή χαλκό συμβάλλει στη δημιουργία της τοκοφερυλικής ρίζας, η οποία μπορεί να αντιδρά με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα σε χαμηλούς ρυθμούς (Schwartz 1996).

3.3.8. Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι μια τάξη δομικών σχετικά συστατικών που βρίσκονται στα φυτά, στα φύκη και σε κατώτερους οργανισμούς. Αποτελούνται από 600 λιποδιαλυτές χρωστικές, από τις οποίες 24 βρίσκονται στο πλάσμα και στους ιστούς. Οι δύο υποτάξεις καροτενοειδών είναι οι οξυγονωμένες ξανθοφύλλες και τα υδατανθρακικά καροτένια (Εικόνα 75). Ορισμένα καροτενοειδή είναι πρόδρομες μορφές της βιταμίνης Α (π.χ. β-καροτένιο, α-καροτένιο, β-κρυπτοξανθίνη) και είναι οι κύριες πηγές της διατροφικής βιταμίνης Α (Lu 2008).



Εικόνα 75: Τα διάφορα είδη των καροτενοειδών.

Οι κυριότερες πηγές καροτενοειδών στους ανθρώπους είναι τα φρούτα και τα λαχανικά που περιέχουν κυκλικά υδατανθρακικά καροτενοειδή (α-καροτένιο και β-καροτένιο), ακυκλικά υδατανθρακικά καροτενοειδή (λυκοπένιο), οξυγονωμένα υδατανθρακικά καροτενοειδή (ξανθοφύλλες), λουτένη, ζεαξανθίνη και β-κρυπτοξανθίνη (Olson 1995).

Τα καροτενοειδή είναι δραστικοί απομακρυντές των ΔΜΟ, ειδικά του μονήρες οξυγόνου και των υπεροξυλικών ριζών (Palozza 1992) και μπορούν να δράσουν σε διαλύματα, σε μεμβράνες και σε υποκυτταρικά οργανίδια. Σε αυτή τη διεργασία τα καροτενοειδή αντιδρούν χημικά με τη ρίζα και δρουν σε συνεργασία με τις τοκοφερόλες. Τα καροτενοειδή έχουν επιπλέον τις παρακάτω επιδράσεις (Nagao 2009):

1. Παρέχουν προστασία ενάντια στους χημικά επαγόμενους καρκίνους.
2. Έχουν αντιμιτογόνες επιδράσεις ενάντια σε χημικούς και ιογενείς επαγωγείς.
3. Αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση στα μικροσωμάτια των ηπατικών κυττάρων.
4. Τροποποιούν τη διαπερατότητα των λυσοσωματίων και την απελευθέρωση των όξινων φωσφατασών.
5. Τροποποιούν την κυτταρική διαφοροποίηση και την κυτταρική μίτωση.

Τα καροτενοειδή όμως εκθέτουν και κάποιες προ-οξειδωτικές δράσεις (Young 2001). Η καλύτερη πηγή των καροτένιων είναι καρότα, γλυκίες πατάτες, μάνγκο, σπανάκι, μπρόκολο, ροδάκινο και πεπόνι (Maiani 2009).

3.3.9. Φαινόλες

Οι φαινόλες αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία φυτοχημικών, τα πιο ευρέως διαδεδομένα στη φύση και είναι ανυπόστατο τμήμα της ανθρώπινης διαίτας (Crozier 2009). Τα διατροφικά φαινορικά περιλαμβάνουν φαινορικά οξέα (υδροξυβενζοϊκό οξύ και υδροξυκιναμικό οξύ), φαινορικά πολυμερή που έχουν υψηλό μοριακό βάρος (ταννίνες) και φλαβονοειδή (Clifford 2000). Υψηλά επίπεδα φαινολών υπάρχουν στο στομάχι, στο μικρό έντερο και στο κόλον.

Οι πολυφαινόλες μπορούν να εκθέτουν αντιοξειδωτικές και άλλες προστατευτικές δράσεις (Stevenson 2007). Η κύρια δράση τους είναι να μπλοκάρουν την υδροξυλική ρίζα μέσω μεθυλίωσης και γλυκουρονιδίωσης (Foti 2007). Για να οριστεί μια φαινόλη ως αντιοξειδωτικό θα πρέπει να ικανοποιεί δυο βασικές καταστάσεις (Rodrigo 2006).

1. Όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις σχετικές με το υπόστρωμα που οξειδώνεται, μπορεί να καθυστερήσει ή να παρεμποδίσει την αυτοοξείδωση που διαμεσολαβείται από τις ελεύθερες ρίζες.

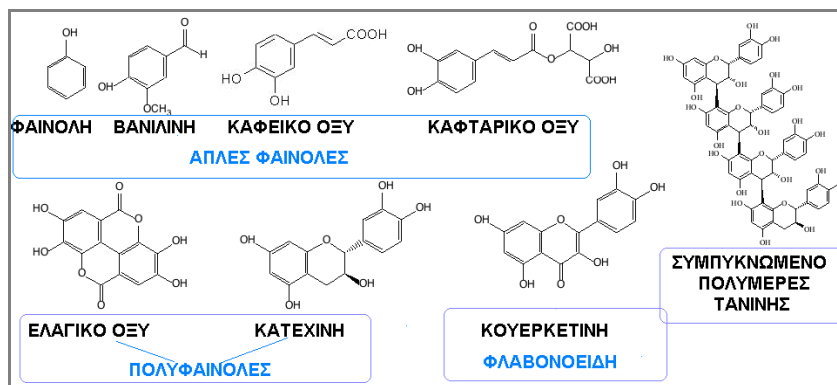
2. Η ρίζα που παράγεται μετά τη δέσμευση πρέπει να είναι σταθερή και να διακόπτει την αλυσιδωτή αντίδραση οξείδωσης.

Τα φαινορικά αντιοξειδωτικά (PPH) αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξείδωση με μια γρήγορη “δωρεά” υδρογόνου στις υπεροξυλικές ρίζες, καταλήγοντας στη δημιουργία του αλκυλικού (αρυλικού) υδροπεροξειδίου, όπως φαίνεται στην ακόλουθη εξίσωση ($ROO\cdot + PPH \rightarrow ROOH + PP\cdot$). Η πολυφαινολική φαινοξυλική ρίζα που παράγεται μπορεί να σταθεροποιηθεί με περαιτέρω “δωρεά” ενός ατόμου υδρογόνου και δημιουργία των κινονών ή αντιδρώντας με άλλες ρίζες και έτσι παρεμποδίζοντας την έναρξη μιας καινούργιας αντίδρασης (Bovicelli 2007).

Τα φαινορικά αντιοξειδωτικά διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες (Εικόνα 76):

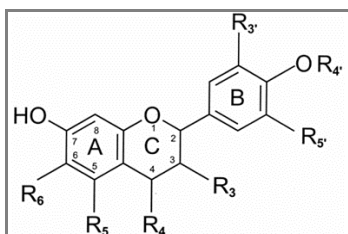
1. Απλές φαινόλες: περιέχουν ένα απλό αρωματικό δακτύλιο με μια ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες (π.χ καφεϊκό οξύ).

2. Πολυφαινόλες: συστατικά που έχουν πολλαπλούς φαινολικούς δακτυλίους (π.χ κατεχίνη τσαγιού και ελλαγικό οξύ).
3. Φλαβονοειδή: έχουν μια ειδική δομή 3 δακτυλίων.
4. Τανίνες: περιγράφουν υψηλού μοριακού βάρους φαινολικά μείγματα.



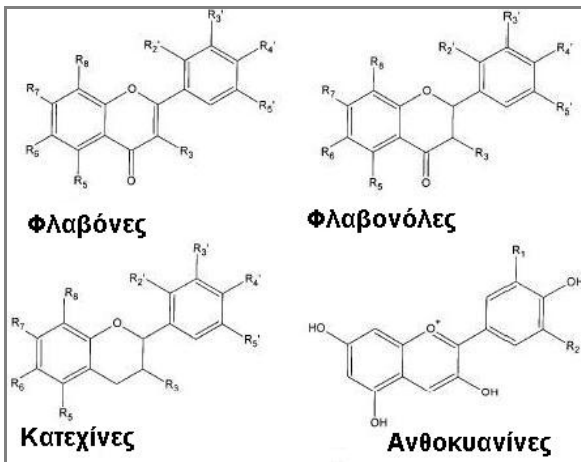
Εικόνα 76: Τα διάφορα είδη των φαινολικών αντιοξειδωτικών.

Τα φλαβονοειδή: Έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 4000 διαφορετικά φλαβονοειδή και οι μοριακές δομές τους αποτελούνται από έναν αρωματικό δακτύλιο A, συμπυκνωμένος σε έναν ετερολυτικό δακτύλιο C, που είναι προσκολλημένος σε ένα δεύτερο αρωματικό δακτύλιο B (Εικόνα 77) (Crozier 2009).



Εικόνα 77: Γενικός τύπος και αριθμηση των κοινών φλαβονοειδών των τροφών. Για τα περισσότερα φλαβονοειδή των τροφών: R₄ -H, R₅ OH and R₆ H.

Τα φλαβονοειδή βρίσκονται συνήθως στα φυτά ως γλυκοσίδες και υπάρχουν αρκετές διαφορές σύνθεσης μεταξύ διαφορετικών τύπων φυτών και ακόμη μεταξύ διαφορετικών σημείων του φυτού. Τα φλαβονοειδή ομαδοποιούνται στις ανθοκυανίνες και στις ανθοξανθίνες (Εικόνα 78). Οι ανθοκυανίνες είναι γλυκοσίδες της ανθοκυανιδίνης και είναι η πιο σημαντική ομάδα των υδατοδιαλυτών φυτικών χρωστικών που είναι υπεύθυνες για το κόκκινο, το μπλέ και τα ροζ χρώμα των λουλουδιών και των φρούτων. Οι ανθοξανθίνες είναι άχρωμες ή άσπρες προς το κίτρινο και περιλαμβάνουν τις φλαβονόλες, τις φλαβόνες, τις φλαβάνες και τις ισοφλαβόνες (King 1999).



Εικόνα 78: Τα διάφορα είδη των φλαβονοειδών.

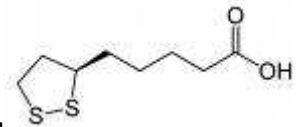
Οι φλαβονόλες είναι από τα πιο διαδεδομένα φλαβονοειδή (Manach 2004). Βρίσκονται στα κρεμμύδια, στα μήλα, στο μπρόκολο, στο χυμό μήλου, στο πράσινο και στο μαύρο τσάι, στο κόκκινο κρασί, στο χυμό του πορτοκαλιού και στο χυμό των φρούτων. Οι φλαβονόλες βρίσκονται στο ροδάκινο, στο κόκκινο και στο άσπρο κρασί, στο πράσινο τσάι και στο μήλο. Οι φλαβόνες βρίσκονται στο λάδι και στο σέλινο. Οι φλαβονόλες βρίσκονται στο πορτοκάλι και στο γκρέιπφρουτ. Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται στη λικόριζα και οι ισοφλαβόνες βρίσκονται στη σόγια και στους καρπούς. Το υδροξυκιναμικό οξύ βρίσκεται στα βατόμουρα, στο κεράσι, στο ροδάκινο, στο μήλο, στο πορτοκάλι, στο γκρέιπφρουτ, στο τζίντζερ και στο λάδι. Το υδροξυβενζοϊκό οξύ βρίσκεται στο βατόμουρο, στο άσπρο κρασί, στο χυμό του μήλου και στο ρόδι (D'Archivio 2007). Τα φλαβονοειδή εκθέτουν ένα ευρύ φάσμα βιοχημικών δραστηριοτήτων από τις οποίες οι περισσότερες σχετίζονται με τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (Santangelo 2007, Stasiuk 2010).

1. Αναστολή της διαδικασίας οξειδωσης (δέσμευση ρίζας και μεταλλικών ιόντων).
2. Αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης.
3. Αναστολή της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.
4. Αναστολή της οξειδάσης του NADPH.
5. Αναστολή της λιποξυγενάσης.
6. Παρεμπόδιση των κυτταροτοξικών επιδράσεων της οξειδωμένης LDL.
7. Αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης C.
8. Αναστολή της φωσφολιπάσης A_2 .
9. Αναστολή της φωσφοδιεστεράσης του κυκλικού AMP.

10. Αναστολή της ATP-άσης που εξαρτάται από το ασβέστιο.

Τα φλαβονοειδή είναι ανάμεσα στα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά λόγω της μοναδικής δομής τους. Η ο-διυδροξυλική δομή του β-δακτυλίου δίνει αυξημένη σταθερότητα στην ελεύθερη ρίζα. Ο διπλός δεσμός ανάμεσα στον άνθρακα 2 και 3 δημιουργεί μια κετοομάδα στον άνθρακα 4 στον C δακτύλιο και αυξάνει την ηλεκτρονιακή μεταφορά της ρίζας από το β-δακτύλιο. Οι υδροξυλικές ομάδες στη θέση 3 και 5 στο δακτύλιο C και A απαιτούνται για το μέγιστο δυναμικό της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας (Servili 2009). Επιπλέον, το αναγωγικό δυναμικό τους είναι χαμηλότερο από αυτό των ελευθέρων ριζών.

Όμως κάτω υπό συγκεκριμένες καταστάσεις, όπως υψηλές συγκεντρώσεις φαινολικών αντιοξειδωτικών, υψηλό pH και παρουσία ιόντος σιδήρου μπορεί να ξεκινήσει μια διεργασία αυτό-οξειδωσης και να συμπεριφερθούν ως προ-οξειδωτικά (Shahidi 1995).



3.3.10. α-Λιποϊκό Οξύ

Είναι ένα φυσικό συστατικό που υπάρχει ως συμπράγοντας σε αρκετά μιτοχονδριακά ένζυμα (ακυλοτρανσφεράση, που εμπεριέχονται στο μεταβολισμό και στην παραγωγή ενέργειας). Το λιποϊκό οξύ ανάγεται στην πιο ενεργή μορφή: διυδρολιποϊκό οξύ. Η αντιοξειδωτική του ιδιότητα είναι λόγω της ανηγμένης δομής τους (Packer 1995).

4. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

4.1. Επίδραση στο κύτταρο

Το οξειδωτικό στρες έχει τις παρακάτω επιδράσεις στο κύτταρο (Halliwell 2007):

1. Αυξημένος πολλαπλασιασμός: Αρκετά κύτταρα ανταποκρίνονται στο οξειδωτικό στρες με τον πολλαπλασιασμό. Ο πολλαπλασιασμός κάποιες φορές είναι επιθυμητός, αλλά κάποιες άλλες όχι. Για παράδειγμα, αυξημένος πολλαπλασιασμός μπορεί να συμβεί στα λεία μυϊκά κύτταρα και να συμβάλλει στην αθηροσκλήρωση, αγγειογέννεση, ρευματοειδή αρθρίτιδα και ίνωση (ανώμαλος πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών).

2. Προσαρμογή του κυττάρου: Ο οργανισμός με θετική ρύθμιση του συστήματος της αντιοξειδωτικής άμυνας προστατεύεται ενάντια στη βλάβη. Προσαρμογή δεν αναφέρεται πάντα στην επαγωγή των αντιοξειδωτικών ένζυμων, αλλά αναφέρεται και στην τροποποίηση των στόχων που γίνονται περισσότερο ανθεκτικά στην οξειδωτική βλάβη. Για παράδειγμα καλλιεργώντας κύτταρα HLA σε αυξανόμενη συγκέντρωση οξυγόνου είναι δυνατόν να παραχθούν κύτταρα, ικανά να επιβιώνουν σε συνθήκες 80% οξυγόνο (επίπεδο θανάσιμο για τα φυσιολογικά κύτταρα). Αυτά τα κύτταρα δεν έχουν αυξημένες δραστηριότητες καταλάσης και υπεροξειδικής δισμουτάσης. Πιθανόν σε αυτά τα μιτοχόνδρια να παράγουν λιγότερες ελεύθερες ρίζες.

3. Κυτταρική βλάβη: Αυτό εμπεριέχει βλάβη σε ορισμένους μοριακούς στόχους: λιπίδια, DNA, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες. Τέτοια βλάβη μπορεί ορισμένες φορές να είναι το ερέθισμα, που οδηγεί στην προσαρμογή. Χαμηλά επίπεδα H_2O_2 προκαλούν απόπτωση και υψηλότερα επίπεδα προκαλούν νέκρωση.

4. Βλάβη κυτταρικών μεμβρανών: Οι ελεύθερες σουλφιδρυλικές ομάδες των θειολών και των σουλφιδρυλικών πρωτεϊνών είναι οι κύριοι στόχοι των δραστικών μορφών οξυγόνου. Αυτές οι ομάδες εντοπίζονται ανάμεσα στις κυτταρικές μεμβράνες. Η κυτταρική μεμβράνη είναι μια διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων με τα λιπαρά οξέα να εντοπίζονται ανάμεσα. Η βλάβη των κυτταρικών μεμβρανών από τις δραστικές μορφές οξυγόνου ελέγχεται από ένα κατώφλι όταν συμβαίνει ένας καταρράκτης γεγονότων. Αυξημένη διαπερατότητα επιτρέπει την αύξηση του

ενδοκυτταρικού ασβεστίου και την ενεργοποίηση πρωτεασών και φωσφολιπασών. Το αυξημένο κυτοσολικό ασβέστιο εμφανίζεται να ενεργοποιεί τη μαζική ιστική και κυτταρική βλάβη, που συμβαίνει με ή χωρίς την εμπλοκή των ελευθέρων ριζών.

5.Γήρανση: Το κύτταρο επιβιώνει αλλά δεν μπορεί πλέον να διαιρεθεί. Αυτό εμφανίζεται σε υψηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών.

6.Κυτταρικός θάνατος: Μετά τη βλάβη το κύτταρο μπορεί να α) επανέλθει από την οξειδωτική βλάβη με το να την επιδιορθώσει ή με το να αντικαταστήσει τα επιβλαβή μόρια, β) μπορεί να επιβιώσει με εμμένουσα οξειδωτική βλάβη και γ) η οξειδωτική βλάβη ειδικά στο DNA μπορεί να ενεργοποιήσει το θάνατο με την απόπτωση, τη νέκρωση ή τον κυτταρικό θάνατο.

7.Οξειδοαναγωγική ρύθμιση των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεϊνικά κανάλια: (π.χ) οξειδωση και αναγωγή σημαντικών θειολικών ομάδων ή νιτροσυλίωση υπολειμμάτων τυροσίνης για να τροποποιήσουν τη λειτουργία των καναλιών. Τροποποιώντας τη δραστικότητα ενός ιοντικού καναλιού, μπορεί να προκληθεί το άνοιγμα/κλείσιμο άλλων σε απάντηση στη κυτταρική ιοντική ισορροπία και σε αλλαγές στο μεμβρανικό δυναμικό.

8.Βλάβη στα κανάλια μεταφοράς ασβεστίου: Αυτό μπορεί να συνεισφέρει στις προ-πολλαπλασιαστικές επιδράσεις του χαμηλού οξειδωτικού στρες καθώς επίσης και στις κυτταροτοξικές επιδράσεις των υψηλότερων επιπέδων. Η περίσσεια του ασβεστίου οδηγεί στο σε αύξηση της διαπερατότητας των μιτοχονδρίων και στο άνοιγμα των πόρων της εσωτερικής μεμβράνης, προκαλώντας την έξοδο διαφορών ουσιών και τη σμίκρυνση των μιτοχονδρίων.

9.Επίδραση στο μεταβολισμό των ιόντων του χαλκού και του σιδήρου: Το υπεροξειδικό ιόν απελευθερώνει σίδηρο από τη φερριτίνη, ενώ τα υπεροξειδία απελευθερώνουν σίδηρο από τις αποσυντιθέμενες πρωτεΐνες. Το υπεροξυνιτρώδες απελευθερώνει το σίδηρο από τη φερριτίνη και το χαλκό από τη σερουροπλασμίνη. Τα μέταλλα μπορούν να συνδεθούν με το DNA και να αντιδράσουν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, δημιουργώντας την υδροξυλική ρίζα. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να βλάψει αρκετά μόρια. Όμως δεν είναι σίγουρο, ποιος είναι ο πρώτος στόχος. Ο αρχικός στόχος ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου, τον τύπο του βλαπτικού παράγοντα και την επικινδυνότητα του. Για παράδειγμα ο τετραχλωράνθρακας βλάπτει τα

κύτταρα μέσω λιπιδικής υπεροξειδωσης. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου επιδρά περισσότερο στο DNA.

Σε πολλά νοσήματα, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται ως αποτέλεσμα της ιστικής βλάβης και συνεισφέρουν σημαντικά στην παθογένεια της νόσου. Η απάντηση όμως, το κατά πόσο είναι ωφέλιμες στο να ενεργοποιούν γρήγορους μηχανισμούς προσαρμογής διαφέρει από νόσο σε νόσο αλλά και από ασθενή σε ασθενή και εξαρτάται από την αντιοξειδωτική κατάσταση του καθενός (Halliwell 2007). Σε αρκετά νοσήματα, οι ελεύθερες ρίζες δεν παίζουν ρόλο στη βλάβη. Για παράδειγμα, η αυξημένη λιπιδική υπεροξειδωση στους κατεστραμμένους μύς των ασθενών με μυϊκή δυστροφία είναι το αποτέλεσμα της νόσου και δεν συνεισφέρει στη βλάβη. Ένας άλλος παράγοντας που πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη είναι το κατά πόσο ανταποκρίνεται το κύτταρο στο οξειδωτικό στρες (Πίνακας 20).

Πίνακας 20: Κυτταρικές αποκρίσεις στο οξειδωτικό στρες.

	ΘΕΤΙΚΕΣ	ΑΡΝΗΤΙΚΕΣ
Αυξημένος πολλαπλασιασμός	Επούλωση πληγών	Ύλωση
Θετική ρύθμιση της αντιοξειδωτικής άμυνας (σιαπερόνες, αντιοξειδωτικά)	Ανθεκτικότητα σε παραπέρα βλάβη	Ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων
Θετική ρύθμιση παραγόντων μεταγραφής	Αυξανόμενη παραγωγή NO και κυτοκινών, αυξημένη σύνθεση γλουταθειόνης	Επιβίωση ανεπιθύμητων κυττάρων
Νεκρωτικός θάνατος	Ενεργοποίηση της φλεγονής, πρόβλημα σηματοδότησης.	Έλλειψη χρήσιμων κυττάρων, απελευθέρωση μεταλλικών ιόντων.
Απόπτωση	Εξάλειψη κυττάρων με επιπλέον βλάβη στο DNA, αποφυγή κακοήθειας	Έλλειψη χρήσιμων κυττάρων (π.χ. νευροδιεγερτικές διαταραχές, απελευθέρωση υπεροξειδίων από αποπτικά κύτταρα).

Κριτήρια για ενοχοποίηση των ΔΜΟ/ΔΜΑ ως σημαντικούς μηχανισμούς ιστικής βλάβης στις ανθρώπινες ασθένειες είναι (Halliwell 2004, Halliwell 2007).

1. Οι ελεύθερες ρίζες πρέπει πάντα να μετρώνται στη θέση της βλάβης.
2. Η χρονική περίοδος της δημιουργίας ελευθέρων ριζών πρέπει να συμπίπτει με τη χρονική περίοδο της ιστικής βλάβης.

3. Η άμεση παραγωγή των ελευθέρων ριζών πάνω από μια περίοδο στον ιστό σε συγκεντρώσεις μέσα στα όρια που βρίσκονται *in vivo*, πρέπει να αναπαράγει την ιστική βλάβη και την οξειδωτική βλάβη που παρατηρείται.

4. Η απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών ή η αναστολή της δημιουργίας τους, θα πρέπει να μειώνει την ιστική βλάβη σε ένα βαθμό σχετικά με το βαθμό της αναστολής της οξειδωτικής βλάβης (Halliwell 2001).

Η μείωση των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών παραγόντων αποδεικνύει παραγωγή ελευθέρων ριζών και ότι το αντιοξειδωτικό σύστημα λειτουργεί, αλλά δεν αποδεικνύει οξειδωτική βλάβη. Επαγωγή της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων αποδεικνύει παραγωγή ελευθέρων ριζών και ότι το αντιοξειδωτικό σύστημα ανταποκρίνεται στην οξειδωτική βλάβη, αλλά δεν αποδεικνύει οξειδωτική βλάβη. Οι δείκτες οξειδωτικής βλάβης προτείνουν ότι η οξειδωτική βλάβη συμβαίνει αλλά η αύξηση των επιπέδων των βιοδεικτών δεν αντικατοπτρίζει μόνο βλάβη αλλά και μειωμένη επιδιόρθωση (Halliwell 2004).

4.2. Επίδραση στον οργανισμό

Οι οξειδωτικές βλάβες που δημιουργούνται στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες, στους υδατάνθρακες και στο DNA, προκαλούν αλλαγές στη λειτουργικότητα των παραπάνω βιομορίων με αποτέλεσμα την εκδήλωση αρκετών νόσων όπως ο καρκίνος, διαβήτης, ρευματοειδής αρθρίτιδα, άσθμα, ψωρίαση, υπέρταση, καρδιοαγγειακά νοσήματα, αθηροσκλήρυνση, πάρκινσον, αλτσχάϊμερ, σκλήρυνση κατά πλάκας κ.α. (Crosswhite 2010, Dreher 1996, Giustarini 2009, Heistad 2009, Praticò 2008, Tsang 2009, Victor 2009, Visconti 2009). Σημαντικό ρόλο παίζουν και στη γήρανση, όπου από πολλές μελέτες έχει υποστηριχθεί, πως οι μεγαλύτεροι σε ηλικία οργανισμοί παράγουν περισσότερες ελεύθερες ρίζες (Ames 1993). Επίσης τα ηλικιωμένα άτομα είναι πιο ευπαθή στη μυϊκή βλάβη. Σε σύγκριση με τα νέα άτομα, στα ηλικιωμένα μια πιο πολύ μικρή εργασία ή άσκηση μπορεί να προκαλέσει μηχανική βλάβη (Brooks 1994). Τα φλεγμονώδη κύτταρα στους τραυματισμένους ιστούς μπορούν να δημιουργήσουν ΔΜΟ/ΔΜΑ. Έτσι, οι ηλικιωμένοι μύες βρίσκονται σε μια συνεχή φλεγμονώδη κατάσταση που έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχή και σταθερή αύξηση των ΔΜΟ/ΔΜΑ. Επίσης η γήρανση σχετίζεται με τη

μείωση της πρωτεϊνικής σύνθεσης και την ικανότητα της κυτταρικής διαφοροποίησης στους περισσότερους ιστούς, ειδικά στους ιστούς της καρδιάς και στο μάτι. Έτσι, η κατανάλωση των αντιοξειδωτικών δεν αναπληρώνεται εύκολα στη μεγάλη ηλικία. Το τοπικό οξειδωτικό στρες σε συγκεκριμένα όργανα, ιστούς και οργανίδια μπορεί να διεγείρει την κυτταρική πρόσληψη και σύνθεση συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών που υπόκειται σε γενετική και ορμονική ρύθμιση. Από πολλές μελέτες έχει δεχθεί ότι η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είναι πιο αυξημένη στα ηλικιωμένα άτομα, σε σχέση με τα νεότερα (Lawler 1993, Leeuwenburgh 1994). Όμως τα επίπεδα του mRNA αυτών των ενζύμων είναι σε παρόμοια επίπεδα με αυτά των νεότερων ατόμων (Hollander 2000).

4.3. Οξειδωτικό στρες και ηπατική βλάβη

Οι δραστικές μορφές αζώτου και οξυγόνου παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόοδο της ηπατικής βλάβης, ανεξαρτήτου αιτιολογίας. Αναλυτικά, η ηπατική βλάβη μέσω μηχανισμών οξειδωτικού στρες επάγεται με τους παρακάτω τρόπους:

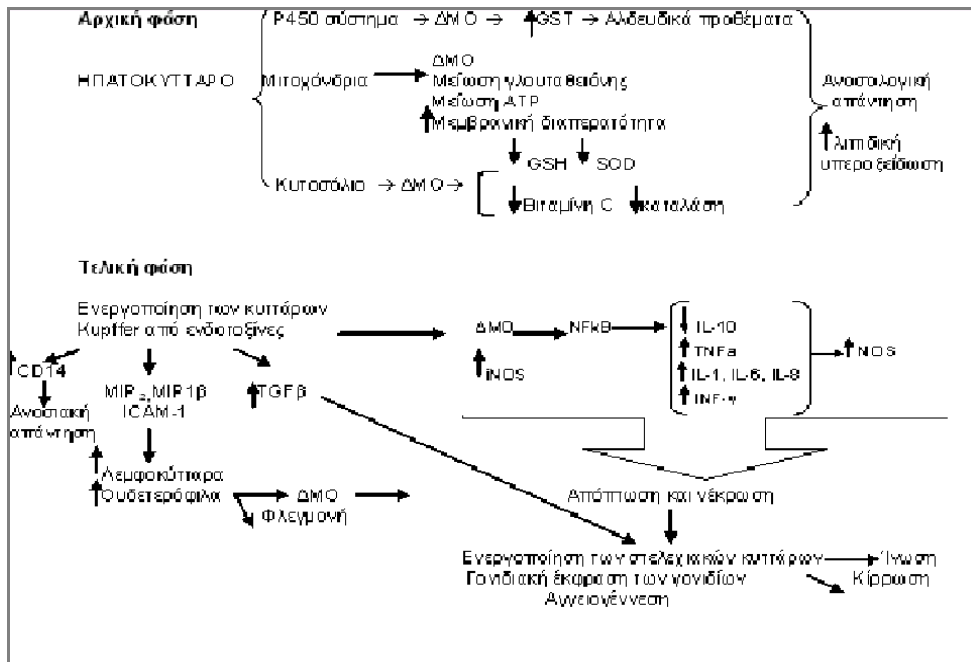
1. Μεταβολισμός ουσιών

Το κυτόχρωμα P450 είναι το κύριο μέλος της κλάσης των ενζύμων που βρίσκεται στα μικροσώμια, στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων, τα οποία παίζουν τον κύριο ρόλο στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών. Είναι οξειδάσες μικτού τύπου (Coon 2003) και συμβάλλουν στη δημιουργία ΔΜΟ (Gonzalez 2005). Για παράδειγμα τα αρωματικά συστατικά που παράγονται ως ενδιάμεσες ημικινόνες μεταβολίζονται από το κυτόχρωμα P450 και από φλαβοπρωτεΐνες που εξαρτώνται από το NADPH σε ελεύθερες ρίζες ημικινόνης που κατέχουν ένα ηλεκτροφιλικό χαρακτήρα και έτσι αντιδρούν με πυρηνόφιλα συστατικά στα κύτταρα (νουκλεϊνικά οξέα και γλουταθειόνη). Η ανηγμένη γλουταθειόνη αντιδρά με αυτές τις ελεύθερες ρίζες, προστατεύοντας άλλα πιο σημαντικά συστατικά στο κύτταρο: νουκλεϊνικά οξέα, ένζυμα που περιέχουν θείο και λιπιδικές μεμβράνες (DeLeve 1990). Αυτά τα αρωματικά συστατικά και οι οργανικοί διαλύτες μεταβολίζονται κυρίως στο ήπαρ και κατά την οξεία έκθεση σε αυτά μειώνεται η ηπατική γλουταθειόνη.

2. Ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος

Στις ηπατοπάθειες ή αλλιώς ηπατίτιδες υπάρχει φλεγμονή στο ήπαρ που χαρακτηρίζεται από την παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων στον ιστό του οργάνου. Η φαγοκυττάρωση που συμβαίνει από τα φλεγμονώδη κύτταρα (πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και στα ιστικά μακροφάγα) είναι η καλύτερη μεταβολική διεργασία που παρέχει ελεύθερες ρίζες (Babior 2000, Halliwell 1988A). Η κύρια πηγή ελευθέρων ριζών είναι η NADPH οξειδάση και η MPO. Κατά τη διάρκεια οξείας φάσης, τα πολυμορφοκύτταρα διαπερνούν τους ιστούς και απελευθερώνουν λυσοένζυμα και O_2^- που παράγεται από την NADPH οξειδάση (Halliwell 1982, McCord 1978). Η κυτταροπλασματική δισμουτάση χαλκού, ψευδαργύρου μετατρέπει το O_2^- σε H_2O_2 , που μετατρέπεται στην $OH\cdot$ ή σε $HOCl$ μέσω της MPO (Meydani 1993). Κατά τη φλεγμονώδη απάντηση ενεργοποιείται η απελευθέρωση του TNF- α , της ιντερλευκίνης 1 και 6 από τα κύτταρα της άμυνας. Αυτές οι κυτταροκίνες προάγουν την επαγωγή της σύνθεσης του NO που αυξάνει την αγγειοδιαπερατότητα και διευκολύνει τη μετανάστευση των πολυμορφοπύρρηνων στο σημείο της φλεγμονής. Επιπλέον κάποιες από τις κυτταροκίνες συνδέονται με μεμβρανικούς υποδοχείς και ενεργοποιούν ένζυμα παραγωγής ελευθέρων ριζών, όπως είναι η λιπooξειδάση, η NADPH οξειδάση και η οξειδάση της ξανθίνης (Mandrekar 2009). Οπότε η φλεγμονώδης αντίδραση επάγει τη δημιουργία ελευθέρων ριζών και οι ελεύθερες ρίζες επάγουν τη φλεγμονώδη αντίδραση, δημιουργώντας έτσι ένα φαύλο κύκλο.

Οι ίδιες οι ελεύθερες ρίζες συνεισφέρουν επίσης από μόνες τους στην ηπατική βλάβη μέσω της απόπτωσης και του κυτταρικού θανάτου (Εικόνα 79). Οι ρίζες αζώτου προσβάλλουν τα μιτοχόνδρια και προκαλούν άνοιγμα των πόρων διαπερατότητας (Bolotina 1994). Αυτό συμβάλλει στην απελευθέρωση του κυττοχρώματος C, το οποίο ενεργοποιεί την απόπτωση, ενεργοποιώντας ένα μονοπάτι κασπασών (Kondo 2002). Επίσης, προσβάλλουν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊνικά οξέα (De Maria 1996) οδηγώντας στην παραγωγή διαφόρων προϊόντων.



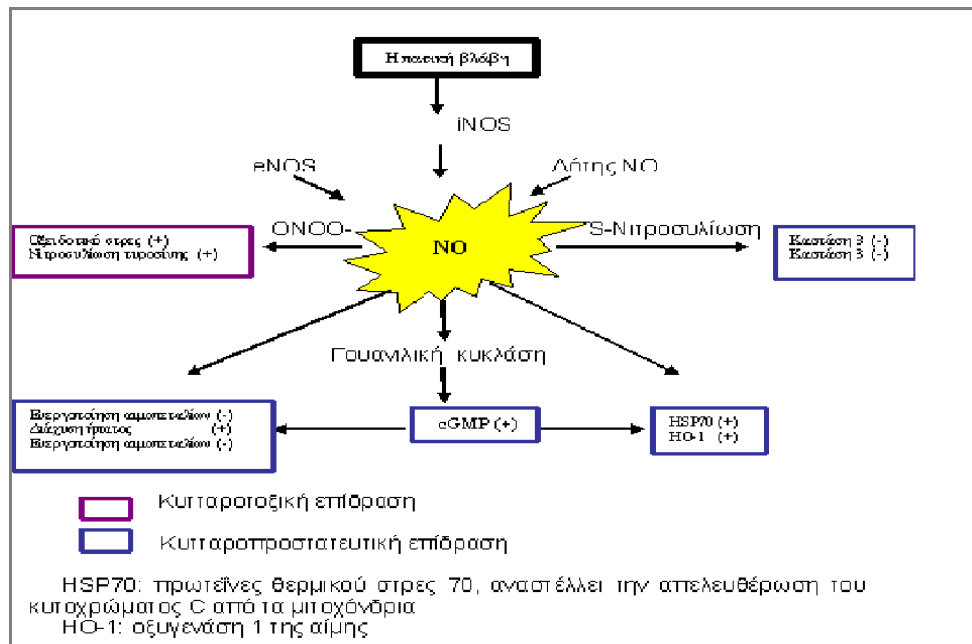
Εικόνα 79: Η αιτιοπαθογένεια της ηπατικής βλάβης μέσω ελευθέρων ριζών.

Από τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης, η MDA προκαλεί βλάβες στη μεμβρανική μεταφορά και στη μιτοχονδριακή αναπνοή (Halliwell 1987). Η 4-HNE και άλλες 4-ύδροξυ-2,3-αλκενάλες που παράγονται διεγείρουν τη σύνθεση του προκαλογόνου τύπου-1, ενεργοποιούν τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα, μετασχηματίζοντας τα σε μυοινοβλάστες και οδηγούν έτσι στην ηπατική ίνωση και κίρρωση (Lee 1995B). Στη διαδικασία της ίνωσης, σημαντικό ρόλο παίζει επίσης ο TGF-β (Poli 2000).

Επίσης, η οξειδωτική βλάβη των ιστών δημιουργεί νέα αυτοαντιγόνα με την οξείδωση των αμινοξέων και τη σύνδεση των τελικών προϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε αυτά, όπως είναι η μηλονική διαλδεύδη (Kurien 2008, Willis 2002). Η αντίδραση της υδροξυλικής ρίζας και του υπεροξυνιτρώδους με το DNA συμβάλλει επίσης στη δημιουργία νέων αντιγόνων (Dixit 2005). Οι ελεύθερες ρίζες τροποποιούν επίσης, την αντιγονική ιδιότητα της IgG ανοσοσφαιρίνης και άλλων πρωτεϊνών (Ohmori 2005). Κάθε φάρμακο που μειώνει τη φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Επίσης, τα περισσότερα αντιφλεγμονώδη φάρμακα δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Αυτό είναι προβλέψιμο από τη δομή τους, αφού οι αρωματικοί και θειολικοί δακτύλιοι αντιδρούν γρήγορα με την υδροξυλική ρίζα (Breitner 1996).

3. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO)

Το ενδογενές καθώς και το εξωγενές οξείδιο του αζώτου και μονοξείδιο του άνθρακα μπορούν να δράσουν ως σηματοδοτικά μόρια μέσω εξαρτώμενου αλλά και ανεξάρτητου από το c-GMP μηχανισμό. Το NO συντίθεται ενδογενώς από την L-αργινίνη, μέσω της δράσης της NO-συνθάσης. Υπάρχουν 3 υποκατηγορίες της NO-συνθάσης: 1) η ενδοθηλιακή (eNOS), 2) η νευρωνική (nNOS) και 3) η επαγόμενη (iNOS). Τα ηπατικά παρεγχυματικά και μη παρεγχυματικά κύτταρα εκφράζουν την iNOS, ενώ τα ηπατικά ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν την eNOS (Moncada 1991). Αν και η iNOS δεν πιστεύεται να εκφράζεται συνεχώς στο υγιές ήπαρ, υπερεκφράζεται στο ήπαρ κίρρωτικών ασθενών, καθώς και σε περιπτώσεις ηπατικής βλάβης ή αναγέννησης του ήπατος. Θεωρείται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογική απάντηση σε ποικίλες αιτίες βλάβης του ήπατος (Wiest 2002). Η έκφραση της iNOS επάγεται in vitro στα ηπατοκύτταρα και στα κύτταρα Kupffer από ενδοτοξίνες, καθώς και τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (παράγοντας νέκρωσης α, η ιντερλευκίνη-1β, η ιντερφερόνη-γ καθώς και ο συνδυασμός τους). Η ιντερλευκίνη-1β από μόνη της είναι ένας δραστικός ενεργοποιητής της iNOS στα ηπατοκύτταρα. Στα ηπατοκύτταρα του ανθρώπου και του ποντικίου η επαγωγή του iNOS από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, απαιτεί πρώτα την ενεργοποίηση του NF-kB (Hatano 2001). Έτσι στο ήπαρ που βρίσκεται σε κατάσταση φλεγμονής, τα ηπατοκύτταρα τοποθετούνται σε ένα περιβάλλον όπου το NO παράγεται από τα γειτονικά κύτταρα, καθώς επίσης και από τα ίδια. Το NO αυξάνει την κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη και νιτροσυλιώνει τις θειολικές ομάδες (γλουταθειόνη, κυστεΐνη). Το τελευταίο συμβάλλει στο να επηρεάζονται οι λειτουργίες των πρωτεϊνών. Το NO αλληλεπιδρά με το υπεροξειδικό ανιόν και το αδρανοποιεί, μειώνοντας έτσι το οξειδωτικό στρες. Όμως αυτή η αντίδραση μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία του υπεροξινιτρώδους (ONOO⁻), το οποίο προκαλεί νιτροσυλίωση της τυροσίνης των πρωτεϊνών, συμβάλλοντας στην ενζυμική και κυτταρική δυσλειτουργία. Σε γενικές γραμμές, το NO έχει κυτταροτοξικές και κυτταροπροστατευτικές δράσεις στο ήπαρ (Li 1999), (Εικόνα 80).



Εικόνα 80: Κυτταροπροστατευτική και κυτταροτοξική επίδραση του NO στο ήπαρ. Η παραγωγή του NO από την ενδοθηλιακή NO συνθάση μέσω του εξαρτώμενου από το cGMP μηχανισμό είναι ωφέλιμη για το ήπαρ. Το NO αναστέλλει την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στο αγγειακό ενδοθήλιο και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων στην περίπτωση που δημιουργείται ηπατική βλάβη μετά από κάποιο τοξικό παράγοντα. Έτσι συμβάλλει στην αναστολή της νέκρωσης. Τόσο η εξαρτώμενη όσο και η μη εξαρτώμενη από το cGMP αναστολή της ηπατικής απόπτωσης, καθώς και η εξαρτώμενη επαγωγή των προστατευτικών γονιδίων ίσως να ευθύνεται για τις κυτταροπροστατευτικές επιδράσεις του NO στο ήπαρ. Η κυτταροτοξική επίδραση του NO φαίνεται να συμπεριλαμβάνει την παραγωγή του υπεροξυνιτρώδους.

Η παραγωγή του NO από την ενδοθηλιακή NO συνθάση είναι καθαρά ωφέλιμη για το ήπαρ. Αντίθετα οι επιδράσεις της έκφρασης της επαγόμενης NO συνθάσης φαίνεται να συμπεριλαμβάνουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση του ήπατος και την ταυτόχρονη παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου, δείχνοντας ότι το NO από μόνο του δεν είναι τοξικό στα ηπατοκύτταρα αλλά απροσδόκητες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του NO και των τοξικών μορίων, όπως οι ΔΜΟ καταλήγουν σε μαζική νέκρωση στα ηπατοκύτταρα.

Οι κυτταροπροστατευτικές δράσεις του NO οφείλονται στις αντιαποπτωτικές του ιδιότητες. Το NO σε καλλιέργεια ηπατοκυττάρων συμβάλλει στην καταστολή του FAS-δεσμευτή αλλά και στην καταστολή της απόπτωσης που διαμεσολαβείται από την ανεπάρκεια γλυκόζης. Αυτές οι in vitro μελέτες έχουν υποστηριχθεί από in vivo μελέτες (Choi 2003).

Κυτταροπροστατευτική δράση έχει και το μονοξειδίο του άνθρακα που παράγεται κατά τον οξειδωτικό καταβολισμό της αίμης σε χολερυθρίνη, από την οξυγενάση της αίμης. Η οξυγενάση

της αίμης καταλύει τα αρχικά αλλά και τα περιοριστικά βήματα στον οξειδωτικό καταβολισμό της αίμης σε χολερυθρίνη, μονοξειδίο του άνθρακα και σίδηρο. Το μονοξειδίο του άνθρακα λειτουργεί ως σηματοδοτικό μόριο και αναστέλλει την απόπτωση, τον πολλαπλασιασμό, την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και την αγγειοδιαστολή. Η οξυγενάση 1 της αίμης μπορεί να επαχθεί όχι μόνο από συστατικά που περιέχουν αίμη αλλά και από ουσίες που δεν περιέχουν αίμη (Elbirt 1999).

4.4.Βιβλιογραφική ανασκόπηση της εμπλοκής του οξειδωτικού στρες στα νοσήματα του ήπατος

Το «οξειδωτικό στρες» έχει βρεθεί σχεδόν στις περισσότερες κλινικές και πειραματικές χρόνιες ηπατοπάθειες (Albano 2008, Cederbaum 2009, Choi 2006, De Minicis 2008, Mantena 2008, Medina 2005, Mehta 2002, Swietek 1997, Parola 2001, Wang 2006). Στα παραπάνω νοσήματα έχουν βρεθεί αυξημένοι δείκτες οξειδωτικής βλάβης (MDA, 4-HNE, 3-νιτροτυροσίνη, 8-OHdG και άλλα) και μειωμένοι αντιοξειδωτικοί παράγοντες (γλουταθειόνη, βιταμίνη E, βιταμίνη C, σελήνιο). Επίσης, η εμπλοκή της υπεροξειδωσης σαν ένας παράγοντας ηπατικής βλάβης από χημικές (αλκοόλ) (Bondy 1992, Cederbaum 1991, De Minicis 2008, Gundogan 2010, Higuchi 1996, Ishii 1997, Mantle 1999, Nagata 2007, Nordmann 1992) ή μικροβιακές επιδράσεις έχει δείχθει από πολλές μελέτες. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και σε ασθενείς με θαλασσαιμία (Livinrea 1996), υποδεικνύοντας πως η υποκινούμενη από το σίδηρο βλάβη στο ήπαρ παίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση των αντιοξειδωτικών.

Η ανεπάρκεια της βιταμίνης A προκαλεί οξειδωτική βλάβη στο ηπατικό μιτοχονδριακό DNA, που σχετίζεται με την αναλογία της GSH/GSSG. Αυτές οι αλλαγές σχετίζονται με αλλαγές στη λιπιδική σύσταση της μιτοχονδριακής μεμβράνης καθώς και με ελάττωση του μιτοχονδριακού δυναμικού. Επίσης, σε πειραματόζωα με έλλειψη βιταμίνης A, το ποσό της MDA και της 8-OHdG αυξάνεται σε σχέση με τα φυσιολογικά, ενώ της γλουταθειόνης μειώνεται. Αυτές οι αλλαγές αποκαθίστανται όταν τα πειραματόζωα τραφούν κανονικά με βιταμίνη A (Barber 2000).

Οι ευεργετικές δράσεις της βιταμίνης Α διαμεσολαβούνται και από τα ρετινοϊκά οξέα. Τα τελευταία συνδέονται με πυρηνικούς υποδοχείς (RXRα, RXRβ και RXRγ) ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση αρκετών γονιδίων (Bastien 2004, Shulman 2004). Συγκεκριμένα, αποσταθεροποιούν τον TNF-α στα ηπατικά μακροφάγα, την INF-γ στα Τ-βοηθητικά και μειώνουν την έκφραση γονιδίων της IL-12 και της NO συνθάσης. Επίσης, αναστέλλουν τα γονίδια των μεταλλοπρωτεϊνών (Motomura 2001).

Το περιεχόμενο του ήπατος σε σίδηρο είναι υψηλό. Ο σίδηρος όπως και όλα τα μέταλλα μετάπτωσης διευκολύνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων και ως εκ τούτου παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (Gutteridge 1989). Ο σίδηρος, που βρίσκεται συνδεδεμένος στη φερριτίνη και στην τρανσφερίνη είναι σταθερός. Αλλά όταν η φερριτίνη αποσυντίθεται από τα λυσοσώματα ή όταν ο σίδηρος απελευθερώνεται από τη φερριτίνη μέσω δράσης των ελευθέρων ριζών, τότε δημιουργείται ένα ασταθές ιόν σιδήρου (Kakhlon 2002). Το οξειδωτικό στρες επίσης προάγει την ηπατική συσσώρευση σιδήρου με το να ρυθμίζει αρνητικά την ηπατική έκφραση της επισιδίνης (Harrisson 2006), ένα πεπτιδίδιο με 25 αμινοξέα που ρυθμίζει την απορρόφηση και την κατανομή του σιδήρου (Ganz 2006).

1. Ιογενείς ηπατίτιδες

Στις ιογενείς ηπατίτιδες υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός στοιχείων που δείχνει πως στην εμμονή της μόλυνσης, στην πρόοδο της νόσου και στην καρκινογένεση εμπλέκονται οι ελεύθερες ρίζες. Μελέτες που χρησιμοποιούσαν διαγονιδιακά ζώα για να μελετήσουν τον HBV προτείνουν ότι οι ελεύθερες ρίζες από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα ίσως να συνδράμουν στην ηπατοκαρκινογένεση με παρόμοιο τρόπο που οι ελεύθερες ρίζες συμβάλλουν στη χημική καρκινογένεση (Trush 1991).

Στην ιογενή ηπατίτιδα οι ΔΜΟ παράγονται από τα ηπατοκύτταρα μέσω της απελευθέρωσης κυτταροκινών όπως είναι ο TNF-α και η IL-1β από τα φλεγμονώδη κύτταρα. Επίσης, παράγονται και από τις οξειδάσες του NADPH και της ξανθίνης που βρίσκονται στα ουδετερόφιλα και στα μακροφάγα. Επίσης η NS3, μια από τις μη-δομικές πρωτεΐνες του HCV, έχει αναφερθεί να προκαλεί απελευθέρωση δραστικών μορφών οξυγόνου (κυρίως της

υπεροξειδικής ρίζας) από τα ουδετερόφιλα μέσω της NADPH οξειδάσης τους. Αυτό συμβαίνει μέσω της αύξησης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου που με τη σειρά του ενεργοποιεί τις κινάσες της τυροσίνης και την p38 κινάση. Τα τελευταία φαινόμενα είναι απαραίτητα για τη δημιουργία ελευθέρων ριζών (Bureau 2001, Betten 2001, Mellqvist 2000). Εκτός από την NS3, η NS5a και η πρωτεΐνη του πυρηνοκαψιδίου έχουν βρεθεί να επάγουν οξειδωτικό στρες σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και σε εμβρυικά ηπατοκύτταρα πάλι με τους ίδιους μηχανισμούς (Gong 2001, Moriya 2001). Επίσης, η πρωτεΐνη του περιβλήματος του ιού προκαλεί μιτοχονδριακή βλάβη που με την σειρά της αυξάνει το οξειδωτικό στρες (Okuda 2002).

Αξίζει να αναφερθεί ότι και στην περίπτωση που δεν έχουν ακόμη ενεργοποιηθεί οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις, ο ιός μέσω των πρωτεϊνών του έχει την ικανότητα να δημιουργεί οξειδωτικό στρες με το μηχανισμό που προαναφέρθηκε. Μία αναφορά από τον Vendemiale και τους συνεργάτες του αναφέρει ότι οι φορείς του ιού με φυσιολογικά επίπεδα τρανσαμινασών, έχουν οξειδωτικό στρες χωρίς τη διαμεσολάβηση φλεγμονωδών αντιδράσεων (Vendemiale 2001). Επίσης, στους ασθενείς με ηπατίτιδα C εμφανίζεται και ηπατική στεάτωση (Negro 2010). Ο μηχανισμός δημιουργίας στεάτωσης εμπλέκει το οξειδωτικό στρες λόγω του ότι το τελευταίο προκαλεί μιτοχονδριακή βλάβη που έχει ως αποτέλεσμα να αναστέλλεται η β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενδοηπατική συσσώρευση λίπους που με την σειρά της δημιουργεί παραπέρα ελεύθερες ρίζες (Negro 2010).

Στους ασθενείς με ηπατίτιδα C, η αυξημένη 8-OHdG τόσο στον ηπατικό ιστό όσο και στα κυκλοφορούντα λευκοκύτταρα μπορεί να είναι ένας από τους παράγοντες που εμπεριέχονται στη διαδικασία της καρκινογένεσης (Farinati 1999). Υψηλά επίπεδα 8-OHdG έχουν παρατηρηθεί και στο ήπαρ ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα (Shimoda 1994). Σε άλλες μελέτες βρέθηκε πως τα ισοπροστάνια, η αναλογία οξειδωμένης/ανηγμένης γλουταθειόνης αυξάνονται σημαντικά σε ασθενείς με ηπατίτιδα C. Εντούτοις, τα ευρήματα ήταν περισσότερο έντονα στην κίρρωτική ομάδα ασθενών (Jain 2002), ενώ σε άλλες μελέτες βρέθηκε πως μετά τη θεραπεία με ιντερφερόνη τα επίπεδα της MDA μειώνονται (Romero 1998).

Σε διάφορες μελέτες έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα 8-OHdG, 4-HNE και MDA στο ήπαρ ή στον ορό ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C (Shimoda 1994, Farinati 1995, De Maria 1996,

Romero 1998, Farinati 1999, Kageyama 2000, Vendemiaie 2001). Άλλες μελέτες αναφέρουν μειωμένη ανηγμένη γλουταθειόνη στο ήπαρ και στο αίμα, αυξανόμενο λόγο οξειδωμένης προς ολική γλουταθειόνη και αυξανόμενα επίπεδα TPX στον ορό σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (Barbaro 1999, Sumida 2000, Jain 2002). Συσσώρευση 3-νιτροτυροσίνης που σχετίζεται με την ηπατοκυτταρική βλάβη έχει βρεθεί στον ιστό χρόνιων φορέων της ηπατίτιδας C (Garcia-Monzon 2000).

Τα ηπατοκυτταρικά συζεύγματα πρωτεϊνών με την 4-HNE και ο σίδηρος παρουσιάστηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C σε σχέση με τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B (Fujita 2008). Χορήγηση ιντερφερόνης φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα της 4-HNE και του αποθηκευμένου σιδήρου μόνο σε ασθενείς με ηπατίτιδα C που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία (Kageyama 2000). Θεραπεία μείωσης του σιδήρου μειώνει το οξειδωτικό στρες (μέτρηση της 8-OHdG) και βελτιώνει τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών χωρίς να επηρεάζει όμως το ιικό φορτίο (Kato 2001B, Sartori 2001). Χορήγηση βιταμίνης E μειώνει την ALT και την TPX στον ορό (Mahmood 2003).

2.Αλκοολική ηπατίτιδα

Η ικανότητα της αιθανόλης να επάγει το οξειδωτικό στρες στο ήπαρ έχει τεκμηριωθεί και οι μηχανισμοί με τους οποίους το οξειδωτικό στρες συνεισφέρει στην παθογένεια της αλκοολικής ηπατοπάθειας έχουν σχεδόν κατανοηθεί. Μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές των μιτοχονδρίων αποτελούν μια από τις αρχικές εκδηλώσεις της ηπατικής βλάβης μέσω αλκοόλ (Yip 2006). Η αιθανόλη προάγει τη δημιουργία των ελευθέρων ριζών μέσα στα μιτοχόνδρια, μειώνει τη γλουταθειόνη των μιτοχονδρίων και τα κάνει έτσι πιο ευπαθή στο οξειδωτικό στρες (Fernandez-Checa 2005). Η βλάβη των μιτοχονδρίων συμβάλλει στο να αναστέλλεται η β-οξείδωση των λιπιδίων στα μιτοχόνδρια και έτσι το λίπος συσσωρεύεται στο ήπαρ (Bailey 2002). Επιπλέον τα ποντίκια που τρέφονται με αλκοόλ παρουσιάζουν οξειδωτικές τροποποιήσεις στο μιτοχονδριακό DNA (Hoek 2002).

Η σχετική με το αλκοόλ ηπατική βλάβη εξαρτάται επίσης από την ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer και τη δευτερογενή παραγωγή προφλεγμονωδών κυταροκινών που επάγουν την έκφραση της επαγόμενης συνθάσης του NO (Korhonen 2005, Laroux 2000). Σε αυτές τις

περιπτώσεις το NO μπορεί να επάγει ή να ενισχύει την τοξικότητα της αιθανόλης με το να αλληλεπιδρά με τη δραστικότητα ορισμένων ένζυμων που μεταβολίζουν το αλκοόλ. Οι τοξικές ή προστατευτικές δράσεις του NO εξαρτώνται από την ποσότητα των δραστικών μορφών οξυγόνου που παράγονται, καθώς επίσης και από την ποσότητα της γλουταθειόνης (Beckman 1991). Χαμηλά επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου και υψηλά επίπεδα γλουταθειόνης συμβάλλουν ώστε το NO να δρα προστατευτικά, αναστέλλοντας τη λιπιδική υπεροξειδωση και την κυτταρική νέκρωση. Το αντίθετο συμβάλλει ώστε το NO να είναι επιβλαβές (Karlowitz 2000).

Ως αιτία της αλκοολικής ηπατοτοξικότητας είναι και ο TNF- α . Παρατηρήσεις σε ποντίκια όπου έπαιρναν αντισώματα έναντι αυτού του παράγοντα, καθώς και σε διαγονιδιακά ποντίκια που είχαν εξάλειψη του υποδοχέα του TNF- α έδειξε μείωση της ηπατικής βλάβης από το αλκοόλ σε αυτά (Hines 2004). Τα ηπατοκύτταρα καθώς και πολλά άλλα κύτταρα είναι ανθεκτικά στις προ-αποπτικές δράσεις του TNF- α , επειδή ο τελευταίος επάγει σήματα διάσωσης που εμπεριέχουν τη μεταγραφή των εξαρτώμενων από τον NF κ B γονιδίων και την ενεργοποίηση των μονοπατιών των πρωτεϊνικών κινασών (Schwabe 2006).

Επίσης αποτελέσματα από *in vitro* μελέτες δείχνουν ότι ο μεταβολισμός της αιθανόλης αναστέλλει την ικανότητα του PPAR α να συνδέεται στο DNA και να ενεργοποιεί γονίδια αναφοράς. Ο PPAR α είναι ο υποδοχέας που ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των υπεροξυσοσωματίων και είναι μέλος της υπεροικογένειας του υποδοχέα των πυρηνικών ορμονών (Bocos 1995). Είναι το κλειδί στη μεταγραφική ρύθμιση αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται στο σύστημα οξειδωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ (Issemann 1990). Η εκτροφή των ποντικών με αιθανόλη μείωσε τα επίπεδα του υποδοχέα X των ρετινοειδών καθώς και την ικανότητα του PPAR α /RXR να συνδέεται στο ήπαρ. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να μειώνεται η έκφραση αρκετών ρυθμιστικών γονιδίων του PPAR α που κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων (μακριά αλυσίδα της αλυσίδας της δεϋδρογονάσης του ακυλοσυνένζυμου A και η μεσαία αλυσίδα της δεϋδρογονάσης του άκυλου συνένζυμου A) ή να αποτυγχάνουν να επαχθούν (δεϋδρογονάση του ακυλοσυνενζύμου A, ηπατική καρνιτίνη, τρανσφεράση του παλμιτικού συνενζύμου A, η μακριά αλυσίδα της συνθετάσης και της δεϋδρογονάσης του άκυλου συνενζύμου A) στο ήπαρ των ζώων που τρέφονται με αιθανόλη.

Το οξειδωτικό στρες, επίσης σχετίζεται με την ανάπτυξη αλκοολικής κίρρωσης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ανοσοαντιδράσεων έναντι σε ηπατικά αντιγόνα (Mottaran 2002). Τέτοιες ανοσοαντιδράσεις οφείλονται στη δημιουργία νέων αντιγόνων ως αποτέλεσμα της αντίδρασης μεταξύ αμινοξέων των ηπατικών πρωτεϊνών και δραστικών μεταβολιτών που προέρχονται από το μεταβολισμό της αιθανόλης (Moncada 1994) και προϊόντων από τη λιπιδική υπεροξειδωση. Αυτές οι τροποποιημένες πρωτεΐνες είναι ισχυρά ανοσογονικές. Στο ήπαρ ποντικών που τρεφόταν με αλκοόλ βρέθηκαν πρωτεΐνες συνδεδεμένες με προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης (συζευγμένα διένια, MDA, 4-HNE, F2-ισοπροστάνια) (Nanji 2003). Στον ορό των κίρρωτικών ασθενών με οξεία νόσο καθώς και στους αλκοολικούς με κίρρωση ή εκτεταμένη ίνωση, τα αντισώματα ενάντια στην MDA και στην 4-HNE ήταν πολύ πιο αυξημένα σε σχέση με τους μη-αλκοολικούς υγιείς και τους μη-αλκοολικούς με κάποια άλλη ηπατική νόσο (Mottaran 2002).

Επιπλέον, η εμπλοκή της οξειδωτικής βλάβης στην τοξικότητα της αιθανόλης έχει δειχθεί από αρκετές μελέτες που δείχνουν ότι ασθενείς με στεατοηπατίτιδα είχαν αυξημένα προϊόντα λιπιδικής υπεροξειδωσης (Albano 2006, Albano 2008). Όμως τα πιο αξιόπιστα στοιχεία για το ρόλο της οξειδωτικής βλάβης στην παθογένεια της αλκοολικής ηπατικής βλάβης έρχονται από πειράματα που χρησιμοποιούσαν ζώα που τρεφόταν με αιθανόλη. Το πειραματικό μοντέλο έδειξε πως μειώνοντας το περιεχόμενο της τροφής σε ακόρεστα λιπαρά οξέα ή χορηγώντας σε ζώα αντιοξειδωτικά ή αναστολείς της δημιουργίας των ελευθέρων ριζών μειώνεται η τοπική νέκρωση και η φλεγμονή και σε ορισμένες περιπτώσεις βελτιώνεται η στεάτωση (Arteel 2003, Dey 2006, Nanji 2003, Ronis 2004).

Χορήγηση αλκοόλ μειώνει τα αποθέματα από την αντιοξειδωτική γλουταθειόνη, την καταλάση, την υπεροξειδική δισμουτάση του Cu και του Zn, τη βιταμίνη C και E. Αυτή η κατάσταση μπορεί να επιδεινωθεί σε υποσιτιζόμενους αλκοολικούς. Χορήγηση μεθειονίνης (ενός προδρόμου της γλουταθειόνης) προστατεύει ενάντια στην υποκεινούμενη από το αλκοόλ ηπατική βλάβη στα τρωκτικά ζώα (Mottaran 2002).

3. Στεάτοηπατίτιδα

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει την οξειδωτική βλάβη να εμπλέκεται στην έναρξη της ηπατικής στεάτωσης και στη δημιουργία των σωματιδίων Mallory (Albano 2005). Η αυξημένη λιπιδική υπεροξειδωση έχει βρεθεί σε ζωικά μοντέλα στεάτωσης (Berson 1998, Oliveira 2002). Αυξημένη ηπατική παραγωγή ελευθέρων ριζών έχει βρεθεί σε ασθενείς με στεατοηπατίτιδα (Chalasanani 2004). Αυτοί οι ασθενείς εκθέτουν αυξημένη έκφραση και δραστικότητα του κυτοχρώματος CYP2E1, η οποία είναι μια εν δυνάμει πηγή ελευθέρων ριζών. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί ινσουλινοαντοχή και μιτοχονδριακή βλάβη που έχει ως αποτέλεσμα να αναστέλλεται η β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Το τελευταίο συμβάλλει στην ενδοηπατική συσσώρευση λίπους που με τη σειρά της δημιουργεί περαιτέρω ελεύθερες ρίζες (Mehta 2002). Η παρατεταμένη συσσώρευση λίπους είναι το πρώτο βήμα στην παθογένεια της NASH. Το παρατεταμένο λίπος παρέχει το υπόστρωμα για τη λιπιδική υπεροξειδωση το οποίο συμβάλλει στην εμφάνιση της νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας (Sanyal 2001). Αν και πειραματικές μελέτες αλλά και μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει την ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της σοβαρότητας της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας και του βαθμού του οξειδωτικού στρες (Petta 2009) εντούτοις την αναλύσαμε για να συγκρίνουμε τα επίπεδα οξειδωτικού στρες μεταξύ ασθενών με αλκοολική και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα.

4. Αυτοάνοσα νοσήματα ήπατος

Υπάρχουν αυξανόμενα στοιχεία ότι η ανοσιακή απάντηση στα μιτοχονδριακά αυτοαντιγόνα στην ΠΧΚ είναι παθογενετική (Shimoda 2008). Προσθήκη υποχλωριώδους οξέος στα ενδοθηλιακά χολικά κύτταρα συνέβαλε στην αποκόλληση των επιθηλιακών κυττάρων από την εξωκυτταρική μήτρα προάγοντας την απόπτωση (Boise 1993, Harada 2000, Salunga 2007). Από πειράματα που έγιναν έχει δειχθεί ότι η απόπτωση επάγεται από το υποχλωριώδες οξύ με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο (McElhinney 2003, Wagner 2000). Αυτή η απόπτωση συνοδεύεται με αύξηση της δραστικότητας της κασπάσης 3 και μείωση της έκφρασης του Bcl 2. Επιπρόσθετα, η δραστικότητα του pJNK και του p53 αυξάνεται στα κύτταρα που καλλιεργούνται

με υποχλωριώδες οξύ. Το pJNK προάγει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια, την ενεργοποίηση του αποπτοσώματος και συνεπώς την ενεργοποίηση της κασπάσης 9 και 3. Το p53 επάγεται από προοξειδωτικούς παράγοντες, οδηγώντας έτσι στην ενεργοποίηση των κασπασών και τελικά στην απόπτωση.

Η ηωσινοφιλική υπεροξειδάση (EPO) και η MPO που παράγει το υποχλωριώδες οξύ συνδέεται στα λεμφοκύτταρα, στα μακροφάγα στα αιμοπετάλια στους ινοβλάστες και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η δέσμευση της EPO στα κοκκία των μαστοκυττάρων οδηγεί σε μια μακρύτερη δραστικότητα της υπεροξειδάσης. Το υποχλωριώδες οξύ δημιουργεί βλάβη στα κύτταρα μόνο σε καταστάσεις όπου είναι μειωμένη η ενδοκυτταρική γλουταθειόνη. Επίσης σε μια μελέτη τα χολικά ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσίασαν μειωμένη έκφραση της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης και μειωμένη γλουταθειόνη (Harada 2006).

Υπάρχουν πολύ λίγες μελέτες όσον αφορά στην εμπλοκή του οξειδωτικού στρες στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (Karlan 1988, Nyberg 1988, Pemberton 2004). Το οξειδωτικό στρες έχει μελετηθεί κυρίως σε ζωικά μοντέλα χολόστασης, συμπεριλαμβανομένου της απολίνωσης του χοληδόχου πόρου (Baron 1999). Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται από φλεγμονώδεις διεργασίες και πιθανώς από τις ενδοτοξίνες και τα χολικά οξέα όπως επίσης και από την συγκράτηση του χαλκού στη χολόσταση (Ljubuncic 2000, Ohhira 1995, Pastor 1997). Ιστολογικές μελέτες σε ηπατικές βιοψίες ασθενών με ΠΧΚ έδειξαν την παρουσία MDA και 4-HNE (Paradis 1997). Σε μια πρόσφατη και πιο μεγάλη μελέτη σύμπλοκα των πρωτεϊνών με την 4-HNE έχουν ανιχνευθεί σε ηπατοκύτταρα που εντοπίζονται στις πυλαίες περιοχές, καθώς επίσης και στο κυτταρόπλασμα των κατεστραμμένων αλλά και των φυσιολογικών χοληφόρων κυττάρων (Kawamura 2000).

Αυξημένα επίπεδα της υπεροξειδικής δισμουτάσης έχουν βρεθεί στον ηπατικό ιστό ασθενών με ΠΧΚ. Η αυξημένη έκφραση αυτής της πρωτεΐνης εστιάζεται στα κατεστραμμένα επιθηλιακά κύτταρα των ενδοηπατικών χοληφόρων οδών (Ono 1991). Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν σημαντικά μειωμένη ενώ η ολική γλουταθειόνη δεν ήταν σημαντικά διαφορετική από την ομάδα των μαρτύρων. Το σελήνιο και η βιταμίνη A ήταν σημαντικά μειωμένα, ενώ η βιταμίνη E και η βιταμίνη C δεν παρουσίασαν κάποια διαφορά (Aboutwerat 2003). Αυτά τα

ευρήματα προτείνουν ότι οι ελεύθερες ρίζες συμπεριλαμβανομένου του υπεροξειδικού ανιόντος μπορεί να εμπεριέχονται στην παθογένεια της ΠΧΚ. Από τις μέχρι τώρα μελέτες δεν έχει καταστεί όμως σαφές το κατά πόσο το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στα αρχικά στάδια της νόσου. Επίσης δεν έχει γίνει κάποια μελέτη που να μετρά ταυτόχρονα τα αντιοξειδωτικά ένζυμα και τα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης.

Όπως γίνεται αντιληπτό το οξειδωτικό στρες έχει μελετηθεί αρκετά σε ασθενείς με ηπατίτιδα C και στην αλκοολική, μη αλκοολική ηπατίτιδα. Στα υπόλοιπα νοσήματα του ήπατος και ειδικά στα αυτοάνοσα νοσήματα έχει μελετηθεί ελάχιστα. Η συγκεκριμένη μελέτη αποσκοπεί στη συμπλήρωση του βιβλιογραφικού κενού και στην ενίσχυση ή απόρριψη αυτών που έχουν ήδη βρεθεί.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ελεύθερες ρίζες και γενικά οι ΔΜΟ/ΔΜΑ μπορούν να βλάψουν τα κύτταρα με την υπεροξειδωση των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων, την οξειδωση των πρωτεϊνών και του DNA. Το αποτέλεσμα του σχηματισμού περισσότερων ελευθέρων ριζών από όσες μπορεί να αντιμετωπίσει ο οργανισμός χαρακτηρίζεται ως οξειδωτικό στρες. Ο Sies έχει ορίσει ως οξειδωτικό στρες την κατάσταση κατά την οποία οι ελεύθερες ρίζες υπερισχύουν έναντι της σωματικής αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού (αντιοξειδωτική ικανότητα) (Sies 1985). Έτσι, το οξειδωτικό στρες μπορεί να οφείλεται: α) στην αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου, β) στη μειωμένη απομάκρυνση τους και γ) σε συνδυασμό των ανωτέρω. Ποικίλοι παράγοντες, όπως ο τρόπος ζωής, η διατροφή, το περιβάλλον και η κληρονομικότητα μπορούν να προκαλέσουν διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προ-οξειδωτικών μηχανισμών από τη μια πλευρά και των αντιοξειδωτικών από την άλλη εις βάρος του δεύτερου σκέλους.

Οι ρίζες αζώτου και οξυγόνου λόγω της αστάθειας τους είναι δύσκολο να μετρηθούν, για αυτό στην εκτίμηση του οξειδωτικού στρες μετρώνται τα προϊόντα δράσης τους. Στις πρωτεΐνες, ένας σημαντικός βιοδείκτης που αντικατοπτρίζει την αυξανόμενη δημιουργία των δραστικών μορίων του αζώτου είναι η 3-νιτροτυροσίνη. Η 3-νιτροτυροσίνη δημιουργείται στους οργανισμούς με «νίτρωση» των υπολειμμάτων τυροσίνης, μέσω δράσης του υπεροξυνιτρώδους (ONOO⁻) (Schewemmer 2000) και μετριέται κυρίως στα ούρα. Στο DNA, ο πρωταρχικός σταθερός βιοδείκτης της βλάβης του από τις ρίζες υδροξυλίου είναι η 8-υδροξυδεοξυγουανοσίνη (8-OHdG). Η έκκριση της στα ούρα παρέχει μια εκτίμηση της συνολικής οξειδωτικής βλάβης στο DNA (Sperati 1999). Στα λιπίδια, ένα από τα πιο σημαντικά προϊόντα από τη δράση των ελευθέρων ριζών σ'αυτά είναι τα ισοπροστάνια. Τα ισοπροστάνια ανήκουν στην οικογένεια των παραγώγων των προσταγλανδινών. Είναι εικοσανοειδή που παράγονται από τη μη-ενζυμική τυχαία οξειδωση των φωσφολιπιδίων των ιστών (π.χ αραχιδονικό οξύ) από τις ρίζες οξυγόνου και

απελευθερώνονται στο πλάσμα και στα ούρα με τη δράση της φωσφολιπάσης A₂ (Roberts 2000). Η μέτρηση τους στα ούρα είναι ο πιο αξιόπιστος δείκτης.

Οι ελεύθερες ρίζες από μόνες τους καθώς και τα προϊόντα δράσης τους έχει δειχθεί από αρκετές πειραματικές μελέτες, να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην επαγωγή και στην πρόοδο της ηπατικής βλάβης (πειραματικά μοντέλα τοξικών βλαβών του ήπατος). Εντούτοις, λίγα είναι γνωστά για την εμπλοκή τους στα χρόνια νοσήματα του ήπατος σε ανθρώπους αν και στις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες φαίνεται να συμμετέχουν στη διαιώνιση και την πρόοδο της λοίμωξης καθώς και στη διαδικασία της καρκινογένεσης (Carmela 2003).

Η ηπατοπάθεια περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα αναστρέψιμων (στεάτωση) και μη αναστρέψιμων (ηπατίτιδα, ίνωση, κίρρωση) διαταραχών. Σε αρκετές μελέτες έχει βρεθεί να εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες στις ηπατοπάθειες που σχετίζονται με το αλκοόλ, τις μεταβολικές διαταραχές, την τοξική δράση φαρμάκων και τις ιογενείς λοιμώξεις του ήπατος (Jakus 1999, Macías-Rodríguez 2009, Par 2000, Peterhans 1997). Πολύ λίγες μελέτες υπάρχουν όμως για την κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών του οξειδωτικού στρες στην ηπατική βλάβη και στα αυτοάνοσα νοσήματα. Επίσης η ταυτόχρονη μέτρηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων και των προϊόντων οξειδωτικής βλάβης και των τριών βασικών βιομορίων (πρωτεϊνών, λιπιδίων και DNA) παρέχει μια πιο ολοκληρωμένη εκτίμηση του οξειδωτικού στρες, κάτι που μέχρι τώρα έχει γίνει σε ελάχιστες μελέτες. Οι περισσότερες μελέτες μέτρησαν τους μη ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και πολύ λίγες κλινικές μελέτες μετράνε ταυτόχρονα αντιοξειδωτική άμυνα και προϊόντα οξειδωτικής βλάβης.

Για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες και τη συνεισφορά του στην ηπατική ασθένεια θα πρέπει να μετρώνται τόσο τα προϊόντα οξείδωσης (ισοπροσάνια, MDA, 4-HNE, 8-OHdG, 3-νιτροτυροσίνη), τα αντιοξειδωτικά, καθώς και η έκφραση γονιδίων που έχει να κάνει με υποδοχείς (υποδοχείς ρετινοϊκών οξέων) με αντιοξειδωτικά και οξειδωτικά ένζυμα (NO συνθάση), με γονίδια που προστατεύουν από την απόπτωση όπως είναι το Bcl-2 και με γονίδια που οδηγούν στην απόπτωση. Αυτοί οι δείκτες μπορεί να συνεισφέρουν στην παρακολούθηση του βαθμού της ηπατικής βλάβης, στην απάντηση σε αντιικές θεραπείες και στο σχεδιασμό νέων θεραπευτικών στρατηγικών.

Το πιο σωστό είναι οι δείκτες της οξειδωτικής βλάβης και τα αντιοξειδωτικά να μετρώνται στον ηπατικό ιστό (αντί στο αίμα ή στα ούρα), για να αντικατοπτρίζουν την πραγματική κατάσταση του οξειδωτικού στρες στο ήπαρ, αλλά ηθικοί και πρακτικοί λόγοι το καθιστούν πολύ δύσκολο για ερευνητικούς σκοπούς. Επίσης, σε μια κλινική μελέτη εκτίμησης του οξειδωτικού στρες θα πρέπει να διερευνώνται και οι υπόλοιποι παράμετροι που το επηρεάζουν (π.χ. δείκτης σώματος μάζας, διατροφικές συνήθειες, κάπνισμα, κατανάλωση οινοπνεύματος, λήψη βιταμινών και φαρμάκων, άσκηση, άλλες ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες).

Τα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης παράγονται και σε υγιείς ανθρώπους σε χαμηλές ποσότητες. Δεν έχουν καθιερωθεί όμως, τα φυσιολογικά όρια αυτών των παραμέτρων γιατί το οξειδωτικό στρες είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία, που σχετίζεται και με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Για αυτό η οξειδωτική βλάβη και η αντιοξειδωτική άμυνα στους ασθενείς συγκρίνεται με μια ομάδα υγιών εθελοντών που δεν έχουν κάποια ηπατοπάθεια.

Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκαν ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β, ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα, ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα (πρωτοπαθής χολική κίρρωση και πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα), ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια, ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα και μια ομάδα υγιών εθελοντών (μάρτυρες). Σ' αυτούς μετρήθηκαν οι προαναφερόμενοι οξειδωτικοί δείκτες και οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες. Στις μεθόδους προσδιορισμού τους περιλαμβάνονται, ανοσοενζυμικές μέθοδοι (ELISA), ενζυμικές και χρωματομετρικές μέθοδοι. Οι παραπάνω δείκτες συσχετίστηκαν με δημογραφικά, εργαστηριακά, κλινικά, ανοσολογικά και ιστοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Σε κάθε ασθένεια ξεχωριστά συγκρίνεται το ποσό του οξειδωτικού στρες σε σχέση με τους υγιείς. Επίσης το οξειδωτικό στρες συσχετίστηκε με τους δείκτες ενεργότητας της κάθε νόσου (φλεγμονώδης δραστηριότητα, στάδιο ίνωσης, βιοχημική δραστηριότητα, ιολογική δραστηριότητα) και με την ανταπόκριση ή όχι των ασθενών στη θεραπεία.

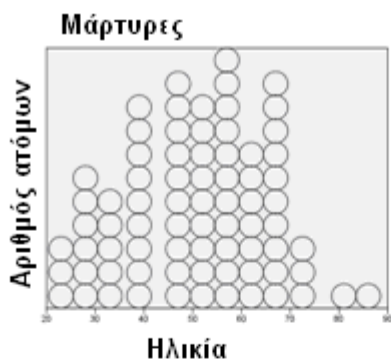
IV. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Ασθενείς

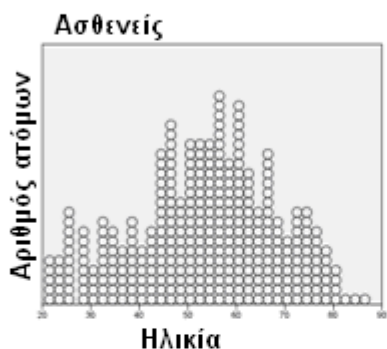
Αρχικά συλλέχθηκαν δείγματα από 52 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β, 50 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, 45 ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα, 54 ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα (πρωτοπαθής χολική κίρρωση και πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα), 30 ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια, 30 ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα και 75 υγιείς εθελοντές. Συνολικά συλλέχθηκαν δείγματα από 336 άτομα.

Απορρίφθηκαν από τη μελέτη ασθενείς που είχαν αναπτύξει πρωτοπαθή ηπατοκυτταρικό καρκίνο και ασθενείς που είχαν παράλληλα ιογενής ηπατίτιδα και κάποιο από τα αυτοάνοσα νοσήματα (αυτοάνοση ηπατίτιδα, αυτοάνοσα χολοστατικά). Οι ασθενείς αυτοί ήταν λίγοι στον αριθμό και αναλυτικά ήταν οι εξής, 7 ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα που είχαν παράλληλα και ιογενή ηπατίτιδα, 2 ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα που είχαν παράλληλα και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, 1 ασθενής με αλκοολική ηπατοπάθεια και ηπατίτιδα C, 3 ασθενείς με ηπατίτιδα C και ηπατοκυτταρικό καρκίνο, 3 ασθενείς με ηπατίτιδα Β και ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Συνολικά απορρίφθηκαν 16 ασθενείς.

Αναλύθηκαν 75 υγιείς εθελοντές, ηλικίας 51 ± 15 χρονών (εύρος ηλικίας 21-86 χρονών) ως μάρτυρες (Διάγραμμα 1) και 245 ασθενείς, ηλικίας 54 ± 15 χρονών (εύρος ηλικίας 21-84 χρονών) (Διάγραμμα 2) με τα χρόνια ηπατικά νοσήματα που προαναφέρθηκαν (Διάγραμμα 2). Συνολικά συμπεριλήφθηκαν 320 άτομα, ηλικίας 53 ± 15 χρονών και εύρος ηλικίας 21-86 χρονών (Διάγραμμα 3). Στους άνδρες παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ως προς την ηλικία μεταξύ ασθενών με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα και ασθενών με αλκοολική ηπατοπάθεια [46 ± 13 vs 56 ± 11 , $p=0.04$] και ηπατίτιδα Β [46 ± 13 vs 56 ± 15 , $p=0.04$]. Στις γυναίκες δεν υπήρχε καμία διαφορά στην ηλικία μεταξύ των ομάδων. Η κατανομή της ηλικίας συσχετίστηκε σε σχέση με το φύλο (Διάγραμμα 4). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ ασθενών και μαρτύρων στα δυο φύλα.



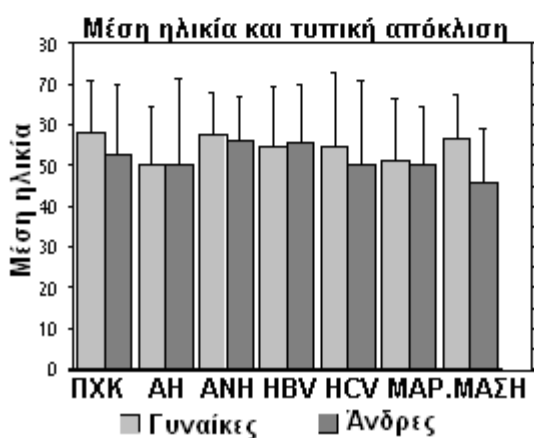
Διάγραμμα 1: Διάγραμμα διασποράς της ηλικίας στους μάρτυρες (n=75).



Διάγραμμα 2: Διάγραμμα διασποράς της ηλικίας στους ασθενείς (n=245).



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα διασποράς της ηλικίας στους ασθενείς και στους μάρτυρες (n=320).



Διάγραμμα 4: Ιστόγραμμα ηλικίας και φύλου στους ασθενείς (136 γυναίκες, 109 άνδρες) και στους μάρτυρες (38 γυναίκες, 37 άνδρες).

ΠΧΚ: Αυτοάνοσα Χολοστατικά.

ΑΗ: Αυτοάνοση Ηπατίτιδα.

ΑΝΗ: Αλκοολική Ηπατοπάθεια.

ΗΒΝ: Ηπατίτιδα Β.

ΗCΝ: Ηπατίτιδα C.

ΜΑΡ.: Μάρτυρες.

ΜΑΣΗ: Μη Αλκοολική Στεατοηπατίτιδα.

Πίνακας 21: Μέση ηλικία και τυπική απόκλιση στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες.

Κατηγορίες ασθενών (n=320)	Μέση Ηλικία ± τυπική απόκλιση	Φύλο	Μέση Ηλικία ± τυπική απόκλιση
Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (n=36)	50±15	Άνδρες(n=8)	56±13
		Γυναίκες(n=28)	51±13
Αυτοάνοσα Χολοστατικά (n=49)	56±13	Άνδρες(n=6)	56±13
		Γυναίκες(n=43)	57±13
Πρωτοπαθής χολική κίρρωση και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (n=10)	55±10	Άνδρες(n=2)	56±10
		Γυναίκες(n=8)	55±10
Μη Αλκοολική στεατοηπατίτιδα (n=25)	56±11	Άνδρες(n=13)	46±13
		Γυναίκες(n=12)	56±13
Αλκοολική νόσος ήπατος (n=29)	56±10	Άνδρες(n=27)	56±11
		Γυναίκες(n=2)	58±13
Ηπατίτιδα C (n=47)	52±19	Άνδρες(n=22)	50±20
		Γυναίκες(n=25)	55±18
Ηπατίτιδα B (n=49)	56±14	Άνδρες(n=31)	56±15
		Γυναίκες(n=18)	56±15
Μάρτυρες (n=75)	51±15	Άνδρες(n=37)	55±14
		Γυναίκες(n=38)	51±15

Οι συγκρίσεις ως προς την ηλικία μεταξύ των ομάδων έγιναν με τον παραμετρικό έλεγχο ANOVA που συγκρίνει τις διακυμάνσεις μεταξύ των ομάδων. Ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα ήταν σημαντικά πιο ηλικιωμένοι σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες και σε σχέση με τους ασθενείς με Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (Πίνακας 22).

Πίνακας 22: Στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην ηλικία των ασθενών με αυτοάνοσα χολοστατικά σε σχέση με τους μάρτυρες και σε σχέση με τους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα.

Ομάδες προς σύγκριση		Τιμή p
Αυτοάνοσα Χολοστατικά 57±13 χρονών	Μάρτυρες 51±15 χρονών	0.02
Αυτοάνοσα Χολοστατικά 57±13 χρονών	Αυτοάνοση Ηπατίτιδα 50±15 χρονών	0.03

Μελετήθηκαν 7 δείκτες οξειδωτικής βλάβης (6 προϊόντα οξειδωτικής βλάβης και ένας ένζυμο που παράγει οξυγονούχες δραστικές ενώσεις). Τα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης είναι τα ισοπροσάνια, η 4-MDA και η 4-υδροξυνοενάλη (προϊόντα οξειδωτικής βλάβης λιπιδίων), τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και η 3-νιτροτυροσίνη (προϊόντα οξειδωτικής βλάβης πρωτεϊνών), η 8-υδρόξυ-δεοξυγουανασίνη (προϊόν οξειδωτικής βλάβης DNA), η οξειδωμένη γλουταθειόνη (δείκτης οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου) και η MPO (ένζυμο που παράγει οξυγονούχες

δραστικές ενώσεις). Όσον αφορά στην αντιοξειδωτική άμυνα μελετήθηκαν 4 αντιοξειδωτικά ένζυμα (καταλάση, υπεροξειδική δισμουτάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και αναγωγάση της γλουταθειόνης) και ένας αντιοξειδωτικός παράγοντας (ανηγμένη γλουταθειόνη).

Οι ασθενείς παρακολουθούνταν στο Εξωτερικό Ηπατολογικό Ιατρείο της Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής, του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και υποβαλλόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε κλινική εξέταση και εργαστηριακές εξετάσεις. Στον φάκελο του κάθε ασθενούς υπήρχε ένα πλήρες ιστορικό τακτικού εργαστηριακού ελέγχου (γενική αίματος, πλήρες βιοχημικός έλεγχος, ιολογικός έλεγχος, ιστολογικά ευρήματα). Τα κλινικά, εργαστηριακά ευρήματα που καταγράφηκαν για κάθε ασθενή αναφέρονται στον Πίνακα 23.

Οι μάρτυρες υποβλήθηκαν σε εργαστηριακό έλεγχο (Πίνακας 24). Όλοι είχαν φυσιολογικές τρανσαμινάσες και αρνητικούς ιολογικούς δείκτες. Για τη διάγνωση παρελθόντων νοσημάτων που αφορούν το ήπαρ πάρθηκε το κατάλληλο ιστορικό. Αποκλείστηκαν μάρτυρες που πληρούσαν τα κριτήρια του Πίνακα 25.

Όλοι οι μάρτυρες και οι ασθενείς συμπλήρωσαν κατάλληλο ερωτηματολόγιο (Πίνακας 26), που αφορούσε στο δείκτη σώματος μάζας, στην εβδομαδιαία κατανάλωση κρέατος, φρούτων και λαχανικών, στις συνήθειες ποτού και καπνίσματος, στη λήψη βιταμινών και φαρμάκων καθώς και στην ύπαρξη άλλων νοσημάτων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

Πίνακας 23: Κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα που καταγράφηκαν για κάθε ασθενή.

Κλινικοεργαστηριακά δεδομένα	Περιγραφή
Διάγνωση	<ol style="list-style-type: none"> 1. Πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ). 2. ΠΧΚ αρχικού σταδίου. 3. Πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ). 4. ΠΣΧ αρχικού σταδίου. 5. Αυτοάνοση ηπατίτιδα. 6. Ηπατίτιδα Β. 7. Ηπατίτιδα C. 8. Αλκοολική ηπατοπάθεια. 9. Αλκοολική νόσος του ήπατος. 10. Μη αλκοολική στεατηπατίτιδα.
Ασθένειες σχετικές με το ήπαρ που συνυπάρχουν	<ol style="list-style-type: none"> 1. Πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ). 2. ΠΧΚ αρχικού σταδίου. 3. Πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ). 4. ΠΣΧ αρχικού σταδίου. 5. Αυτοάνοση ηπατίτιδα. 6. Ηπατίτιδα Β. 7. Ηπατίτιδα C. 8. Αλκοολική ηπατοπάθεια. 9. Αλκοολική νόσος του ήπατος. 10. Μη αλκοολική στεατηπατίτιδα.
Ασθένειες μη σχετικές με το ήπαρ	<ol style="list-style-type: none"> 1. Θυροειδοπάθεια. 2. Πνευμονοπάθεια. 3. Άσθμα. 4. Οστεοπόρωση. 5. Διαβήτης. 6. Υπερχοληστερολαιμία. 7. Δυσλιπιδαιμία. 8. Καρδιοπάθεια. 9. Υπέρταση. 10. ΑΕΕ. 11. Ημικρανία. 12. Αγγειοπάθεια. 13. Έλκος. 14. Χρόνιο αιμολυτικό νόσημα. 15. Θαλασσαιμία. 16. Αναιμία. 17. Νοσήματα προστάτη. 18. Κακοήθεια. 19. Νεφροπάθεια. 20. Ινοκυστική νόσος. 21. Ψυχιατρικά Νοσήματα. 22. Νευρολογικά Νοσήματα. 23. Λοιμώδη νοσήματα.
Αυτοάνοσα νοσήματα μη σχετικά με το ήπαρ	<ol style="list-style-type: none"> 1. Θυροειδίτιδα Hashimoto 2. Σύνδρομο Raynard 3. Σύνδρομο Sjogren 4. Σύνδρομο Crest

	5. Σύνδρομο Sicca 6. Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (RA) 7. Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (SLA) 8. Σκλήρυνση κατά πλάκας (MS) 9. Αντιφωσφολιπιδικό Σύνδρομο (APS) 10. Vitiligo (λεύκη) 11. Ψωρίαση 12. Μυοσίτιδα 13. Σκληρόδερμα 14. Ελκώδης κολίτιδα 15. Πορφυρά Henoch-Schonlein 16. Σαρκοείδωση 17. Νόσος Graves 18. Αυτοάνοση θρομβοπενία
Χρονικό διάστημα καθυστέρησης στη διάγνωση	
Διάρκεια ασθένειας	Το χρονικό διάστημα από τη στιγμή της έναρξης της νόσου έως την ημερομηνία συλλογής του δείγματος
Συμπτώματα στην έναρξη της ασθένειας και στη συλλογή του δείγματος	Κνησμός, αδυναμία, καταβολή,
Κλινικά συμπτώματα τη στιγμή συλλογής του δείγματος	Ασκίτης, εγκεφαλοπάθεια, ίκτερος
Πρόσφατη MRCP	
Πρόσφατος υπερηχοτομογραφικός έλεγχος	
Πρόσφατα ιστοπαθολογοανατομικά ευρήματα	Κίρρωση Στάδιο ίνωσης Στάδιο νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας
Πρόσφατο HBV DNA/HCV RNA	
Πρόσφατα Εργαστηριακά Ευρήματα (< 2 μήνες)	
RBC/WBC	Ερυθρά αιμοσφαίρια/Λευκά αιμοσφαίρια
HBT/HCT	Αιματοκρίτης/Αιμοσφαιρίνη
MCV/MCH/MCHC	Μέσος όγκος ερυθρών / Μέσος όγκος αιμοσφαιρίνης /
Λευκοκυτταρικός τύπος	Λευκά, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, ηωσινόφιλα
PLT (Platelets)	Αιμοπετάλια
PT (Prothrombin Time)	Χρόνος προθρομβίνης
INR (International normalized ratio)	Αναλογία του χρόνου προθρομβίνης του ασθενούς προς το φυσιολογικό δείγμα.
FER (Ferritin)	Φεριτίνη
BUN (Blood Urea Nitrogen)	Ουρία αίματος
UA (Uric Acid)	Ουρικό οξύ
CR SER (Creatinine Serum)	Κρεατινίνη ορού
CR UR (Creatinine Urine)	Κρεατινίνη ούρων
GLU (Glucoze)	Γλυκόζη
ALB (Albumin)	Αλβουμίνη ορού
TP (Total Protein)	Ολικές Πρωτεΐνες ορού
TP-ALB	Ολικές πρωτεΐνες-αλβουμίνη ορού
AST	Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση

ALT	Αλανινική αμινοτρανσφεράση
ALP	Αλκαλική Φωσφατάση
ALP τροποποιημένη (<104)	Διόρθωση της ALP στην υψηλότερη τιμή
g-GT (G-glutamyl transferase)	Γ-γλουταμινική τρανσφεράση
LDH (Lactate dehydrogenase)	Γαλακτική δεϋδρογονάση
TBIL (Total Billuribrin)	Ολική χολερυθρίνη αίματος
DBIL (Direct Billuribrin)	Άμεση Χολερυθρίνη
Cholesterole (total)	Χοληστερόλη ολική
HDL (High Density Lipoprotein)	Υψηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνη
LDL (Low Density Lipoprotein)	Χαμηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνη
TRIG (Triglyceridia)	Τριγλυκερίδια
IgG (Immunoglobulin G)	Ανοσοσφαιρίνη G
IgM (Immunoglobulin M)	Ανοσοσφαιρίνη M
IgA (Immunoglobulin A)	Ανοσοσφαιρίνη A
AFP (a-Fetoprotein)	A-Φετοπρωτεΐνη
Θεραπεία	<ol style="list-style-type: none"> 1. Διουρητικά 2. Στατίνες 3. Μυκοφαινόλη 4. Ουρσοδεοξυχολικό οξύ 5. Πρεδνιζολόνη 6. Κολχικίνη 7. Αζαθειοπρίνη 8. Μεθοτρεξάτη 9. Ιντερφερόνη-α (INF-α) 10. Νουκλεοσ(τ)ιδικά Ανάλογα 11. Θυμοσίνη
Φάρμακα σχετικά με την κύρια ηπατική νόσο	<ol style="list-style-type: none"> 1: Βιταμίνες A, K, D 2: Ασβέστιο 3: Διφωσφονικά 4: Χολεστυραμίνη 5: Άλλα φάρμακα για κνησμό 6: Υπολιπιδαιμικά φάρμακα 7: Πενικιλλαμίνη 8. Άλλα
Φάρμακα μη σχετικά με την κύρια ηπατική νόσο	<ol style="list-style-type: none"> 1. Καλσιτονίνη 2. ω₃-Λιπαρά οξέα 3. Βιταμίνη A, E 4. Σίδηρος 5. Βιταμίνη B12, φυλικό οξύ 6. Βιταμίνη B2, B6 7. Βιταμίνη C 8. Αντιβιοτικά 9. Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη 10. Αναλγητικά 11. Αντιυπερτασικά 12. Υπολιπιδαιμικά 13. Αντιθρομβωτικά 14. Αντιδιαβητικά 15. Ορμόνες 16. Θυροξίνη 17. Θυροστατικά Φάρμακα 18. Αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης, αδρεναλίνης 19. Βαρβιτουρικά

	20. Βενζοδιαζεπίνες 21. Ναρκωτικά 22. Μυοχαλαρωτικά 23. Θεοφυλλίνη και βρογχοδιασταλτικά 24. Αντιισταμινικά 25. Αναστολείς αντλίας πρωτονίων 26. Καθαρτικά 27. Αλλοπουρινόλη 28. Διεγερτικοί παράγοντες αιμοποιητικών κυττάρων 29. Σωματοστατίνη 30. Αντινεοπλασματικά
--	--

Πίνακας 24: Εργαστηριακός έλεγχος στον οποίο υποβλήθηκαν οι μάρτυρες.

Εργαστηριακές αναλύσεις	Περιγραφή
RBC/WBC	Ερυθρά αιμοσφαίρια/Λευκά αιμοσφαίρια
HBT/HCT	Αιματοκρίτης/Αιμοσφαιρίνη
MCV/MCH/MCHC	Μέσος όγκος ερυθρών / Μέσος όγκος αιμοσφαιρίνης /
Λευκοκυτταρικός τύπος	Λευκά, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, ηωσινόφιλα
PLT (Platelets)	Αιμοπετάλια
PT (Prothrombin Time)	Χρόνος προθρομβίνης
INR (International normalized ratio)	Αναλογία του χρόνου προθρομβίνης του ασθενούς προς το δείγμα μάρτυρος.
FER (Ferritin)	Φεριτίνη
BUN (Blood Urea Nitrogen)	Ουρία αίματος ορού
UA (Uric Acid)	Ουρικό οξύ ορού
CR SER (Creatinine Serum)	Κρεατινίνη ορού
CR UR (Creatinine Urine)	Κρεατινίνη ούρων
GLU (Glucoze)	Γλυκόζη
ALB (Albumin)	Αλβουμίνη αίματος
TP (Total Protein)	Ολικές Πρωτεΐνες
TP-ALB	Ολικές πρωτεΐνες-αλβουμίνη
AST	Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση
ALT	Αλανινική αμινοτρανσφεράση
ALP	Αλκαλική Φωσφατάση
ALP τροποποιημένη (<104)	Διόρθωση της ALP στην υψηλότερη τιμή 104
g-GT (G-glutamate transferase)	Γ-γλουταμινική τρανσφεράση
LDH (Lactate dehydrogonase)	Γαλακτική δεϋδρογονάση
TBIL (Total Billuribrin)	Ολική χολερυθρίνη ορού
DBIL (Direct Billuribrin)	Άμεση Χολερυθρίνη
Cholesterole (total)	Χοληστερόλη ολική
HDL (High Density Lipoprotein)	Υψηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνη
LDL (Low Density Lipoprotein)	Χαμηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνη
TRIG (Triglyceridia)	Τριγλυκερίδια
AFP (a-Fetoprotein)	α-Φετοπρωτεΐνη

Πίνακας 25: Κριτήρια αποκλεισμού μαρτύρων.

1. Παθολογικά εργαστηριακά ευρήματα και ειδικά αυτών που σχετίζονται με τα προς μελέτη νοσήματα του ήπατος σε προηγούμενους εργαστηριακούς ελέγχους.
2. Ίκτερος ή κνησμός στο παρελθόν.
3. Μετάγγιση αίματος στο παρελθόν.
4. Χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών
5. Χρήση κοινόχρηστων συριγγών ή βεντουζών στο παρελθόν.
7. Ύπαρξη αυτοάνοσου ηπατικού νοσήματος ή ιογενούς ηπατίτιδας σε συγγενικό τους πρόσωπο.
8. Παρουσία άλλων νοσημάτων που σχετίζονται με το ήπαρ (φαρμακευτική ηπατίτιδα, αιμοχρωμάτωση, νόσος Wilson).
9. Παρουσία καρκίνου.

Πίνακας 26: Ερωτηματολόγιο που συμπλήρωσαν ασθενείς και μάρτυρες.

1. Φύλλο: Άνδρας Γυναίκα
2. Ημερομηνία Γέννησης: ___ / ___ / _____
3. Βάρος: _____
4. Ύψος: _____
5. Είδος εργασίας (περιγραφή): _____
 Χειρωνακτική Ελαφρή Καθιστική
6. Πόσο συχνά τρώτε κρέας:
 κάθε μέρα 3-4 φορές/ εβδομάδα 1-2 φορές/εβδομάδα Καθόλου (φυτοφάγος)
7. Πόσες μερίδες φρούτων ή λαχανικών καταναλώνετε;
(Μια μερίδα αντιστοιχεί σε ένα μήλο, ή πορτοκάλι, ή μισή φέτα καρπούζι ή πεπόνι, ή 10-15 κεράσια, ή 2 σύκα κτλ)
 1-4 την εβδομάδα 1 την ημέρα 2-3 την ημέρα 4-5 την ημέρα
8. Πόσες μερίδες λαχανικών καταναλώνετε; _____
(Μια μερίδα αντιστοιχεί σε μια ατομική σαλάτα ή αντίστοιχη ποσότητα λαχανικών).
 1-4 την εβδομάδα 1 την ημέρα 2-3 την ημέρα 4-5 την ημέρα
9. Παίρνετε συμπληρώματα διατροφής ή βιταμίνες;
 Ναι Όχι
Αν ναι περιγράψτε _____
10. Έχετε κάποιο χρόνιο πρόβλημα υγείας;
 Όχι Ναι
Αν ναι περιγράψτε _____

11. Παίρνετε φάρμακα;
 Όχι Ναι
 Αν ναι περιγράψτε _____

12. Αθλείστε;
 Όχι Ναι
 Αν ναι, πόσο συχνά;
 Καθημερινά 2-4 φορές/εβδομάδα 1 φορά/εβδομάδα Σπάνια

13. Πίνετε οινοπνευματώδη;
 Όχι Ναι
 Αν ναι πόσο συχνά;
 Καθημερινά 2-4 φορές/εβδομάδα 1 φορά/εβδομάδα Σπάνια
 Αν πίνετε οινοπνευματώδη, πόσο πίνετε κάθε φορά;
 (Παράδειγματα: 1 ποτήρι κρασί, 1 μπουκάλι μπύρα, 2 ποτήρια ούισκου κτλ).

14. Καπνίζετε;
 Όχι Ναι
 Αν καπνίζετε πότε αρχίσατε (χρονολογία, π.χ. 1996) _____
 Πόσα τσιγάρα καπνίζετε την ημέρα (αριθμός, π.χ. 30) _____
 Περιγράψτε αναλυτικά
 Παράδειγμα
 Από **1998** Έως **2002** Αριθμός τσιγάρων την ημέρα **40**
 Από _____ Έως _____ Αριθμός τσιγάρων την ημέρα _____
 Από _____ Έως _____ Αριθμός τσιγάρων την ημέρα _____
 Από _____ Έως _____ Αριθμός τσιγάρων την ημέρα _____

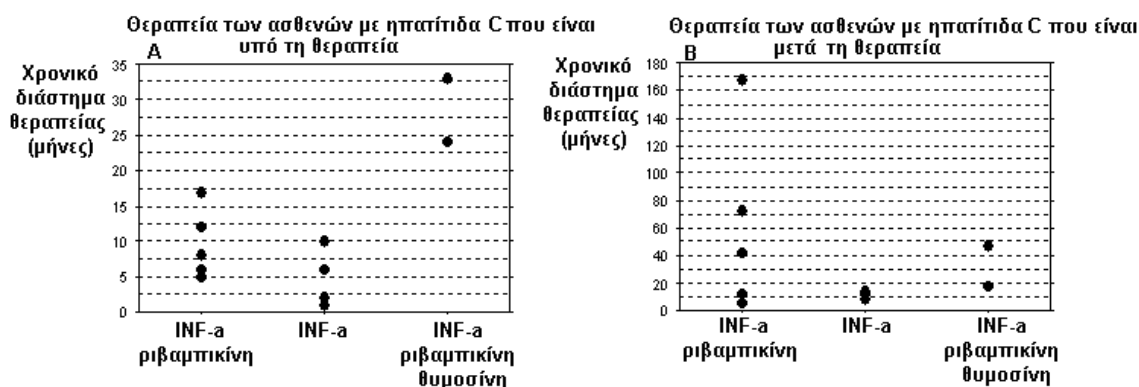
Τα χαρακτηριστικά των ασθενών και των μαρτύρων που σχετίζονται με τους Πίνακες 23 και 26 φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 27. Στα χρόνια καπνίσματος (pack years) δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των διαφόρων ομάδων των ασθενών. Εξαιρέση ήταν η ομάδα των ασθενών με αλκοολική ηπατοπάθεια, που είχαν στατιστικώς σημαντικά περισσότερα χρόνια καπνίσματος από τους ασθενείς με ηπατίτιδα C [45±28 vs 24±31, p=0.01]. Αυτοί που διέκοψαν το κάπνισμα είχαν μέσο όρο 13 χρόνια που το σταμάτησαν.

Πίνακας 27: Ανθρωπομετρικά και δημογραφικά στοιχεία ασθενών και μαρτύρων.

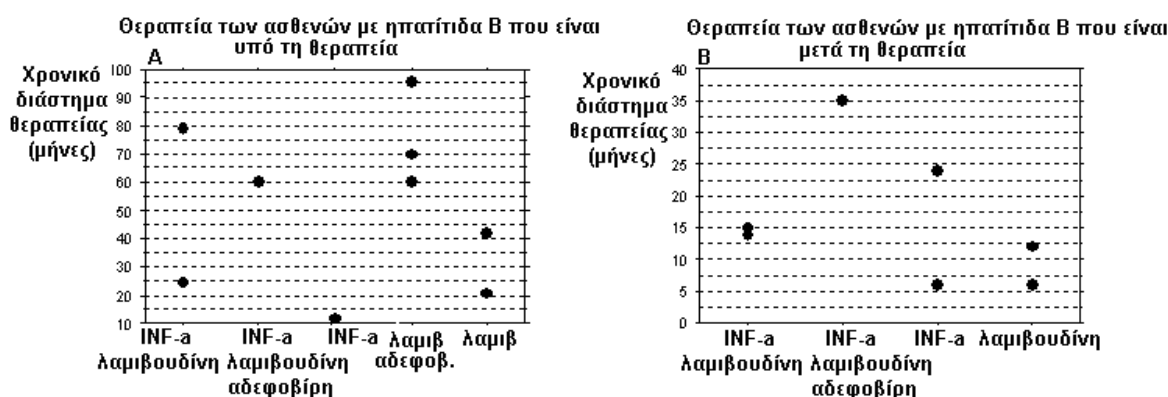
	Μάρτυρες	ΠΧΚ	ΑΗ	ΜΑΣΗ	ΑΝΗ	ΗΒV	ΗCν
ΔΣΜ [kg/(h)²]	26±4	26±4	26±6	30±6	26±4	26±5	25±4
Κάπνισμα	33%	16%	16%	23%	86%	20%	23%
Χρόνια καπνίσματος (Pac years)	29±24	29±27	27±59	23±25	45±28	34±28	24±31
Κατανάλωση Αλκοόλ	36%	24%	16%	27%	13%	18%	21%
1-7 ποτά/εβδομάδα	100%	100%	100%	80%	85%	80%	85%
7-20 ποτά/εβδομάδα	-	-	-	20%	15%	20%	15%
Παρελθοντική κατανάλωση αλκοόλ	-	4%	11%	13%	87%	27%	13%
Χρόνος διακοπής από το αλκοόλ (μήνες)	-	96±12	82±10	24±17	26±27	125±101	70±30
Εργασία ελαφρή-καθιστική	64%	80%	94%	80%	60%	63%	83%
Εργασία Χειρωνακτική-βαριά	36%	20%	6%	20%	40%	37%	17%
Κατανάλωση κρέατος >4φορές/εβδομάδα	35%	20%	26%	11%	20%	24%	10%
Κατανάλωση φρούτων >7φορές/εβδομάδα	55%	52%	60%	25%	33%	60%	62%
Κατανάλωση λαχανικών >7φορές/εβδομάδα	80%	53%	80%	50%	45%	60%	53%
Υπερχοληστερολαιμία	25%	53%	47%	20%	20%	37%	9%
Διαβήτης	-	8%	16%	20%	20%	12%	11%
Άλλα αυτοάνοσα νοσήματα	-	29%	44%	10%	-	6%	9%
Στατίνες	-	25%	11%	36%	10%	12%	4,5%

Κάθε ομάδα ασθενών υποβλήθηκε σε ειδική θεραπεία. Οι ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια και με στεατοηπατίτιδα, δεν έλαβαν κάποια θεραπεία για τη κύρια νόσο. Οι ασθενείς με ιογενή ηπατίτιδα, που λήφθηκε το δείγμα κατά τη διάρκεια της θεραπείας, έλαβαν τα παρακάτω θεραπευτικά σχήματα. Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (n=13), ελάμβαναν ιντερφερόνη+ριμπαβικίνη (n=6), ιντερφερόνη+ριμπαβικίνη+θυμοσίνη (n=2), ιντερφερόνη (n=5) (Διάγραμμα 9Α). Το χρονικό διάστημα που ελάμβαναν θεραπεία ήταν 10±12 μήνες, εύρος θεραπείας 1-33 μήνες. Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B (n=11) ελάμβαναν ιντερφερόνη+νουκλεοσ(τ)ιδικά ανάλογα (n=4), ιντερφερόνη (n=2), νουκλεοσ(τ)ιδικά ανάλογα (n=5) (Διάγραμμα 10Α). Το χρονικό διάστημα θεραπείας που ελάμβαναν ήταν 46±31 μήνες, εύρος θεραπείας 1-96 μήνες.

Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C που είχαν σταμάτησει τη θεραπεία τη στιγμή της μελέτης (n=13) ελάμβαναν ιντερφερόνη+ριμπαβιρίνη (n=8), ιντερφερόνη+ριμπαβικίνη+θυμοσίνη (n=2), ιντερφερόνη (n=3). Το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε από τη διακοπή της θεραπείας μέχρι τη συλλογή του δείγματος ήταν 30±15 μήνες, με εύρος 6-64 μήνες. Το χρονικό διάστημα της θεραπείας ήταν 33±45 μήνες, με εύρος 6-168 μήνες (Διάγραμμα 9B). Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B που διέκοψαν τη θεραπεία (n=8) ελάμβαναν ιντερφερόνη+νουκλεοσ(τ)ιδικά ανάλογα (n=4), ιντερφερόνη (n=2), νουκλεοσ(τ)ιδικά ανάλογα (n=2). Το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε από τη διακοπή της θεραπείας μέχρι τη συλλογή του δείγματος ήταν 67±48 μήνες, εύρος 13-156 μήνες. Το χρονικό διάστημα της θεραπείας ήταν 16±10 μήνες, εύρος 6-36 μήνες (Διάγραμμα 10B).



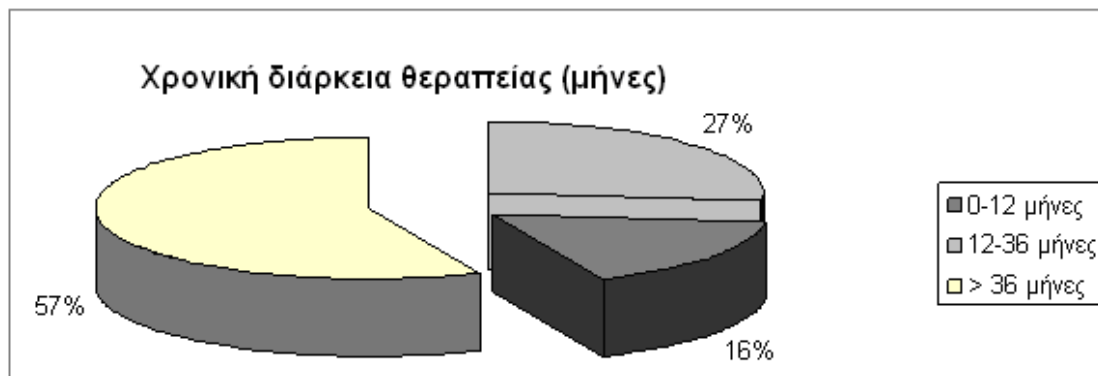
Διάγραμμα 9: Θεραπευτικά σχήματα και το χρονικό διάστημα της θεραπείας (σε μήνες) που έλαβαν οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C. Α) Ασθενείς που είναι υπό τη θεραπεία, Β) Ασθενείς που είναι μετά τη θεραπεία.



Διάγραμμα 10: Θεραπευτικά σχήματα και το χρονικό διάστημα της θεραπείας (σε μήνες) που έλαβαν οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B. Α) Ασθενείς που είναι υπό τη θεραπεία, Β) Ασθενείς που είναι μετά τη θεραπεία.

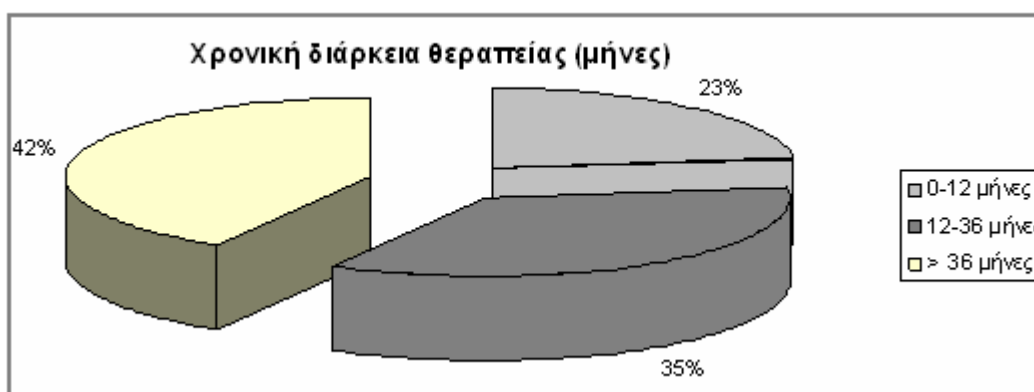
Η πλειοψηφία των ασθενών (34/36) με αυτοάνοση ηπατίτιδα ελάμβαναν θεραπεία. Τα σχήματα θεραπείας που ελάμβαναν ήταν πρεδνιζολόνη+μυκοφαινόλη (67%),

πρεδνιζολόνη+μυκοφαινόλη+ουρσοδεοξυλικό οξύ (16%), ουρσοδεοξυλικό οξύ (9%), πρεδνιζολόνη (8%). Δύο ασθενείς είχαν λάβει στο παρελθόν και αζαθειοπρίνη (>40 μήνες από τη διακοπή). Στο διάγραμμα 11 φαίνεται η χρονική διάρκεια της θεραπείας. Το 57% των ασθενών που ελάμβανε θεραπεία >36 μήνες, ο δε μέσος όρος της θεραπείας ήταν κατά μέσο όρο 65 ± 21 μήνες, (εύρος θεραπείας 41-101 μήνες).



Διάγραμμα 11: Χρονική διάρκεια θεραπείας ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδας (μήνες).

Το 86% των ασθενών με αυτοάνοσα χολοστατικά ελάμβαναν θεραπεία με ουρσοδεοξυλικό οξύ (86% του συνόλου). Στο διάγραμμα 12 φαίνεται η χρονική διάρκεια της θεραπείας. Το 42% των ασθενών ελάμβαναν θεραπεία >36 μήνες, ο δε μέσος όρος της θεραπείας σε αυτούς ήταν 63 ± 30 μήνες (εύρος θεραπείας 38-168 μήνες).



Διάγραμμα 12: Χρονική διάρκεια θεραπείας ασθενών με αυτοάνοσα χολοστατικά (μήνες).

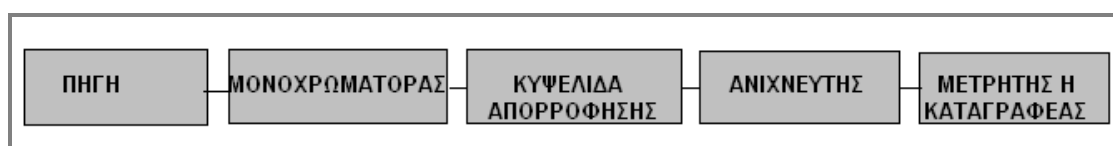
2. Μέθοδοι

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι μέτρησης των προϊόντων οξειδωτικής βλάβης και της αντιοξειδωτικής άμυνας σε βιολογικά υγρά. Για την παρούσα μελέτη αρχικά έγινε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση των μεθόδων που ήδη υπάρχουν στη βιβλιογραφία και έγινε μια προσπάθεια πρακτικής εφαρμογής των καταλληλότερων μεθόδων και συνθηκών μέτρησης της κάθε παραμέτρου. Οι μέθοδοι αυτοί περιλαμβάνουν χρωματογραφία, φασματοφωτομετρία, χρωματομετρικές τεχνικές, ανοσοενζυμικές και ενζυμικές μεθόδους.

2.1 Φασματοφωτομετρικές τεχνικές

2.1.1. Αρχές φασματοφωτομετρίας

Τα όργανα που χρησιμοποιούνται στη μελέτη της απορρόφησης ή εκπομπής της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος καλούνται «φασματοόμετρα» ή «φασματοφωτόμετρα». Οι οπτικές και ηλεκτρονικές αρχές που χρησιμοποιούνται σε αυτά τα όργανα είναι βασικά οι ίδιες για όλες τις περιοχές του φάσματος, από το υπεριώδες υπό κενό μέχρι το άπω υπέρυθρο. Υπάρχουν πάντως μερικές σημαντικές διαφορές στα εξαρτήματα που χρησιμοποιούνται ειδικά στις διάφορες περιοχές. Τα ουσιώδη εξαρτήματα ενός φασματοφωτομέτρου είναι 1) μια σταθερή πηγή ακτινοβολίας 2) ένα σύστημα φακών, καθρεπτών και σχισμών που ορίζουν, ευθυγραμμίζουν και εστιάζουν τη δέσμη 3) ένας μονοχρωμάτορας για την ανάλυση της ακτινοβολίας σε επί μέρους μήκη κύματος ή «ζώνες» μηκών κύματος, 4) μια διαφανής κυψελίδα για το δείγμα και 5) ένας ανιχνευτής ακτινοβολίας με ένα σύστημα μέτρησης (ανάγνωση ή καταγραφή). Πολλά όργανα είναι πιο πολύπλοκα αλλά όλα είναι παραλλαγές του διαγράμματος της Εικόνας 81 (Harris 1987).



Εικόνα 81: Διάγραμμα ενός φασματοφωτομέτρου.

1. Πηγές Ακτινοβολίας

Οι πηγές ακτινοβολίας αποτελούνται από υλικά που διεγείρονται σε υψηλές ενεργειακές καταστάσεις με ηλεκτρικές εκκενώσεις υψηλής τάσης ή με ηλεκτρική θέρμανση. Μια ιδανική πηγή ακτινοβολίας για μετρήσεις απορρόφησης θα πρέπει να εκπέμπει ένα συνεχές φάσμα υψηλής και ομοιόμορφης έντασης σε όλη την περιοχή μήκους κύματος που μας ενδιαφέρει. Η ένταση όμως μιας πραγματικής πηγής μεταβάλλεται με το μήκος κύματος. Η μεταβολή της ηλεκτρικής τάσης που εφοδιάζει με ενέργεια την πηγή μετατοπίζει την καμπύλη έντασης-μήκους κύματος, συνεπώς χρειάζεται μια σταθερή τροφοδότηση για συγκριτικές μετρήσεις απορρόφησης όταν χρησιμοποιούνται όργανα απλής δέσμης. Αλλιώς, η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μπορεί να μεταβάλλεται μεταξύ του χρόνου σταθεροποίησης του οργάνου και του χρόνου μέτρησης της εξερχόμενης ακτινοβολίας από το δείγμα, προκαλώντας σφάλμα στη μετρούμενη διαπερατότητα του δείγματος. Τα όργανα διπλής δέσμης είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε τα I_0 και I_1 να μετρούνται και να συγκρίνονται συγχρόνως. Σε αυτά τα όργανα δεν είναι τόσο αναγκαία πηγή μεγάλης σταθερότητας (Thomas 1996).

Πηγές υπεριώδους ακτινοβολίας. Οι λυχνίες υδρογόνου και δευτέρου είναι οι πιο κοινές πηγές υπεριώδους ακτινοβολίας. Αποτελούνται από ένα ζεύγος ηλεκτροδίων μέσα σε ένα γυάλινο σωλήνα εφοδιασμένο με παράθυρο από χαλαζία και γεμάτο από υδρογόνο ή δεύτερο σε χαμηλή πίεση. Αν εφαρμόσουμε στα ηλεκτρόδια σταθερή υψηλή τάση, γίνεται ηλεκτρονική εκκένωση η οποία διεγείρει και άλλα ηλεκτρόνια από τα μόρια του αερίου σε υψηλές ενεργειακές καταστάσεις. Καθώς τα ηλεκτρόνια επιστρέφουν στις θεμελιώδεις καταστάσεις, εκπέμπουν ακτινοβολία που είναι συνεχής στην περιοχή μεταξύ 180 και 350 nm. Παρόμοια, σαν πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας χρησιμοποιείται και λυχνία εκκένωσης με ξένο. Η λυχνία ξένου παράγει υψηλότερη ένταση ακτινοβολίας, αλλά δεν είναι τόσο σταθερή όσο η λυχνία υδρογόνου. Εκπέμπει επίσης και ορατή ακτινοβολία, που είναι παρασιτική για εφαρμογές στο υπεριώδες (Thomas 1996).

Πηγές ορατής ακτινοβολίας: Μια λυχνία με νήμα από βολφράμιο είναι η πιο ικανοποιητική και πιο φθηνή πηγή ορατής και εγγύς υπέρυθρης ακτινοβολίας. Το νήμα θερμαίνεται με μια σταθερή πηγή ρεύματος. Το νήμα βολφραμίου εκπέμπει συνεχή ακτινοβολία, στην περιοχή

μεταξύ 350 και 2500 nm. Το τόξο άνθρακα παράγει πιο έντονη ορατή ακτινοβολία, αλλά σπάνια χρησιμοποιείται (Thomas 1996).

2. Μονοχρωμάτορες

Όπως αναφέραμε, οι πηγές ακτινοβολίας που χρησιμοποιούνται συνήθως εκπέμπουν συνεχή ακτινοβολία σε μεγάλες περιοχές μηκών κύματος. Πρέπει όμως να χρησιμοποιούνται συσκευές που διαχωρίζουν τις φαρδιές ζώνες της πολυχρωματικής ακτινοβολίας της πηγής σε στενές ζώνες ή καλύτερα σε μονοχρωματική ακτινοβολία. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται δυο διαφορετικές διατάξεις: τα φίλτρα και οι μονοχρωμάτορες. Τα φίλτρα παρασκευάζονται από ειδικά υλικά που επιτρέπουν τη μετάδοση μόνο ορισμένης περιοχής μήκους κύματος, απορροφώντας όλη την άλλη περιοχή. Τα φίλτρα αυτά μεταδίδουν ακτινοβολία με πραγματικό πλάτος ζώνης από 20 μέχρι 50 nm. Ο μονοχρωμάτορας διαχωρίζει την πολυχρωματική ακτινοβολία σε επί μέρους μήκη κύματος και απομονώνει αυτά σε πολύ στενές ζώνες με πραγματικό πλάτος από 35 μέχρι 0,1 nm. Τα συστατικά ενός μονοχρωμάτορα είναι: 1) μια σχισμή εισόδου που δέχεται την πολυχρωματική ακτινοβολία από την πηγή, 2) μια διάταξη ευθυγράμμισης, φακός ή καθρέπτης, 3) μια διάταξη διασποράς, πρίσμα ή φράγμα, που διαχωρίζει την ακτινοβολία σε πολλά μήκη κύματος, 4) ένας φακός ή καθρέπτης εστίασης και 5) μια σχισμή εξόδου. Όλα τα μέρη του μονοχρωμάτορα πρέπει να επιτρέπουν τη διέλευση των μηκών κύματος της περιοχής που μελετάμε και το όλο σύστημα να βρίσκεται σε σκοτεινό περίβλημα (Harris 1987).

Πρίσματα: Το πρίσμα διαχωρίζει την πολυχρωματική ακτινοβολία σε μικρές ζώνες μήκους κύματος που εξέρχονται από το πρίσμα με ελαφρώς διαφορετικές κατευθύνσεις. Για να κατευθύνουμε το επιθυμητό μήκος κύματος προς τη σχισμή εξόδου, περιστρέφουμε κατάλληλα το πρίσμα (Harris 1987).

Φακοί και καθρέφτες. Η ακτινοβολία ευθυγραμμίζεται και εστιάζεται με φακούς και καθρέφτες. Τα χρησιμοποιούμενα υλικά για φακούς πρέπει να είναι διαπερατά από την ακτινοβολία που θα χρησιμοποιηθεί. Στην υπέρυθη περιοχή χρησιμοποιούμε καθρέπτες, γιατί πολλά υλικά δεν είναι διαπερατά από την υπέρυθη ακτινοβολία και προκαλούν σημαντικές απώλειες ενέργειας (Harris 1987).

3. Χειρισμός δείγματος

Τα δείγματα για μελέτη στην υπεριώδη ή ορατή περιοχή είναι συνήθως αέρια ή διαλύματα και τοποθετούνται σε κυψελίδες. Στην υπεριώδη περιοχή χρησιμοποιούνται κυψελίδες από χαλαζία ή λιωμένο SiO_2 , το συνηθισμένο γυαλί ή ο ακριβότερος χαλαζίας χρησιμοποιούνται στην ορατή περιοχή. Οι κυψελίδες υγρών έχουν μήκος από 1 μέχρι 10 cm (Harris 1987).

4. Ανιχνευτές

Ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται οι ανιχνευτές υπεριώδους και ορατής ακτινοβολίας. Τα υπεριώδη και ορατά φωτόνια έχουν αρκετή ενέργεια για να διώξουν ηλεκτρόνια όταν προσκρούουν σε επιφάνειες κατεργασμένες με ειδικές ενώσεις. Η απορρόφηση τους μπορεί να προκαλέσει επίσης σε ορισμένους ημιαγωγούς, τη μετακίνηση μη αγώγιμων ηλεκτρονίων σε ζώνες αγωγιμότητας. Και οι δυο διαδικασίες παράγουν ένα ηλεκτρικό ρεύμα που είναι ανάλογο με την ένταση των απορροφημένων φωτονίων. Οι συσκευές που χρησιμοποιούν τέτοια συστήματα καλούνται φωτοηλεκτρικοί ανιχνευτές και φωτοβολταϊκά στοιχεία (Thomas 1996).

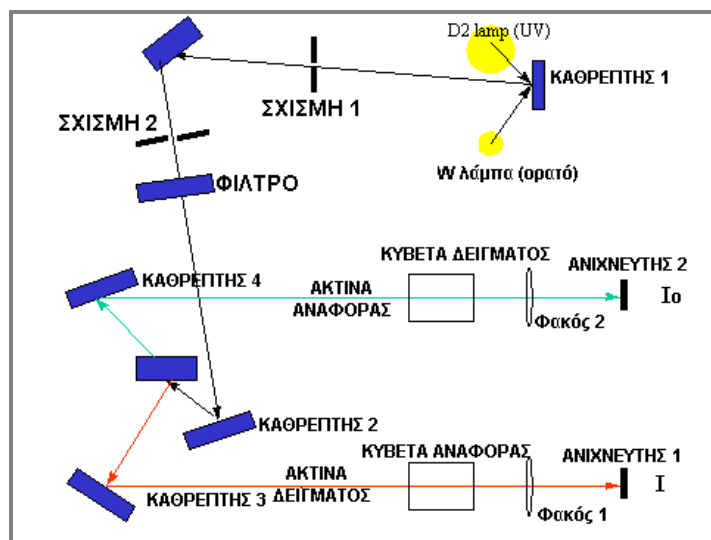
5. Ενίσχυση και μέτρηση των σημάτων ανίχνευσης

Το ηλεκτρονικό σήμα που παράγεται από έναν ανιχνευτή ακτινοβολίας, πρέπει να μετατραπεί σε μια μορφή που ο πειραματιστής να μπορεί να την ερμηνεύσει. Η διαδικασία αυτή γίνεται με ενισχυτές, αμπερόμετρα, ποτενσιόμετρα και καταγραφικά ποτενσιόμετρα. Ένας ενισχυτής παίρνει ένα σήμα εισόδου από το κύκλωμα ανίχνευσης και έπειτα από μια σειρά ηλεκτρονικών λειτουργιών παράγει ένα σήμα εξόδου που είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό της εισόδου. Ο παράγοντας ενίσχυσης (ο λόγος εξόδου προς είσοδο) καλείται το κέρδος του ενισχυτή. Τα σήματα ενίσχυσης εισόδου και εξόδου είναι συνήθως ηλεκτρικές τάσεις. Ως όργανα ανάγνωσης χρησιμοποιούνται αμπερόμετρα, ποτενσιόμετρα και καταγραφικά ποτενσιόμετρα (Pecsok 1980).

6. Όργανα απλής και διπλής δέσμης

Απλή δέσμη: Μια δέσμη ακτινοβολίας από την πηγή εισέρχεται στο μονοχρωμάτορα και διαχωρίζεται από ένα πρίσμα ή φράγμα. Οι διάφορες ζώνες της ακτινοβολίας εστιάζονται στη σχισμή εξόδου, καθώς το στοιχείο διαχωρισμού περιστρέφεται. Η ακτινοβολία περνάει έπειτα από την κυψελίδα και εισέρχεται στον ανιχνευτή.

Διπλή δέσμη: Τα όργανα διπλής δέσμης χρησιμοποιούν ένα είδος διαχωρισμού της δέσμης προ του δείγματος. Η μια δέσμη κατευθύνεται στο «τυφλό» και η άλλη στο δείγμα (Εικόνα 82). Οι δυο δέσμες συγκρίνονται είτε σύγχρονα είτε εκ περιτροπής πολλές φορές το δευτερόλεπτο. Έτσι στη διάταξη διπλής δέσμης οι διακυμάνσεις στην ένταση της πηγής, η απόκριση του ανιχνευτή και το κέρδος του ενισχυτή αντισταθμίζονται παρατηρώντας το λόγο του σήματος μεταξύ «τυφλού» και δείγματος. Τα όργανα διπλής δέσμης είναι πολύπλοκα μηχανικά και ηλεκτρονικά και γι αυτό είναι πιο ακριβά (Pecsok 1980).



Εικόνα 82: Σχεδιάγραμμα φασματοφωτομέτρου διπλής δέσμης.

2.1.2. Φασματοφωτομετρικές-Χρωματομετρικοί μέθοδοι

Οι μέθοδοι αυτοί βασίζονται στην ιδιότητα ορισμένων ουσιών να απορροφούν έντονα σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος στο ορατό ή στο υπεριώδες φάσμα της ακτινοβολίας. Οι ουσίες αυτές δημιουργούν σύμπλοκα με τις ουσίες που μας ενδιαφέρει να μετρήσουμε. Τα σύμπλοκα αυτά απορροφούν το ίδιο έντονα με την αρχική ουσία και έτσι μετράται η απορρόφηση τους σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του δείγματος σύμφωνα με το νόμο του Beer. Σύμφωνα με τον νόμο του Beer, η απορρόφηση A (για μια μονοχρωματική δέσμη ακτινοβολίας) ενός διαλύματος μιας απορροφούσας ουσίας X , είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωσή της C και δίνεται από την εξίσωση: $A = \epsilon \cdot b \cdot C$, όπου ϵ είναι η γραμμομοριακή απορροφητικότητα της ουσίας X στο δεδομένο μήκος κύματος της ακτινοβολίας και b η οπτική διαδρομή. Ο νόμος του Beer υπόκειται σε ορισμένες πραγματικές και φαινομενικές

αποκλίσεις. Πραγματικές αποκλίσεις συναντούνται σε σχετικώς πυκνά διαλύματα απορροφούσας ουσίας (>0,01 M). Οι αποκλίσεις αυτές οφείλονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των απορροφόντων σωματιδίων και σε μεταβολές του δείκτη διάθλασης του διαλύματος. Συνηθέστερες είναι οι φαινομενικές αποκλίσεις. Αυτές οφείλονται: (1) σε χημικούς λόγους, όταν η απορροφούσα ουσία συμμετέχει σε χημικές ισορροπίες με άλλες ουσίες ή τον διαλύτη παρέχοντας προϊόντα με διαφορετικά φάσματα τροποποιεί τους ρυθμούς ισορροπίας, απορρόφησης, (2) σε οργανολογικά προβλήματα παράσιτης ακτινοβολίας και (3) στο ότι χρησιμοποιείται πολυχρωματική ακτινοβολία. Ο νόμος του Beer περιγράφει την εξασθένηση του φωτός που μεταδίδεται μέσω ενός ομοιόμορφου υλικού μέσου το οποίο περιέχει μια αναρροφούμενη ουσία. Εάν ένα μονοχρωματικό συναφές φως έντασης I_0 εισαχθεί στο υλικό μέσο, ένα μέρος αυτού του φωτός θα διαδίδεται μέσω του υλικού μέσου, ενώ ένα άλλο μέρος του θα απορροφάται. Η ένταση I του φωτός που διαδίδεται μέσω του υλικού μέσου μειώνεται εκθετικά με την απόσταση (Holme 1998).

2.2. Ενζυμικές μέθοδοι

Όλα τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες. Τα ένζυμα είναι καταλύτες που λειτουργούν για να ενισχύουν τους ρυθμούς της βιοχημικής αντίδρασης 10⁶ έως 10¹² φορές περισσότερο από τις αντιδράσεις που δεν έχουν καταλύτες. Τα ένζυμα έχουν συγκεκριμένες ιδιότητες: 1) Τα ένζυμα δεν τροποποιούνται ούτε καταναλώνονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, 2) Απαιτούνται μόνο μικρές ποσότητες από τα ένζυμα και 3) Τα ένζυμα επιταχύνουν την ταχύτητα στην οποία η χημική αντίδραση φτάνει σε ισορροπία (Murray 2003).

Ορισμένα ένζυμα είναι συζευγμένες πρωτεΐνες και περιέχουν ένα συμπαράγοντα. Ο συμπαράγοντας μπορεί να είναι ένα ανόργανο συστατικό όπως είναι τα μεταλλικά ιόντα ή τα οργανικά συστατικά. Παραδείγματα ανόργανων μεταλλικών ιόντων που λειτουργούν ως συμπαράγοντες είναι ο ψευδάργυρος, ο σίδηρος, ο χαλκός, το μαγνήσιο και το μαγγάνιο. Εάν ο συμπαράγοντας είναι οργανικό συστατικό, αναφέρεται ως συνένζυμο και τυπικά έχει μια δομή που σχετίζεται με τις βιταμίνες (Διαμαντίδης 1990). Παραδείγματα συνενζύμων είναι το νικοτιναμιδοαδενινοδινουκλεοτίδιο και η 5-φωσφορική πυριδοξάλη. Τα μεταλλικά ιόντα τυπικά

δρουν ως ενεργοποιητές των ένζυμων και μπορούν να βρεθούν ως ενοποιημένο δομικό συστατικό ή ως χαλαρά συνδεδεμένο ένζυμο. Παρομοίως τα συνένζυμα μπορούν να είναι μόνιμα ή χαλαρά συνδεδεμένα στα ένζυμα. Τα συνένζυμα που είναι μόνιμα συνδεδεμένα στο ένζυμο αναφέρονται ως προσθετικές ομάδες. Τα ένζυμα καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες ένα ή περισσότερα υποστρώματα μετατρέπονται σε προϊόν. Από τη στιγμή που τα ένζυμα είναι παρόντα σε πολύ μικρές ποσότητες στο πλάσμα, είναι κοινή εργαστηριακή πρακτική να μετράτε η ενζυμική δραστηριότητα από ότι τη συγκέντρωση του ένζυμου (Sen 2002).

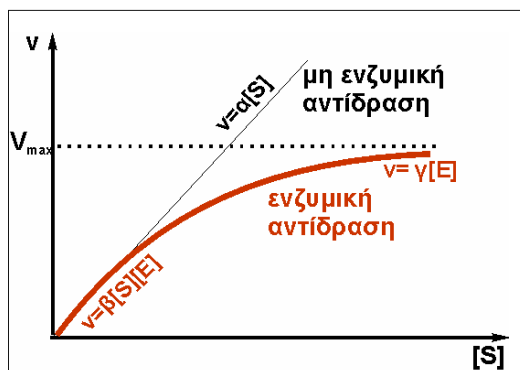
2.2.1. Μέτρηση της καταλυτικής δράσης των ενζυμων

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες και συνυπάρχουν με άλλες πρωτεΐνες και ενώσεις, καθιστώντας το χημικό προσδιορισμό τους σχεδόν αδύνατο. Μερικά μόνο ένζυμα μπορούν να προσδιοριστούν με άμεσες φασματοφωτομετρικές μεθόδους. Η παρουσία των περισσότερων ενζύμων πιστοποιείται από τη θετική έκβαση των συγκεκριμένων αντιδράσεων που καταλύουν. Το ποσό των ενζύμων υπολογίζεται από την ταχύτητα της αντίδρασης. Η μέτρηση λοιπόν της ταχύτητας της αντίδρασης, είναι το πιο σημαντικό κομμάτι των τεχνικών που χρησιμοποιούνται (σύμφωνα με τη Commission on Enzymes) (Bergmeyer 1993).

Μια μονάδα δραστηριότητας εκφράζεται ως διεθνής μονάδα (IU) και ορίζεται ως η ποσότητα του ένζυμου που παράγει 1μmole προϊόντος στο λεπτό, στους 25 βαθμούς Κελσίου κάτω υπό πρότυπες συνθήκες. Μονάδες ενζυμικής δραστηριότητας είναι τα μmole[S]/min. Πρότυπες συνθήκες είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος, το pH και η θερμοκρασία. Όταν μελετάμε την ενζυμική δραστηριότητα, συνήθως παρατηρούμε το ρυθμό της αντίδρασης υπό διαφορετικές συνθήκες. Αρκετοί παράγοντες επηρεάζουν την ταχύτητα των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Αυτοί είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος, το pH, η θερμοκρασία, η συνύπαρξη αναστολέων ή ενεργοποιητών, η φύση και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος (Eisenthal 1995).

Συγκέντρωση υποστρώματος: Για ένα ένζυμο να εκθέσει την καταλυτική δραστηριότητα, πρέπει να συνδυάζεται με το υπόστρωμα και να εκτίθεται μόνιμα ως το σύμπλοκο ένζυμου υποστρώματος. Η ενζυμική δραστηριότητα είναι ένα μέτρο της καταλυτικής μετατροπής του

υποστρώματος σε προϊόν. Ένα ένζυμο που δεν συνδέεται στο υπόστρωμα δεν μπορεί να εκθέτει ενζυμική δραστικότητα και έτσι μια λανθασμένη χαμηλή τιμή μπορεί να αποκτηθεί κατά την ανάλυση. Η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι ένας σημαντικός παράγοντας, που επηρεάζει τη ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων. Ο ρυθμός της ενζυμικής αντίδρασης αυξάνεται καθώς η συγκέντρωση του υποστρώματος αυξάνεται. Τα περισσότερα μόρια υποστρώματος που είναι διαθέσιμα, είναι πιο πιθανά να φτάσουν στις ενεργές θέσεις του ενζύμου, επιτρέποντας έτσι το ένζυμο να φτάσει στη μέγιστη ταχύτητα. Κατά την αρχική φάση της αντίδρασης η ταχύτητα είναι γραμμική σε σχέση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Σε αυτή τη φάση η αντίδραση ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης, όπου η ταχύτητα είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Στη δεύτερη φάση φτάνει σε πλατό και η αντίδραση ακολουθεί μηδενική κινητική (Εικόνα 83). Στη δεύτερη φάση, φτάνεται η μέγιστη ταχύτητα και οποιαδήποτε επιπρόσθετη αύξηση του υποστρώματος δεν τροποποιεί τη ταχύτητα. Για να διαβεβαιώσουμε ότι η ενζυμική αντίδραση ακολουθεί μηδενική κινητική είναι σημαντικό να παρέχεται η μέγιστη συγκέντρωση υποστρώματος κατά την αντίδραση (Eisenthal 1992).



Εικόνα 83: Σε μια πρώτης τάξης μη ενζυμική αντίδραση, η μεταβολή της ταχύτητας, καθώς αυξάνει η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι σταθερή και η καμπύλη $v = f(S)$ είναι ευθεία. Στις περισσότερες περιπτώσεις σε μια ενζυμική αντίδραση, το διάγραμμα της αρχικής ταχύτητας (v) συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος έχει τη μορφή καμπύλης υπερβολής.

Επίδραση της θερμοκρασίας: Με την αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται εκθετική αύξηση της ταχύτητας (αύξηση της μοριακής κίνησης), έναρξη της μετουσίωσης της πρωτεΐνης ή πλήρης μετουσίωση της πρωτεΐνης (Eisenthal 1992).

Επίδραση του pH: Η επίδραση του pH στην ταχύτητα είναι διαφορετική για κάθε ένζυμο και για κάθε υπόστρωμα του ίδιου ενζύμου. Η επίδραση σχετίζεται με τη μετουσίωση του πρωτεϊνικού μορίου και με τον ιονισμό ομάδων του ενζύμου ή του υποστρώματος. Οι αναστολείς γενικά

μειώνουν την ταχύτητα της αντίδρασης. Υπάρχει η μη ειδική αναστολή με μετουσίωση του ενζύμου (μη αντιστρεπτή) και υπάρχει και η αντιστρεπτή (Eisenthal 1992).

Γενικά οι κινητικές μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιούν ένζυμα χρησιμοποιούνται και για τη μέτρηση του ενζύμου αλλά και για τη μέτρηση του υποστρώματος. Τα πλεονεκτήματα τους είναι ότι είναι ταχείες μέθοδοι, εκλεκτικές για ορισμένες χημικές οντότητες στο διάλυμα και αξιόπιστες. Κατά την αντίδραση λαμβάνονται σχετικές και όχι απόλυτες μετρήσεις. Συνήθως μετράται η διαφορά της παραμέτρου, $\Delta A=f(C)$. Οι μετρήσεις είναι ανεπηρέαστες από τους παρεμποδιστές (π.χ. θολερότητα ορού). Συνήθως επιτυγχάνεται προσδιορισμός δυο ή τριών ενώσεων χωρίς φυσικό διαχωρισμό τους, αφού μπορεί να έχουν διαφορετικές ταχύτητες αντίδρασης. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής της αντίδρασης πρέπει να είναι μεγαλύτερος από το χρόνο ανάμιξης των αντιδρώντων και το χρόνο απόκρισης του οργάνου. Οι συνθήκες αντίδρασης (θερμοκρασία, ιονική ισχύς, pH) επηρεάζουν σημαντικά την ταχύτητα και την αξιοπιστία των μετρήσεων. Για αυτό απαιτείται αυστηρός έλεγχος των συνθηκών (Bergmeyer 1993).

2.3. Ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί

Η ανοσοχημεία είναι ο κλάδος της Βιοχημείας που ανιχνεύει και προσδιορίζει ουσίες σε βιολογικά υγρά με τη χρήση της αντίδρασης αντιγόνου (Ag) και αντισώματος (Ab). Οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί είναι τεχνικές που στηρίζονται στη χρήση των αντισωμάτων και την ειδική δέσμευση αντιγόνου-αντισώματος. Αρχή αυτών των μεθόδων είναι ότι το αντιγόνο με το αντίσωμα συνδέονται με τρόπο ειδικό και αμφίδρομο και σχηματίζουν ένα σύμπλοκο το οποίο μπορεί να διαχωριστεί από το ελεύθερο μόριο. Η αντίδραση ακολουθεί το νόμο της δράσεως των μαζών. Οι ανοσοχημικές μέθοδοι διακρίνονται σε ανταγωνιστικές και μη ανταγωνιστικές ανοσομετρικές (Johnstone 1987).

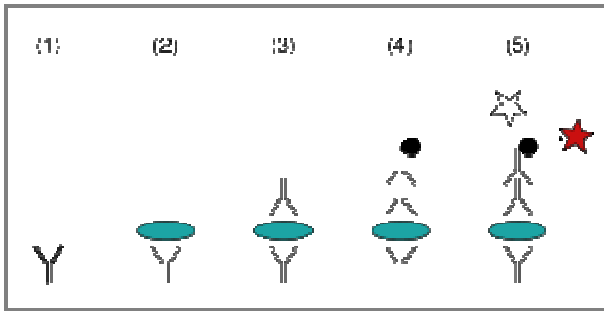
Στην πρώτη ο επισημασμένος ιχνηθέτης είναι το ίδιο το αντιγόνο. Το προς μέτρηση και το επισημασμένο αντιγόνο ανταγωνίζονται, για τη σύνδεση με περιορισμένη ποσότητα του ίδιου αντισώματος και για αυτό το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι ευθέως ανάλογο της

συγκέντρωσης του μετρούμενου αντιγόνου στο δείγμα. Στην ανοσομετρική ο επισημασμένος ιχνηθέτης είναι το αντίσωμα προς το αντιγόνο. Το αντιγόνο προσροφάτε καταρχήν σε ένα μη επισημασμένο αντίσωμα που είναι καθηλωμένο συνήθως σε μια στερεή επιφάνεια και μετά προστίθεται το ίδιο επισημασμένο αντίσωμα (τεχνική sandwich). Το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι ευθέως ανάλογο προς τη συγκέντρωση της ουσίας που μετράμε στο δείγμα (Price 1996).

Για την ποσοτική μέτρηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου αντισώματος έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι τρόποι επισήμανσης που επιτρέπουν την ανίχνευση του μορίου που μας ενδιαφέρει (Price 1996). Αυτοί περιλαμβάνουν:

- α) Επισήμανση με ραδιενέργεια (ραδιοανοσολογικός προσδιορισμός) RIA.
- β) Επισήμανση με ένζυμα (ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί) EIA. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται οι αντιδράσεις ενζύμου–υποστρώματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μορίου που μας ενδιαφέρει.
- γ) Χρήση φθορίζων συστατικών ως ιχνηθέτες μαζί με υποστρώματα που προκαλούν φθορισμό (φθορισμομετρικά) FIA.

Η γνωστή και έγκυρη διαγνωστική μέθοδος ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) είναι μια ανοσοενζυμική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται εκτενώς στην εργαστηριακή ιατρική για την ανίχνευση διαφόρων αντιγόνων και αντισωμάτων, καθώς και για πολλές επιδημιολογικές μελέτες (Crowther 2002). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι το αντιγόνο ή το πρώτο αντίσωμα είναι ακινητοποιημένα σε ένα στερεό φορέα, συνήθως μικοφρεάτιο, σφαιρίδιο ή σωλήνα. Το ένζυμο ιχνηθέτης συνδέεται είτε με το ειδικό για το αντιγόνο πρώτο αντίσωμα είτε με ένα δεύτερο αντίσωμα κατά του πρώτου αντισώματος (Εικόνα 84). Υπάρχουν και εδώ ανταγωνιστικές και μη ανταγωνιστικές μέθοδοι. Ο προσδιορισμός του συνδεδεμένου ενζύμου απαιτεί την προσθήκη του υποστρώματος και τη μέτρηση μιας καταλυτικής αντίδρασης ενζύμου υποστρώματος. Μια μικρή σχετικά ποσότητα ενζύμου μπορεί να προκαλέσει τη μετατροπή σε σύντομο χρόνο μεγάλης ποσότητας υποστρώματος σε έγχρωμο προϊόν. Η παραγωγή αυτού του προϊόντος σταματάτε με την προσθήκη συγκεκριμένου αντιδραστήριου και μετράτε η απορρόφηση του.



Εικόνα 84: Το ένζυμο ιχνηθέτης συνδέεται με ένα δεύτερο αντίσωμα κατά του πρώτου αντισώματος που είναι ειδικό για το αντιγόνο. Η προσθήκη του υποστρώματος συμβάλλει στη μέτρηση της καταλυτικής αντίδρασης ένζυμου-υποστρώματος.

2.4.Χρωματογραφία

Χρωματογραφία είναι μία φυσικοχημική μέθοδος διαχωρισμού ουσιών, με την οποία οι ουσίες που πρόκειται να διαχωριστούν κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων. Μία από τις φάσεις είναι αυτές είναι στατική και η άλλη κινητή κατά μήκος της στατικής φάσεως. Η χρωματογραφία είναι μία αναλυτική μέθοδος διαχωρισμού, ταυτοποίησης και προσδιορισμού ουσιών και μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις ουσίες που μπορούν να διαλυθούν ή να εξαερωθούν χωρίς την αλλαγή της χημικής τους συστάσεως.

Η τεχνική της χρωματογραφίας στηρίζεται πάνω στη σχετική κίνηση των δύο φάσεων. Οι διάφορες ουσίες που είναι διαλυμένες στην κινητή φάση, εξαναγκάζονται σε κίνηση κατά μήκος της στατικής φάσεως, με μία ταχύτητα ανάλογη με τη σχετική τους συγγένεια προς τις ουσίες που αποτελούν τη στατική φάση. Η κινητή φάση μπορεί να είναι είτε υγρή ή αέριος, ενώ η στατική είτε στερεά ή υγρή, με αποτέλεσμα να υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες χρωματογραφικών τεχνικών.

Σε κάθε χρωματογραφικό πείραμα, εισάγεται στην είσοδο της στήλης ένα δείγμα που περιέχει διάφορα συστατικά. Όλα τα συστατικά του δείγματος ξεκινούν την ίδια χρονική στιγμή από την ίδια θέση της στήλης, αλλά καθένα από αυτά κινείται με διαφορετική ταχύτητα λόγω του διαφορετικού συντελεστή κατανομής. Μετά ορισμένο χρόνο, τα συστατικά του δείγματος βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις της χρωματογραφικής στήλης και έτσι διαχωρίζονται μεταξύ τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της παραπάνω τεχνικής είναι η χρωματογραφία σε χαρτί. Σε μια σταθερή θέση της χρωματογραφικής στήλης και συγκεκριμένα στην έξοδο της τα διάφορα συστατικά του δείγματος εμφανίζονται σε διαφορετικούς χρόνους και ανιχνεύονται από έναν ανιχνευτή. Η γραφική παράσταση της απόκρισης του ανιχνευτή έναντι του χρόνου καλείται χρωματογράφημα. Ο χρόνος που χρειάζεται ένα συστατικό για να διατρέξει όλο το μήκος της

χρωματογραφικής στήλης ονομάζεται χρόνος συγκράτησης (retention time) και συμβολίζεται με t_R .

Αν όλα τα μόρια ενός συστατικού συμπεριφερόταν όπως τα μόρια που εξετάσαμε παραπάνω θα είχαμε μια ιδανική κατάσταση. Στην ιδανική χρωματογραφία, οι ζώνες των συστατικών που ονομάζονται επίσης και κορυφές έκλουσης (peaks) δεν παρουσιάζουν τάση διεύρυνσης και συνεπώς η κατανομή κάθε συστατικού με το χρόνο ή τον όγκο στην έξοδο είναι η ίδια με την κατανομή στην είσοδο. Επειδή δε η κατανομή εισόδου είναι συνήθως μια οξεία συμμετρική κορυφή, στο ιδανικό χρωματογράφημα θα εμφανίζονται οξείες συμμετρικές κορυφές που είναι διαχωρισμένες μεταξύ τους, ακόμη κι αν το δείγμα περιέχει πολλά συστατικά.

Στην πραγματικότητα όμως η χρωματογραφία ποτέ δεν είναι ιδανική και οι ζώνες των συστατικών, που στην είσοδο της στήλης είναι οξείες, διευρύνονται καθώς διέρχονται μέσα από τη στήλη. Το φαινόμενο της διερεύνησης των κορυφών έκλουσης έχει μελετηθεί από δυο θεωρίες, τη θεωρία των πλακών και τη θεωρία της ταχύτητας.

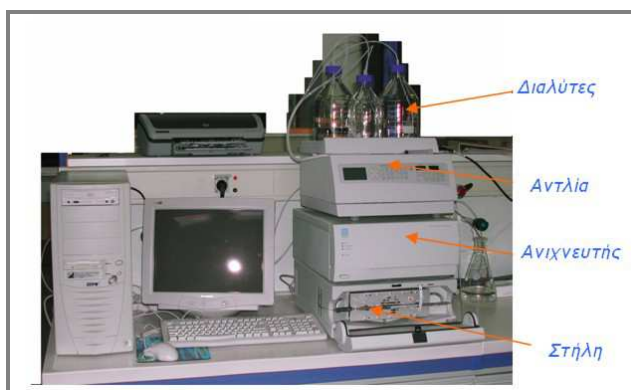
Το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό μιας χρωματογραφικής στήλης είναι η ικανότητα της να διαχωρίζει τα συστατικά ενός μείγματος με παρόμοιο χημικό χαρακτήρα. Η δυνατότητα αυτή εκφράζεται με τον όρο διαχωριστική ικανότητα (resolution). Για να βελτιώσουμε τη διαχωριστική ικανότητα μπορούμε, α) να μεταβάλουμε τη θερμοκρασία ή τη φύση των φάσεων ώστε να έχουμε μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ των κορυφών ή β) να ελαττώσουμε το πλάτος των κορυφών βελτιώνοντας την απόδοση της στήλης, γ) να συνδυάσουμε τις περιπτώσεις α και β οπότε ο διαχωρισμός είναι περισσότερο ικανοποιητικός (Kromidas 2000).

2.4.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance-Liquid Chromatography)

Σαν χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ορίζεται η μέθοδος διαχωρισμού μίγματος στα συστατικά του, που λαμβάνει χώρα με διαδοχικές προσροφήσεις-εκροφήσεις ή κατανομές μεταξύ μιας στερεής ή υγρής στατικής φάσης με τη βοήθεια πίεσης μεγαλύτερης από την ατμοσφαιρική. Τα φυσικοχημικά φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά το διαχωρισμό μπορεί να είναι: προσρόφηση, κατανομή, ιοντοανταλλαγή. Η HPLC έχει προέλθει από τη σύμπραξη τριών

ερευνητικών περιοχών (της χημικής τεχνολογίας, της τεχνολογίας ανιχνευτών και της διαχείρισης δεδομένων). Η υγρή χρωματογραφία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για δείγματα με μεγάλα μόρια ή ιονισμένα σωματίδια με χαμηλές τάσεις ατμών και για θερμικά ασταθείς ενώσεις που δε μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν (McMaster 2006).

Η μεγαλύτερη απόδοση στην υγρή χρωματογραφία επιτυγχάνεται με χαμηλές ταχύτητες ροής, που συνεπάγονται μεγάλη διάρκεια διαχωρισμού, με την εφαρμογή υψηλής πίεσης και τη χρήση μικρότερων σωματιδίων σαν υλικών πλήρωσης της στήλης. Το εύρος ροής στην υγρή χρωματογραφία είναι από 0,1 έως 1 ml/min και επιτυγχάνεται με αντλίες που λειτουργούν σε πιέσεις 300-7500psi. Οι συνηθισμένες στήλες με υλικό πλήρωσης 5μm, λειτουργούν με ροή 1ml/min και πιέσεις 1000-2000 psi.



Εικόνα 85: Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, HPLC DIONEX P680.

Η έκλυση γίνεται είτε ισοκρατικά όπου η σύσταση της κινητής φάσης δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, είτε βαθμιδωτά όπου η ισχύς της κινητής φάσης μεταβάλλεται επιτυγχάνοντας καλύτερο διαχωρισμό. Με την ισοκρατική έκλυση όταν το δείγμα περιέχει πολλά συστατικά είναι δύσκολο να διαχωριστεί, ενώ παράλληλα τα συστατικά του δείγματος που συγκρατούνται ισχυρά από τη στήλη, εκλούνται πολύ αργά με αποτέλεσμα τη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών τους. Με τη βαθμιδωτή έκλυση γίνεται ανάμειξη ενός ασθενούς με έναν ισχυρό διαλύτη σε ποσοστά που μπορεί να μεταβάλλονται με το χρόνο, με την περιεκτικότητα του ισχυρού διαλύτη διαρκώς αυξανόμενη. Έτσι διαχωρίζονται στην αρχή οι ουσίες που έχουν μικρό χρόνο συγκράτησης στη στήλη και με την αύξηση της ισχύος εκλούνται καλύτερα και όσες συγκρατούνται για περισσότερο χρόνο (McMaster 2006)..

Η κινητή φάση είναι μίγμα δύο ή περισσότερων διαλυτών (συνήθως μέχρι 4) με ή χωρίς προσθήκη πρόσθετων ουσιών (π.χ. ρυθμιστικά διαλύματα). Οι παράμετροι για την επιλογή των κατάλληλων διαλυτών είναι η πολικότητά τους και η εκλεκτικότητα. Η επιλογή της κινητής φάσης γίνεται έτσι ώστε να διαφέρει η πολικότητά της από αυτή της στατικής φάσης, ώστε να υπάρχει ικανοποιητικός διαχωρισμός στα συστατικά του δείγματος που αναλύεται. Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, η ισχύς της κινητής φάσης αυξάνεται με την αύξηση της πολικότητάς της, ενώ στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης συμβαίνει το αντίθετο. Η εκλεκτικότητα του διαλύτη εξαρτάται από την ικανότητά του να δρα ως πρωτονιοδέκτης, πρωτονιοδότης ή με ισχυρές διπολικές ροπές σε σχέση με τις διάφορες ουσίες (McMaster 2006).

Οι στήλες κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα έχουν συνήθως μήκος 25cm, εσωτερική διάμετρο 4,6mm και είναι πληρωμένες με μικρά σωματίδια στατικής φάσης παρόμοιου μεγέθους (3-10μm). Η πορώδης ουσία χρησιμοποιείται σαν μια στερεή ακίνητη φάση ή καλύπτεται μ'ένα πολύ λεπτό στρώμα υγρής ακίνητης φάσης με πολύ μεγάλο εμβαδόν επιφάνειας. Η χρωματογραφία κανονικής φάσης γίνεται με στήλες προσρόφησης silica ή με προσδεδεμένη στατική φάση (CN, NH₂, OH), η οποία έχει μεγαλύτερη επαναληψιμότητα και ανταποκρίνεται ταχύτερα σε αλλαγές της σύστασης της κινητής φάσης. Στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης χρησιμοποιούνται στήλες με στατική φάση που περιέχει χημικά προσδεδεμένη πλευρική αλυσίδα C₈ ή C₁₈ ή C₁, C₄, C₁₂, CN, NO₂, C₆H₅, (OH)₂ (Dong 2006).

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται είναι οι παρακάτω: 1) ανιχνευτής UV-VIS που είναι ευαίσθητος στην περιοχή 10-6 έως 10-10 g/mL για αρκετές ενώσεις. 2) Ο ανιχνευτής σειράς φωτοδιοδίων (photodiode array) στο οποίο διέρχεται πολυχρωματική ακτινοβολία από την κυψελίδα του ανιχνευτή, η προκύπτουσα ακτινοβολία διαθλάται και στη συνέχεια προσπίπτει σε σειρά φωτοδίοδων. Κάθε μία φωτοδίοδος δέχεται μία διαφορετική δέσμη με μικρό εύρος μήκους κύματος. Όλη η σειρά των δίοδων «σαρώνεται» πολλές φορές το δευτερόλεπτο από έναν μικροεπεξεργαστή και το προκύπτον φάσμα προβάλλεται σε οθόνη και ταυτόχρονα αποθηκεύεται στη μνήμη ηλεκτρονικού υπολογιστή για μετέπειτα εκτύπωση σε καταγραφικό. Ο υπολογιστής επιτρέπει την ταυτοποίηση της ουσίας συγκρίνοντας το φάσμα της με τα φάσματα που διαθέτει σε ειδικά αρχεία-βιβλιοθήκη. Η ανίχνευση μπορεί να γίνει σε ένα ή περισσότερα μήκη κύματος

ταυτόχρονα, ενώ η καθαρότητα μιας χρωματογραφικής κορυφής, δηλαδή το κατά πόσον πρόκειται για μία ουσία ή όχι μπορεί να ελεγχθεί από τους λόγους των απορροφήσεων σε επιλεγμένα μήκη κύματος (πχ. 254nm και 280nm). 3.Ανιχνευτές φθορισμού: Φθορισμός είναι ως γνωστόν η ιδιότητα ορισμένων ουσιών που όταν απορροφούν UV ακτινοβολία, αυτομάτως εκπέμπουν ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος, ενώ εάν η εκπομπή συμβεί με χρονική καθυστέρηση το φαινόμενο ονομάζεται φωσφορισμός. Κατάλληλες για ανίχνευση με φθορισμό είναι ουσίες, που εκπέμπουν σημαντικό ποσοστό της ακτινοβολίας που έχουν απορροφήσει. Οι φυσικά φθορίζουσες ουσίες είναι λίγες και είναι αυτές με συζυγή κυκλική δομή, όπως οι πολυπυρηνικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, ενώ ουσίες που δε φθορίζουν μπορούν να ανιχνευθούν με φθορισμό αφού πρώτα μετατραπούν με κατάλληλη αντίδραση σε φθορίζον παράγωγο. Οι ανιχνευτές φθορισμού είναι 2 με 3 τάξεις μεγέθους πιο ευαίσθητοι από τους ανιχνευτές UV, ενώ παρουσιάζουν μεγάλη εκλεκτικότητα, αφού οι περισσότερες ουσίες δε φθορίζουν. 4.Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές: μετράνε είτε την αγωγιμότητα της κινητής φάσης (ανιχνευτές αγωγιμότητας), είτε το ρεύμα που σχετίζεται με τη οξειδωση ή την αναγωγή του δείγματος (αμπερομετρικοί ή κουλομετρικοί ανιχνευτές). Οι ανιχνευτές αγωγιμότητας βρίσκουν εφαρμογή στην ανίχνευση των ιόντων μετά από διαχωρισμό με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων. Επειδή η κινητή φάση έχει υψηλή αγωγιμότητα έχουν βρεθεί χημικοί και ηλεκτρονικοί τρόποι για να μην παρεμποδίζεται η μέτρηση (Kromidas 2000).

3. Μέτρηση δεικτών οξειδωτικού στρες

Το στήσιμο των μεθόδων μέτρησης των δεικτών οξειδωτικού στρες περιελάμβανε την εύρεση των καταλληλότερων μεθόδων και συνθηκών μέτρησης της κάθε παραμέτρου. Υπολογίστηκε η επαναληψιμότητα της κάθε μεθόδου που βρέθηκε ικανοποιητική και έγινε εφαρμογή των μεθόδων σε ορισμένα δείγματα. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα μπορούν να μετρηθούν με ανοσοενζυμικές μεθόδους (ειδικά kit) και με κινητικές μεθόδους. Οι μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες (α-τοκοφερόλη, ασκορβικό οξύ, συνένζυμο Q) μετρώνται με HPLC και

αμπερομετρική ανίχνευση (Kutnink 1987, Lass 1999) καθώς και με χρωματομετρικές μεθόδους. Το σελήνιο μετριέται με φθορισμομετρικές τεχνικές.

Οι μέθοδοι που τελικά χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των προϊόντων οξειδωτικής βλάβης και των παραγόντων της αντιοξειδωτικής άμυνας φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 28.

Πίνακας 28: Μέθοδοι ανάλυσης δεικτών οξειδωτικού στρες

Παράμετροι	Μέθοδος	Δείγμα
Καταλάση	Ενζυμική	Αιμόλυμα
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	Ενζυμική	Αιμόλυμα
Υπεροξειδική δισμουτάση	Ενζυμική	Αιμόλυμα
Αναγωγάση της γλουταθειόνης	Ενζυμική	Αιμόλυμα
Γλουταθειόνη	Ενζυμική	Ολικό αίμα
Μυελουπεροξειδάση	Ενζυμική	Λύμα λευκών
Πρωτεϊνικά καρβονύλια	Φωτομετρική	Ορός
3-Νιτροτυροσίνη	Ανοσοενζυμική	Ορός
Αλδεΐδες	Φωτομετρική	Ορός
Ισοπροσάνια	Ανοσοενζυμική	Ούρα
8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνη	Χρωματογραφία	Ούρα

3.1. Κατεργασία δειγμάτων

Τα κλινικά δείγματα (ούρα και αίμα) συλλέχθηκαν το πρωί μετά από νηστεία. Οι συμμετέχοντες στο πείραμα δεν ελάμβαναν αντιοξειδωτικά. Σε όλα τα στάδια της διαδικασίας λήψης και κατεργασίας του δείγματος, το δείγμα προφυλάχθηκε από τη θερμότητα σε ειδικό ψυγείακι με παγοκύστες και κατεργάστηκε το πολύ σε 8 ώρες. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν ήταν ούρα τυχαίας ούρησης, 4 ml ολικό αίμα σε σωλήνα με EDTA για λήψη πλάσματος και 10 ml ολικό αίμα σε ξηρό σωλήνα για λήψη ορού. Όλα τα δείγματα μετά την κατεργασία τους, διαμοιράστηκαν σε ειδικά σωληνάρια, κωδικοποιήθηκαν και αποθηκεύθηκαν στους -20 °C.

Συλλογή ούρων

Τα ούρα συλλέχθηκαν σε ειδικό δοχείο και φυγοκεντρήθηκαν στις 2500 g για 5 λεπτά, προστέθηκε 5mM BHT στο υπερκείμενο και έγινε κατάψυξη του δείγματος.

Συλλογή ορού

Το ολικό αίμα από τα ξηρά σωληνάρια φυγοκεντρήθηκε στις 5.000 g για 5 λεπτά. Ο ορός διαμοιράστηκε σε 6 σωληνάρια. Σε 2 από αυτά προστέθηκε 5mM BHT για την ανάλυση των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Συλλογή πλάσματος

Το ολικό αίμα στο σωληνάριο με το αντιπηκτικό φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 3.500 g. Το πλάσμα διαμοιράστηκε σε ειδικά σωληνάκια, ενώ τα κύτταρα κρατήθηκαν για τη δημιουργία αιμολύματος.

Δημιουργία λύματος ερυθρών

Σε 1 ml ερυθρών κυττάρων προστέθηκε 4 ml διαλύματος 0,9% NaCl. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3.000 g. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και επαναλήφθηκε η παραπάνω διεργασία άλλες 3 φορές. Αναρροφήθηκαν 0,2 ml ερυθρών από το ίζημα και αραιώθηκαν με 0,8 ml παγωμένο νερό. Στη συνέχεια επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 4°C και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 4.000 g. Το υπερκείμενο διαμοιράστηκε σε σωληνάρια και αποθηκεύθηκε στους -20°C.

Συλλογή αποπρωτεϊνωμένου αίματος

Ένας όγκος ολικού αίματος αναδεύθηκε ισχυρά με 2 όγκους κρύου 5% TCA και αφήνεται για 15 λεπτά στους 4°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 5.000 g και το υπερκείμενο αποθηκεύθηκε στους -20°C.

Δημιουργία λύματος λευκών

Σε 1 ml ολικού αίματος προστέθηκε 1 ml 3% δεξτράνης. Παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρις ότου να καθιζάνουν πλήρως τα ερυθρά και να διαχωριστούν από το υπερκείμενο. Αναρροφάται με προσοχή το υπερκείμενο, ούτως ώστε να μην αναρροφηθούν ερυθρά και φυγοκεντρήθηκε στις 5.000 g για 10 λεπτά. Το ίζημα (αν περιείχε ερυθρά) αναδεύθηκε ισχυρά με το διάλυμα λύσης των ερυθρών και επωάστηκε για 15 λεπτά στους 4°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 5.000 g για 10 λεπτά. Αν το δείγμα περιέχει αρκετά ερυθρά η παραπάνω διεργασία επαναλαμβάνεται 1-2 φορές ακόμη, μέχρι το ίζημα να γίνει άσπρο. Το ίζημα διαλύθηκε

σε 1 ml παγωμένου 0.05% CTAB, αναδεύθηκε ισχυρά, τοποθετήθηκε σε 2-3 διαφορετικά σωληνάρια και αποθηκεύθηκε στους -20°C μέχρι τη μέτρηση.

Τα όργανα μέτρησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το σύστημα της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC), HP 1100 (Agilent Technologies), το φωτόμετρο Shimadzu UV-160A και το φωτόμετρο για μέτρηση πλακιδίων elisa της Tecan Sunrise. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύτηκαν από την Sigma Aldrich. Τα διαλύματα των αντιδραστηρίων παρασκευάστηκαν με υπερκάθαρο νερό (18,6 ΜΩ) που παρασκευάστηκε σε ειδική συσκευή υπερκάθαρου νερού της Purelab Ultrapure. Στο παράρτημα I παρατίθενται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε μέθοδο και στο παράρτημα II οι πρότυπες καμπύλες της κάθε μεθόδου.

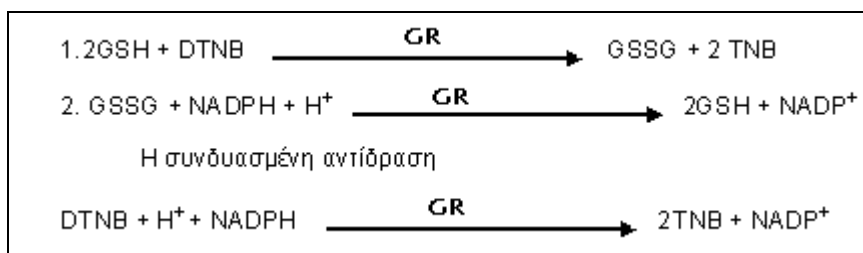
3.2. Μέθοδοι μέτρησης δεικτών οξειδωτικού στρες

3.2.1. Μέτρηση γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη είναι παρούσα μέσα στα κύτταρα κυρίως στην ανηγμένη μορφή GSH (90-95% της συνολικής γλουταθειόνης). Η οξειδωση της γλουταθειόνης οδηγεί στη δημιουργία του δισουλφιδίου της γλουταθειόνης (GSSG: οξειδωμένη μορφή). Η κατάσταση της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης φαίνεται να είναι ένας ευαίσθητος δείκτης της συνολικής υγείας του κυττάρου και της ικανότητας του να αντέχει στις τοξικές προκλήσεις. Υψηλά επίπεδα γλουταθειόνης μπορεί να υποδεικνύουν παθολογικές καταστάσεις (Nair 1991).

Η γλουταθειόνη μετράται με HPLC και φθορίζουσα ανίχνευση (Jones 1998) καθώς και με χρωματομετρικές μεθόδους (Reddy 2004). Στην παρούσα μελέτη η μέτρηση της γλουταθειόνης έγινε σύμφωνα με τη χρωματομετρική μέθοδο του Tietze (Tietze 1969).

Η μέθοδος μέτρησης περιλαμβάνει τη μέτρηση της ολικής γλουταθειόνης (GSSG+GSH) και της GSSG. Η GSH στη συνέχεια υπολογίζεται από την αφαίρεση της GSSG από την ολική γλουταθειόνη. Στη μέθοδο μέτρησης καταλυτικές ποσότητες γλουταθειόνης (nmoles) προκαλούν συνεχόμενη αναγωγή του 5,5'-διθειο-2-νιτροβενζοϊκού οξέος (DTNB) σε TNB και σε GSSG, το οποίο ανακυκλώνεται από την GR και το NADPH σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:



Ο ρυθμός αντίδρασης είναι ανάλογος της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης μέχρι τα 2μΜ. Το κίτρινο προϊόν 2-νιτροβενζοϊκό οξύ (TNB) μετράτε φασματοφωτομετρικά στα 412 nm. Η μέθοδος χρησιμοποιεί μια πρότυπη καμπύλη της ανηγμένης γλουταθειόνης για να προσδιορίσει την ποσότητα της γλουταθειόνης στο βιολογικό δείγμα.

Παρασκευή διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (100 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA pH 7).

Σε 80 ml νερό προστίθεται 10 ml KH_2PO_4 1M και 0,029 γραμ EDTA.

Ρύθμιση pH και συμπλήρωση του όγκου στα 100 ml με νερό.

Διάλυμα αναγωγής της γλουταθειόνης 6 units/ml.

Διάλυση 6 μl 500 units/ml GR από μύκητα (διαλυμένο σε 3.6 M θειικού αμμωνίου, 0.1mM διθειοτριόλης) σε 0,5 ml ρυθμιστικό διάλυμα.

Διάλυμα DTNB 1.5 mgr/ml.

Διάλυση 0.008 γραμ DTNB σε 5,33 ml διμέθυλοσουλφοξειδίου (DMSO).

Είναι σταθερό για τουλάχιστον 3 μήνες στους -20°C .

Διάλυμα NADPH 40 mgr/ml.

Διάλυση 0.025 γραμ NADPH σε 0.625 ml νερό. Είναι σταθερό για 6 μήνες στους -20°C .

Διάλυμα 5% τριχλωροακετικό οξύ (TCA).

Διάλυση 5 γραμ TCA σε 100 ml νερό. Είναι σταθερό για 6 μήνες στους 4°C .

Διάλυμα NADPH 0.16 mgr/ml.

Διάλυση 10 μl NADPH 40 mgr/ml σε 2.5 ml νερό.

Διάλυμα εργασίας.

Σε 16 ml ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης διαλύθηκαν 456 μl (DTNB 1.5 mg/ml) και 456 μl (GR 6 units/ml). Αυτό το διάλυμα είναι σταθερό για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Πρότυπα διαλύματα ανηγμένης γλουταθειόνης.

Το 10mM διάλυμα της GSH αραιώθηκε 200 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης για να δημιουργηθεί το διάλυμα 50 μM . Το διάλυμα 50 μM παρασκευάζεται φρέσκο, λίγο πριν χρησιμοποιηθεί για την πρότυπη. Με σειριακές αραιώσεις παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα συγκεντρώσεων 25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM και 3.125 μM .

Πρότυπα διαλύματα οξειδωμένης γλουταθειόνης.

Το 5mM διάλυμα της GSSG αραιώθηκε 200 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης για να δημιουργηθεί το διάλυμα 25 μM . Το διάλυμα 25 μM παρασκευάζεται φρέσκο λίγο πριν χρησιμοποιηθεί για την πρότυπη. Με σειριακές αραιώσεις παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα συγκεντρώσεων 12.5 μM , 6.25 μM , 3.125 μM και 1.56 μM (Πίνακας 27).

Κατεργασία βιολογικών δειγμάτων

Για τη μέτρηση της ολικής γλουταθειόνης, 30 μl από το υπερκείμενο του αποπρωτεϊνωμένου αίματος (Παράγραφος 3.1) αραιώθηκαν με 270 μl ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης.

Για τη μέτρηση της GSSG γίνεται η ίδια διεργασία, με τη διαφορά ότι στο τέλος προστέθηκε 6 μl 2-βινυλοπυριδένιο (2-VP), το οποίο δεσμεύει την ανηγμένη γλουταθειόνη. Τα δείγματα επωάστηκαν για 2 ώρες στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύονταν κάθε μισή ώρα.

Κινητική μέθοδος μέτρησης της γλουταθειόνης

Η μέτρηση της γλουταθειόνης (ολικής και οξειδωμένης) βασίστηκε σε μια κινητική μέθοδο, όπου καταλυτικές ποσότητες γλουταθειόνης (nmoles) προκαλούν συνεχόμενη αναγωγή του DTNB σε TNB και η οξειδωμένη γλουταθειόνη που δημιουργείται ανακυκλώνεται από την GR και το NADPH. Η οξειδωμένη γλουταθειόνη που είναι παρόν επίσης αντιδρά. Ο ρυθμός της αντίδρασης είναι αναλόγως της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης μέχρι τα 2 μM . Η προσθήκη των αντιδραστηρίων γίνεται σύμφωνα με τον παρακάτω Πίνακα 29.

Πίνακας 29: Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της γλουταθειόνης

	Επώαση για 5 λεπτά			Έναρξη
	Δείγμα (μl)	5% TCA (μl)	Διάλυμα εργασίας (μl)	NADPH (0.16 mgr/ml), (μl)
Τυφλό	-	10	150	-
Πρότυπο	10	-	150	-
Δείγμα	10	-	150	50

Οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών στο μείγμα αντίδρασης ήταν ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 95 mM, 0.95 mM EDTA, 0.038 mgr/ml (48 μM) NADPH, 0.031 mgr/ml DTNB, 0.115 units/ml GR, 0.24% TCA. Το διάλυμα εργασίας με το δείγμα επωάστηκαν για 5 λεπτά, με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Προστέθηκε το NADPH και ξεκίνησε η φωτομετρική μέτρηση της παραγωγής του κίτρινου προϊόντος (TNB) στα 405 nm σύμφωνα με το παρακάτω κινητικό πρόγραμμα:

Ενδιάμεσα χρονικά διαστήματα μετρήσεων: 1 λεπτό.

Αριθμός μετρήσεων: 5

Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση από την πρότυπη καμπύλη (Παράρτημα II)

σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{nmole/ml} = \frac{\Delta A_{405}/\text{min}(\text{Δείγμα}) \cdot d}{\Delta A_{405}/\text{min}(1 \text{ nmole}) \cdot \text{vol}}$$

όπου $\Delta A_{405}/\text{min}(\text{Δείγμα}) = \Delta A_{405}/\text{min}(\text{Δείγμα}) - \Delta A_{405}/\text{min}(\text{τυφλό})$
 $\Delta A_{405}/\text{min}(1 \text{ nmole}) = \Delta A_{405}/\text{min}(\text{πρότυπο}) - \Delta A_{405}/\text{min}(\text{τυφλό})$. Είναι η μεταβολή της απορρόφησης ανά λεπτό που αντιστοιχεί στο 1 nmole. Υπολογίζεται από την πρότυπη $y = ax + b$, όπου $y = \Delta A_{405}/\text{min}(1 \text{ nmole})$ και $x = 1 \text{ nmole}$.
 $d =$ αραίωση του δείγματος πριν την αντίδραση ($d = 30$).
 $\text{Vol} =$ ο όγκος του δείγματος σε ml ($\text{vol} = 0.01 \text{ ml}$).

Η μέτρηση του δείγματος στο οποίο δεν είχε προστεθεί 2-VP μετρά τη συνολική γλουταθειόνη. Η μέτρηση του δείγματος στο οποίο είχε προστεθεί 2-VP μετρά την οξειδωμένη (η οποία μετατρέπεται μέσω της αντίδρασης σε ανηγμένη και μετά αντιδρά με το DTNB και το ανάγει στο κίτρινο προϊόν). Από τη συνολική γλουταθειόνη αφαιρείται η οξειδωμένη και έτσι υπολογίζεται η ανηγμένη γλουταθειόνη.

3.2.2. Μέτρηση της αναγωγίας της γλουταθειόνης

Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GlutathioneReductase:GR) καταλύει τη μετατροπή της οξειδωμένης γλουταθειόνης σε ανηγμένη. Βρίσκεται σε αρκετούς ιστούς και δίνει την ικανότητα στο κύτταρο να στηρίζει επαρκή επίπεδα κυτταρικής γλουταθειόνης. Η δραστηριότητα της GR μετράται με 2 μεθόδους. Η πρώτη μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της μείωσης της απορρόφησης που προκαλείται από την οξείδωση του NADPH στα 340 nm και η δεύτερη στην αύξηση της απορρόφησης που προκαλείται από την αναγωγή του DTNB στα 412 nm σύμφωνα με τον Goldberg και τον Spooner (Goldberg 1983). Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε η δεύτερη μέθοδος.

Παρασκευή διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα αναγωγίας της γλουταθειόνης (100 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7.5).

Διάλυση 10ml KH_2PO_4 1M και 0,029γρ EDTA, σε 80 ml νερού. Ρύθμιση pH και συμπλήρωση του όγκου στα 100 ml.

Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων .

Διάλυση 0.01 γρ. BSA σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος 100 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7.5.

Διάλυμα DTNB 3mM.

Διάλυση 0.012 γρ DTNB σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος 100 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7.5.

Είναι σταθερό για 4 ώρες στους 4°C.

Διάλυμα GR (0.3 units/ml).

Διάλυση 3μl 500 units/ml GR σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος 100 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA pH 7.5.

Διάλυμα οξειδωμένης γλουταθειόνης 2mM.

Διάλυση 0,014 γρ GSSG σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος 100 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA pH 7.5.

Είναι σταθερό στους 4°C για 3 μήνες.

Διάλυμα NADPH 2mM.

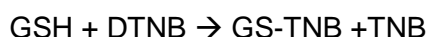
Διάλυση 92.5 μl 40 mgr/ml NADPH σε 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος 100 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7.5.

Κατεργασία δείγματος

Το αιμόλυμα (Παράγραφος 3.1) αραιώθηκε 40 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης. Για τη χρωματομετρική μέθοδο η αντίδραση είναι γραμμική από 0.003-0.03 units/ml.

Κινητική μέθοδος μέτρησης της δραστηκότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης

Η μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης από το NADPH στην παρουσία της GR. Επιπλέον, το DTNB αντιδρά με την ανηγμένη γλουταθειόνη που δημιουργείται σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η αντίδραση μετρείται με την αύξηση της απορρόφησης στα 412 nm χρησιμοποιώντας $\epsilon^{\text{mM}}=14.15$ για το TNB. Μια μονάδα προκαλεί την αναγωγή 1 μmole DTNB σε TNB, στους 25°C και σε pH 7.5. Σε πλαστική κυψελίδα του 1 ml προστίθενται τα παρακάτω με τη σειρά που είναι στον Πίνακα 30.

Πίνακας 30: Οι αναλογίες σε ml των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της GR.

Διάλυμα-αντιδραστήριο	Κυψελίδα
2 mM Οξειδωμένη γλουταθειόνη	500 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα	150 μl
Δείγμα	50 μl
3 mM DTNB	250 μl
2 mM NADPH	50 μl
Συνολικός όγκος	1000 μl

Για τυφλό χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα αραιώσης των δειγμάτων και για το θετικό έλεγχο χρησιμοποιείται GR 0,3 units/ml. Μετά την προσθήκη του NADPH ξεκίνησε η παρακολούθηση της αντίδρασης σύμφωνα με το παρακάτω κινητικό πρόγραμμα:

καθυστέρηση 60 δευτερόλεπτα
μεσοδιάστημα μετρήσεων 10 δευτερόλεπτα
αριθμός μετρήσεων 11

Η δραστικότητα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης υπολογίστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\Delta \text{δραστικότητα (U/ml)} = (\Delta A_{412} * DF) / (\epsilon^{mM} * V) \text{ όπου:}$$
$$\Delta A_{412} = A_{412} \text{ min}(\text{blank}) - A_{412} \text{ min}(\text{sample})$$
$$\epsilon^{mM} = 14.15 \text{ για TNB}$$

DF= αραίωση του δείγματος πριν το προσθέσουμε στην αντίδραση

V= όγκος δείγματος στην αντίδραση (x μl=0.00 x ml)

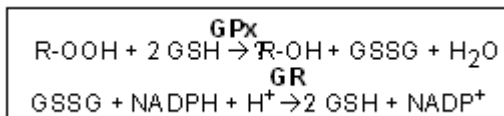
Η δραστικότητα εκφράζεται σε U/grHb=(U/ml)*100/Hb

3.2.3. Μέτρηση της Υπεροξειδάσης της Γλουταθειόνης

Η Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) καταλύει την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου και μια ευρύ ποικιλία οργανικών υπεροξειδίων στις αντίστοιχες σταθερές αλκοόλες και στο νερό, χρησιμοποιώντας την κυτταρική γλουταθειόνη ως τον αναγωγικό παράγοντα. Οι περισσότερες κυτταρικές υπεροξειδάσες είναι τετραμερικά ένζυμα που αποτελούνται από 22 kDa μονομερή, καθένα από τα οποία περιέχει μια σεληνοκυστεΐνη στην ενεργή θέση. Η σεληνοκυστεΐνη παίρνει μέρος άμεσα στη δωρεά ηλεκτρονίων στο υπόστρωμα του υπεροξειδίου, που οξειδώνεται σε αυτήν τη διεργασία. Το ένζυμο τότε χρησιμοποιεί την ανηγμένη γλουταθειόνη ως δότη υδρογόνου για να αναγεννήσει τη σεληνοκυστεΐνη (Wendel 1980). Η κυτταρική GPx είναι παρούσα σε όλους τους ιστούς, όμως αρκετές ασθένειες επηρεάζουν τα επίπεδα της. Μια αύξηση στα επίπεδα της GPx έχει παρατηρηθεί στα κύτταρα των διαβητικών ποντικών. Τα επίπεδα επανέρχονται στα φυσιολογικά μετά από χορήγηση ινσουλίνης (Gupta 1998).

Χρησιμοποιήθηκε μια έμμεση μέθοδος προσδιορισμού σύμφωνα με τους Paglia και Valentine. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην οξειδωση της γλουταθειόνης (GSH), στην οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) που καταλύεται από την GPx, η οποία συζευγνύεται με την ανακύκλωση της GSSG, πίσω στην GSH χρησιμοποιώντας την GR και το NADPH. Η μείωση της

απορρόφησης του NADPH μετρίεται στα 340 nm κατά τη διάρκεια της οξειδωσης του NADPH σε NADP⁺ και είναι ενδεικτική της δραστηριότητας της GPx, από τη στιγμή που η GPx είναι ο περιοριστικός παράγοντας της συζευγμένης αντίδρασης (Paglia 1967).



Η αντίδραση εκτελείται στους 25°C, σε pH 8.0 και ξεκινά με την προσθήκη τερτ-βουτύλ-υδροπεροξειδίου (t-Bu-OOH). Η αντίδραση με το t-Bu-OOH μετρά τη δραστηριότητα που οφείλεται στην υπεροξειδάση που περιέχει το σελήνιο. Εάν θέλαμε να μετρήσουμε τη δραστηριότητα που οφείλεται στα ένζυμα που δεν περιέχουν σελήνιο, τότε χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το cumene hydroperoxide σε συγκεντρώσεις 0.25-1.0 mM. Αυτό μετρά την ολική δραστηριότητα της γλουταθειόνης (σεληνοεξαρτώμενη και μη).

Παρασκευή Διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (50mM Tris HCl, 0.5 mM EDTA, pH 8.0).

Διάλυση 0,5 γρ Tris-base και 0,015 γρ EDTA σε 80 ml νερού. Ρύθμιση pH και συμπλήρωση του όγκου στα 100 ml.

Διάλυμα εργασίας (5 mM NADPH, 42 mM GSH και 10 units/ml GR).

Διάλυση 116 μl 40 mM NADPH, 20μl 500 Units/ml GR και 0,012γρ GSSG σε 1 ml ρυθμιστικό διάλυμα. Το διάλυμα είναι σταθερό για 3 ώρες και χρησιμοποιείται πάντα φρέσκο (αν καταψυχθεί δεν μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί).

Διάλυμα t-Bu-OOH 30mM.

Διάλυση 21,5 μl αντιδραστηρίου t-Bu-OOH 30mM, σε 5 ml νερό.

Πρότυπο διάλυμα GPx 100 units/ml

Τα 100 units/ml αραιώθηκαν 400 φορές με νερό στα 0,25 units/ml.

Κατεργασία δείγματος

Το αιμόλυμα (Παράγραφος 3.1) αραιώθηκε 80 φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, για να είναι μέσα στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης.

Κινητική μέθοδος μέτρησης δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης

Χρησιμοποιήθηκαν 20-50 μl διαλύματος εργασίας για να παρθούν οι τιμές σε μια περιοχή που η αντίδραση είναι γραμμική 0,0005-0,02 units/όγκο αντίδρασης. Αυτό είναι ισοδύναμο με μια μείωση της απορρόφησης 0,032-0,13/λεπτό. Η IgG χρησιμοποιήθηκε για τη σταθεροποίηση του ενζύμου. Απαιτείται μόνο σε περιπτώσεις πολύ καθαρών και αραιωμένων ενζυμικών διαλυμάτων. Οι τελικές συγκεντρώσεις στην αντίδραση είναι 0.25 mM NADPH, 2.1 mM ανηγμένη γλουταθειόνη, 0.5 units/ml GR και 300 μM t-Bu-OOH. Η προσθήκη των αντιδραστηρίων γίνεται σύμφωνα με τον παρακάτω Πίνακα 31:

Πίνακας 31: Οι αναλογίες σε μl των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της δραστικότητας της GPx.

	Ρυθμιστικό διάλυμα (μl)	Διάλυμα εργασίας (μl)	GR 0,25 units/ml (μl)	Δείγμα (μl)	30 mM t-Bu-OOH (μl)
Τυφλό	940	50	-	-	10
Θετικός έλεγχος	890	50	50	-	10
Δείγμα	890	50	-	50	10

Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 10 μl 30mM t-Bu-OOH. Ακολούθησε ανάμειξη με αναστροφή και παρακολούθηση της μείωσης της απορρόφησης στα 340 nm, χρησιμοποιώντας το ακόλουθο κινητικό πρόγραμμα.

Μήκος κύματος: 340 nm

Αρχική καθυστέρηση: 15 δευτερόλεπτα

Ενδιάμεσα χρονικά διαστήματα μετρήσεων: 10 δευτερόλεπτα.

Αριθμός μετρήσεων: 6

Το φωτόμετρο δίνει αυτόματα τη μεταβολή της απορρόφησης στο 1 λεπτό. Η δραστικότητα της GPx στο δείγμα μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Δραστικότητα (mmol/min/ml=Units/ml)} = DA_{340} \times DF / 6.22 \times V$$

$$DA_{340} = A_{340}/\text{min}(\text{τυφλό}) - A_{340}/\text{min}(\text{δείγμα})$$

$$6.22 = \epsilon^{mM} \text{ για το NADPH}$$

DF = παράγοντας αραίωσης του δείγματος πριν την προσθήκη του στην αντίδραση.

V = όγκος δείγματος στην αντίδραση σε ml

Προσδιορισμός μονάδας δραστικότητας: 1 unit της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης προκαλεί τη δημιουργία 1.0 mmol NADP⁺ από το NADPH ανά λεπτό, σε pH 8.0 στους 25°C, σε μια συζευγμένη αντίδραση και στην παρουσία της GSH, της GR και του t-Bu-OOH.

3.2.4. Μέτρηση της καταλάσης

Η καταλάση είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο που είναι παρόν στα κύτταρα των θηλαστικών και των μη θηλαστικών που περιέχουν ένα σύστημα κυτοχρώματος. Αρχικά απομονώθηκε από ήπαρ βοδιού και αργότερα από το αίμα, από βακτήρια και από φυτά. Το ένζυμο περιέχει 4 ομάδες σιδηροαιμοπρωτεϊνών για κάθε μόριο. Το ένζυμο έχει μοριακό βάρος 240 kDa. Η δραστικότητα της καταλάσης ποικίλει μεταξύ των ιστών. Η υψηλότερη δραστικότητα είναι στο ήπαρ, στα νεφρά και η χαμηλότερη στους συνδετικούς ιστούς. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το ένζυμο συγκεντρώνεται στα υπεροξεισώματα (Zamocky 1999). Η καταλάση μετράται με 2 μεθόδους. 1) Μια χρωματομετρική-έμμεση μέθοδο που βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης μιας χρωμογόνου ουσίας, που παράγεται μετά από την αντίδραση ενός υποστρώματος με το υπεροξειδίο του υδρογόνου, που απομένει μετά την αντίδραση με την καταλάση. 2) Με την άμεση μέθοδο του Aebi που μετρά τον ρυθμό της διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου από την καταλάση στο UV (Aebi 1984). Επειδή η χρωματομετρική-έμμεση μέθοδος επηρεάζεται περισσότερο από ουσίες που υπάρχουν στο αίμα (αιμοσφαιρίνη, αντιπηκτικά, αλβουμίνη, γλυκόζη, ασκορβικό οξύ) η καταλάση μετρήθηκε με την άμεση μέθοδο στο UV.

Παρασκευή Διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (50 mM KH_2PO_4 , pH 7).

Σε 80 ml νερού προστίθεται 10 ml KH_2PO_4 1M. Ρύθμιση του pH και συμπλήρωση του όγκου στα 100 ml.

Κατάλαση από ήπαρ αγελάδας (106 units/ml).

Αραιώση 10.000 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης.

Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 20 mM.

Αραιώση 10 φορές του διαλύματος H_2O_2 30%. Το τελικό διάλυμα έχει συγκέντρωση 3-4%. Λόγω ανακρίβειας της αρχικής συγκέντρωσης διαλύματος, το H_2O_2 προσδιορίζεται φωτομετρικά σε ένα αραιό διάλυμα από τον τύπο (ως τυφλό χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα).

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{mM}} = A_{240} / \epsilon^{\text{mM}}, \text{ όπου } \epsilon^{\text{mM}} = 0.0436$$

Σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος διαλύονται 230 μl διαλύματος H_2O_2 3% (διάλυμα 20mM). Η συγκέντρωση προσδιορίζεται φωτομετρικά και γίνονται οι κατάλληλες διορθώσεις για να έχουμε ένα διάλυμα που να έχει ακριβώς συγκέντρωση 20mM. Αυτό το διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί για 6 ημέρες στους 4°C.

Κατεργασία δείγματος

Το αιμόλυμα (Παράγραφος 3.1) χρησιμοποιείται πάντα φρέσκο και διατηρείται στους 4°C μέχρι την ανάλυση του. Το αιμόλυμα αραιώθηκε 40 φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, ούτως ώστε οι πρωτεΐνες να είναι της τάξης του 0,2 mg/ml. Η μεταβολή της απορρόφησης ήταν 0,21-0,71.

Κινητική μέθοδος μέτρησης ενζυμικής δραστηριότητας κατάλασης

Η μέθοδος συμπεριλαμβάνει τη φωτομετρική μείωση της απορρόφησης του H_2O_2 στα 240 nm με ένα κινητικό πρόγραμμα. Η μέθοδος εκτελείται σε μια μικρή περίοδο (30 δευτερόλεπτα), λόγω του γεγονότος ότι η συγκέντρωση του H_2O_2 είναι πολύ μικρότερη από την K_M (1.2 M) του συστήματος. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Σε μια κυψελίδα των 2 ml γίνεται η προσθήκη των αντιδραστηρίων σύμφωνα με τον παρακάτω Πίνακα 32:

Πίνακας 32: Οι αναλογίες σε μl των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της καταλάσης.

	Δείγμα (μl)	Ρυθμιστικό Διάλυμα (μl)	Διάλυμα H ₂ O ₂ 20 mM (μl)
Τυφλό	10	990	1000
Δείγμα	10	990	1000

Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη του H₂O₂. Η μείωση της απορρόφησης παρακολούθηθηκε για 30 δευτερόλεπτα με ένα κινητικό πρόγραμμα. Η αρχική απορρόφηση πρέπει να είναι ακριβώς 0,5. Το κινητικό πρόγραμμα είχε τις ακόλουθες παράμετρους:

Αρχική καθυστέρηση: 3 δευτερόλεπτα

Μεσοδιάστημα μετρήσεων: 5 δευτερόλεπτα

Αριθμός μετρήσεων: 7

Το φωτόμετρο δίνει αυτόματα τη μεταβολή της απορρόφησης στο 1 λεπτό. Μια μονάδα καταλάσης μπορεί να αποσυνθέσει 1 μmole H₂O₂ σε οξυγόνο και σε νερό, στο 1 λεπτό και σε pH 7.0 στους 25°C σε μια συγκέντρωση υποστρώματος 10mM. Η δραστηριότητα της καταλάσης στο δείγμα μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Units/ml} = [\Delta A/\text{min}(\text{τυφλό}) - \Delta A/\text{min}(\text{δείγμα})] \times d \times 2 \times 0.0436/V$$

d = αραίωση του πραγματικού δείγματος

V = όγκος δείγματος στην αντίδραση (x μl= 0.00x ml)

0.0436 = ε^m για το υπεροξειδίο του υδρογόνου

2 = όγκος αντίδρασης σε ml

3.2.5. Μέτρηση της Υπεροξειδικής Δισμουτάσης

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) έχει μεγάλη θερμική σταθερότητα. Η αποθήκευση στους 4°C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50mM, pH 7,4 δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα της. Είναι σταθερή πάνω από ένα χρόνο στους 4°C. Η υπεροξειδική δισμουτάση αδρανοποιείται από το H₂O₂. Η μέτρηση έγινε σύμφωνα με τη χρωματομετρική μέθοδο των McCord και Fridovich με κάποιες τροποποιήσεις. Σε αυτή τη μέθοδο, η αντίδραση μεταξύ της ξανθίνης και της οξειδάσης της ξανθίνης συμβάλλει στη δημιουργία της υπεροξειδικής ρίζας (O₂^{•-}) μέσω της

παραγωγής του ουρικού οξέος. Η υπεροξειδική ρίζα που παράγεται αντιδρά με το άλας του p-ιοδονιτροτεταζολικού οξέος (INT) για να παράγει μια κόκκινη χρωστική. Η υπεροξειδική δισμουτάση που είναι παρόν στο δείγμα ανταγωνίζεται με το INT για την παραγωγή της υπεροξειδικής ρίζας και έτσι αναστέλλει την παραγωγή της χρωστικής. Η SOD μετράται με το βαθμό της αναστολής της δημιουργίας της χρωστικής (McCord 1969).

Παρασκευή διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα 50mM CAPS, 0.94mM EDTA, pH 8.

Διάλυση 0,55γρ CAPS και 0,013 γρ EDTA σε 50 ml νερό.

Διάλυμα 2,5 mM INT και 5 mM ξανθίνης.

Διάλυση 0,076 γρ ξανθίνης και 0,012 γρ INT σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος.

Διάλυμα εργασίας (0.025 mM INT και 0.05 mM ξανθίνης).

Διάλυση 1 ml 2,5mM INT και 1 ml 5mM ξανθίνης σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος.

Πρότυπο διάλυμα υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Χρησιμοποιήθηκε η υπεροξειδική δισμουτάση από ερυθροκύτταρα βοδιού. Είναι ένα ομοδιμερικό ένζυμο που αποτελείται από 2 άτομα χαλκού και 2 άτομα ψευδαργύρου. Το εύρος pH λειτουργίας του ενζύμου είναι 7,6-10,5. Το βέλτιστο pH είναι 7,8. Η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 25°C. Το ισοηλεκτρικό σημείο είναι 4,95. Αναστολείς του ενζύμου είναι η κυανιδίνη, η υδροξυλική ρίζα και το υπεροξειδίο του υδρογόνου.

Κατεργασία δείγματος

Το αιμόλυμα (Παράγραφος 3.1) αραιώθηκε 50 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα 0,01M KH_2PO_4 , pH 7.

Κινητική μέθοδος μέτρησης της υπεροξειδικής δισμουτάσης

Σε 340 μl αντιδραστηρίου εργασίας προστέθηκε 10 μl δείγματος. Καταγράφηκε η πρώτη απορρόφηση και μετά από επώαση 30 δευτερολέπτων, προστέθηκε 50 μl οξειδάσης της ξανθίνης 0.08 U/ml. Ακολούθησε μέτρηση στα 500 nm για 3 λεπτά. Μια μονάδα δραστηριότητας ανέστειλε το ρυθμό της αναγωγής του INT κατά 50%, χρησιμοποιώντας ξανθίνη και οξειδάση της ξανθίνης σε

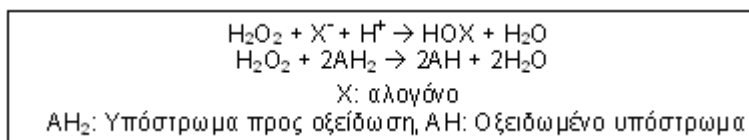
pH 8, στους 25°C, σε 3 ml όγκο αντίδρασης. Η συγκέντρωση της οξειδάσης της ξανθίνης παράγει μια αρχική (μη ανασταλμένη) αύξηση της απορρόφησης στο λεπτό ($\Delta A_{500/\lambda_{\text{επτό}}}=0,025\pm 0,005$).

Υπολογισμός δραστικότητας

Κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη της υπεροξειδικής δισμουτάσης και από την πρότυπη καμπύλη υπολογίστηκε η δραστικότητα του ενζύμου στα δείγματα των ασθενών και των μαρτύρων (Παράρτημα II).

3.2.6. Μέτρηση της Μυελοϋπεροξειδάσης

Η μέτρηση της Μυελοϋπεροξειδάσης (MPO) βασίστηκε στην ικανότητα της να οξειδώνει διάφορα υποστρώματα με τη βοήθεια του H_2O_2 . Η αύξηση της απορρόφησης του παραγόμενου έγχρωμου προϊόντος είναι ανάλογη της δραστικότητας της MPO. Η MPO καταλύει την οξείδωση των ανόργανων αλογόνων ιόντων (Cl^- , I^- , Br^-), ψευδοαλίδη SCN^- και διαφόρων άλλων ουσιών.



Για την εύρεση της πιο ευαίσθητης μεθόδου δοκιμάστηκαν τα παρακάτω υποστρώματα της MPO.

1) Τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB): Είναι λιγότερο επικίνδυνη από τα υπόλοιπα υποστρώματα των υπεροξειδασών (δεν είναι καρκινογόνος, ούτε μεταλλαξιογόνος). Είναι αρκετά ευαίσθητη γιατί μπορεί να ανιχνεύσει συγκεντρώσεις ενζύμου 1nM πολύ εύκολα. Είναι γραμμική με το χρόνο μέχρι και τα 3 λεπτά, ενώ άλλες μεθόδους είναι γραμμικές μόνο τα πρώτα δευτερόλεπτα (Bozeman 1990). Τα μειονεκτήματα της είναι ότι το TMB είναι αρκετά ευαίσθητο στο φως και πρέπει να προστατεύεται από την άμεση έκθεση στο φως και από το UV. Για αντιδράσεις τελικού σημείου η αντίδραση μπορεί να σταματήσει με την προσθήκη 1N και 2N υδροχλωρικού οξέος ισοδύναμου όγκου, με τον όγκο του υποστρώματος. Το κίτρινο τελικό προϊόν είναι σταθερό για 1 ώρα. 2) Γουαικόλη: Είναι από τις πιο κοινές μεθόδους που χρησιμοποιούνται πιο συχνά. Τα μειονεκτήματα της είναι, ότι η αρχική δημιουργία του οξειδωμένου προϊόντος είναι σχετικά γραμμική στα πρώτα 40 δευτερόλεπτα, φτάνοντας ένα μέγιστο επίπεδο στα 43 δευτερόλεπτα και

ακολουθούμενο από μια χαμηλή αλλά διακριτή μείωση. 3) Διαμινοβενζιδίνη (DAB): Η διαμινοβενζιδίνη από μόνη της δεν είναι ευαίσθητο υπόστρωμα. Ο συνδυασμός του DAB και της γουαικόλης αυξάνει την ενζυμική δραστηριότητα 2-3 φορές συγκρίνοντας το με μόνη τη διαμινοβενζιδίνη ή τη γουαικόλη. Προφανώς οι οξειδοαναγωγικοί κύκλοι της γουαικόλης φαίνεται να ενισχύουν την οξείδωση του DAB στην παρουσία της υπεροξειδάσης και του υπεροξειδίου του υδρογόνου. 4) Ο-διανισιδίνη: Είναι λιγότερο ευαίσθητη από την TMB. Είναι καρκινογόνος και μεταλλαξιγόνος.

Τα βιολογικά δείγματα περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις χλωρίου και χαμηλές συγκεντρώσεις στα άλλα αλογόνα. Ιονικά (CETAC) και μη ιονικά απορρυπαντικά (Triton-X-100) αναστέλλουν τη δραστηριότητα της MPO σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 0.03% w/v. Συγκεντρώσεις 0.003% w/v είναι οι βέλτιστες. Συγκεντρώσεις χλωρίου υψηλότερες από 20mM αναστέλλουν την MPO αλλά όχι την EPO (Schneider 1996). Συγκεντρώσεις CETAB μεγαλύτερες από 0.11% w/v προκαλούν αναστολή της αντίδρασης λόγω της δημιουργίας ιζήματος μεταξύ του TMB και των οξειδωμένων προϊόντων (Thomas 1983). Η Km για το H₂O₂ επηρεάζεται από τη συνδυασμένη παρουσία του χλωρίου και από τις όξινες συνθήκες του pH. Στην απουσία χλωρίου η Km είναι ανεξάρτητη του pH. Η εξάρτηση της Km από το χλώριο αυξάνεται όσο μειώνεται το pH. Τα ιόντα χλωρίου έχουν διπλό ρόλο, δρουν ως υπόστρωμα και ως αναστολείς. Κάτω από όλες τις συνθήκες του pH και των ιόντων χλωρίου, η MPO αναστέλλεται πάνω από 0,46 mM H₂O₂. Σε απουσία χλωρίου, η μέγιστη δραστηριότητα μετατοπίζεται από 0,21 mM H₂O₂ στο pH 7.4, σε 0,46 mM H₂O₂ στο pH 5. Έτσι η ικανότητα της MPO να καταλύει την οξείδωση του χλωρίου μειώνεται όσο αυξάνεται το pH. Το προτεινόμενο μοντέλο για αυτήν την εξήγηση είναι ότι υπάρχουν 2 θέσεις δέσμευσης του χλωρίου. Η μία που δεσμεύεται ως υπόστρωμα και είναι ανεξάρτητη η δέσμευση από τα πρωτόνια και οδηγεί στην παραγωγή του υποχλωρικού οξέος και η άλλη που δεσμεύεται ως αναστολέας. Σε αυτή τη θέση απαιτείται πρώτα η πρωτονίωση που συμβάλλει στη συναγωνιστική αναστολή της δέσμευσης του H₂O₂ (Andrews 1982).

Η λύση των λευκών επιτυγχάνεται με χρήση ασθενών οξέων ή απορρυπαντικών (π.χ. 0,05% Triton X-100, 0,02% CETAB). Για τη μέτρηση της MPO χρησιμοποιήσαμε την τροποποιημένη μέθοδο από τους Marquez and Dunford. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην

οξειδωση της TMB από την MPO που συμβάλλει στη δημιουργία μιας κατιονικής ελεύθερης ρίζας του TMB (Marquez 1997).

Παρασκευή διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα Na_2PO_4 80 mM, pH 5.4.

Διάλυση 0,8 γρ Na_2PO_4 σε 80 ml νερού. Ρύθμιση pH με NaOH 2 N και συμπλήρωση όγκου στα 100 ml.

Διάλυμα 3% δεξτράνη.

Διάλυση 3 γρ δεξτράνης σε 100 ml 0.9% NaCl .

Διάλυμα λύσης ερυθρών (0.155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0.1 mM EDTA, pH 7.2).

Διάλυση 0.8 γρ NH_4Cl , 0.1 γρ KHCO_3 και 0,003 γρ EDTA σε 100 ml νερού.

Διάλυμα λύσης λευκών (0.05% CTAB σε νερό).

Διάλυση 0.05 γρ CTAB σε 100 ml νερό.

Διάλυμα TMB 17.5 μM .

Διάλυση 0.014 γρ TMB σε 2 ml διμεθυλοφορμαμίδης.

Διάλυμα H_2O_2 10 mM.

Διάλυση 20 ml διαλύματος H_2O_2 30%, σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος (διάλυμα 200 mM). Από το παραπάνω διάλυμα διαλύονται 50 μl στο 1 ml με ρυθμιστικό διάλυμα (20 φορές αραίωση). Η αναμενόμενη συγκέντρωση είναι 10-15 mM. Υπολογίζετε φωτομετρικά η συγκέντρωση και υπολογίζετε η αραίωση που χρειάζεται για να δημιουργηθεί ένα διάλυμα 10 mM.

Διάλυμα εργασίας.

Για 10 ml διαλύματος εργασίας αναμειγνύονται 8,9 ml ρυθμιστικού διαλύματος, 0.3 ml H_2O_2 10 mM και 0,8 ml TMB 17.5 mM. Το διάλυμα εργασίας επωάζεται στους 37°C για 15 λεπτά, προστατευμένο από το φως.

Κινητική μέθοδος μέτρησης ενζυμικής δραστηριότητας μυελοϋπεροξειδάσης

Σε πλακίδιο εργασίας 96 θέσεων προστέθηκε 390 μl διαλύματος εργασίας και 10 μl δείγμα (λύμα λευκών, Παράγραφος 3.1). Έγινε ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα και μετρήθηκε η αύξηση της απορρόφησης στα 650 nm σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα:

Μεσοδιάστημα μετρήσεων 30 δευτερόλεπτα

Αριθμός μετρήσεων 6

Η δραστηριότητα υπολογίστηκε από τον τύπο

$$\text{Units/ml} = [\Delta A/\text{min}(\text{τυφλό}) - \Delta A/\text{min}(\text{δείγμα})] \times d \times v \times 14,56/V$$

d = αραίωση του πραγματικού δείγματος

V = όγκος δείγματος στην αντίδραση (x μl= 0.00x ml)

14,56= ϵ^{mM} για το TMB

v = όγκος αντίδρασης σε ml

3.2.7. Μέτρηση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων

Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεϋδικές και κετονικές) παράγονται μετά από οξείδωση των πλευρικών αλυσίδων των πρωτεϊνών (ειδικά της Προλίνης, της Λυσίνης, της Αργινίνης και της Θρεονίνης). Αυτά τα συστατικά είναι χημικά σταθερά, πράγμα σημαντικό για την ανίχνευση και την αποθήκευσή τους. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια μετρώνται με χρωματομετρικές μεθόδους, φασματοφωτομετρικά και ανοσοενζυμικά (ELISA) στον ιστό που μας αφορά ή στο πλάσμα (Dalle-Donne 2003). Η μέθοδος μέτρησης στη παρούσα μελέτη έγινε σύμφωνα με μια κλασική μέθοδο μέτρησης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων που περιλαμβάνει την αντίδραση των καρβονυλικών ομάδων με την δινιτροφαινυλουδραζίνη (DNPH) και την φασματοφωτομετρική ποσοτικοποίηση της όξινης υδραζόνης στα 370 nm (Levine 1990, Levine 1994).

Παρασκευή διαλυμάτων

Διάλυμα PBS (10 mM Na₂HPO₄, 0.14 M NaCl)

Διάλυση 0,14 γρ Na₂HPO₄ και 0,8 γρ NaCl σε 100 ml νερού.

Διάλυμα 2N HCl

Προσθήκη 165 ml 37% HCl και συμπλήρωση νερού μέχρι το 1 λίτρο.

Διάλυμα 40% TCA τριχλωροακετικού οξέος (w/v)

Διάλυση 40 γρ τριχλωροακετικού οξέος σε 40 ml νερού. Προσθήκη νερού μέχρι τα 100 ml σε βαθμονομημένο σκεύος.

Διάλυμα 20% TCA τριχλωροακετικού οξέος (w/v).

Παρασκευάζεται με αραίωση από το 40% διάλυμα.

Διάλυμα 10 mM δινιτροφαινύλυδραζίνη (DNPH).

Σε 10 ml 2N HCl διαλύονται 0,019 γρ DNPH. Γίνεται αποθήκευση του διαλύματος στο σκοτάδι. Το διάλυμα είναι σταθερό για 2 εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα υδροχλωρικής γουανίνης 6M.

Σε 5 ml διαλύονται 5,7γρ υδροχλωρικής γουανίνης και προστίθεται νερό μέχρι τα 10 ml σε βαθμονομημένο σκεύος.

Μέθοδος μέτρησης Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων

Σε 1 ml διαλύματος PBS προστέθηκαν 200 μl ορού. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 5.000 g. Στο υπερκείμενο (γύρω στο 1 ml) προστέθηκε 1 ml TCA 40% και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 5.000 g. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και στο ίζημα πρωτεΐνης προστέθηκε 1 ml 10 mM DNPH σε 2N HCL και επώαστηκε στο σκοτάδι για 1 ώρα με ανάδευση κάθε 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml TCA 40% και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 5.000 g. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και στο ίζημα πρωτεΐνης προστέθηκε 1 ml TCA 10-20%. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5-10 λεπτά στις 5.000 g. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και στο ίζημα πρωτεΐνης προστέθηκε 1 ml διαλύματος αιθανόλης/οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία 1:1. Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 1 λεπτό, ούτως ώστε να ομογενοποιηθεί το ίζημα και να απομακρυνθεί το αντιδραστήριο DNPH αποτελεσματικά από όλα τα σημεία του ιζήματος. Η

τελευταία διεργασία επαναλήφθηκε άλλες 3 φορές. Στη συνέχεια προστέθηκε στο ίζημα 1ml 6M υδροχλωρική γουανιδίνη σε 2N HCl και τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο με ανακίνηση. Σε αυτό το στάδιο τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι σταθερά για 24 ώρες στους 4°C. Το τυφλό κατεργάστηκε με την ίδια διεργασία όπως και το δείγμα με τη διαφορά ότι αντί για τη δινιτροφαινυλουδραζίνη που αντιδρά με τα πρωτεϊνικά καρβονύλια προστέθηκε 1ml 2N HCl. Η μη ειδική απορρόφηση λόγω του ελεύθερου αντιδραστήριου της DNPH που μένει μετά από τις πλύσεις μπορεί να εκτιμηθεί με μέτρηση της απορρόφησης του πλήρως ανηγμένου δείγματος με 20 mM Βορουδρικό νάτριο (NaBH₄).

Υπολογισμός συγκέντρωσης

Μετράται η απορρόφηση έναντι του τυφλού του κάθε δείγματος στα 370 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης γίνεται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$[\text{nmole/well}] = 45.45 \cdot A_{375}$$

$$[\text{nmole/mgr protein}] = [\text{nmole/well}] / [\text{mgr proteins δείγματος}]$$

Οι πρωτεΐνες στο δείγμα μετρήθηκαν με τη μέθοδο της διουρίας. Η διουρία περιέχει υδροξείδιο του νατρίου 200 mM, τρυγικό κάλιο νάτριο 32 mM, θειικό χαλκό 18 mM και ιωδιούχο κάλιο 30 mM. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι τα λευκώματα σε αλκαλικό περιβάλλον με την παρουσία ιόντων χαλκού σχηματίζουν ένα βιολετί-μπλε έγχρωμο σύμπλοκο, του οποίου η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των λευκωμάτων του δείγματος. Το αντιδραστήριο διουρίας είναι σταθερό για αρκετό χρονικό διάστημα όταν διατηρείται στο 2-25°C προστατευμένο από το ηλιακό φως. Η αντίδραση είναι γραμμική μέχρι από 1-120 mgr/ml. Τα προς μέτρηση δείγματα περιέχουν 4-10 mgr/ml πρωτεΐνη.

3.2.8. Μέτρηση 3-Νιτροτυροσίνης

Η 3-νιτροτυροσίνη έχει ταυτοποιηθεί ως ένας δείκτης φλεγμονής και παραγωγής του NO. Η 3-νιτροτυροσίνη δημιουργείται στην παρουσία ενεργών μεταβολιτών του NO. Ποικίλα μονοπάτια που συμπεριλαμβάνουν τη δημιουργία του υπεροξυνιτρώδους οδηγούν στην παραγωγή της 3-νιτροτυροσίνης. Από τη στιγμή που η 3-νιτροτυροσίνη είναι ένα σταθερό τελικό προϊόν της

οξειδωσης του υπεροξυνιτροδους, η ανάλυση της στο πλάσμα μπορεί να είναι χρήσιμη ως δείκτης εξαρτώμενης βλάβης του NO in vivo. Επιπλέον, οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν μακρύτερη διάρκεια ημίσειας ζωής στη κυκλοφορία, από ότι τα επίπεδα του NO. Η παρουσία της 3-νιτροτυροσίνης έχει βρεθεί σε αρκετές φλεγμονώδεις διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου τις πλάκες αθηροσκλήρωσης, τη κοιλιοκάκη, τη ρευματοειδή ασθένεια, τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και το σεπτικό σοκ. Σε φυσιολογικούς ανθρώπους χαμηλά και μη ανιχνεύσιμα επίπεδα 3-νιτροτυροσίνης είναι παρόντα. Η νιτροσυλίωση των αμινοξέων της τυροσίνης συμβαίνει για την ελεύθερη τυροσίνη και την πρωτεΐνοσυνδεόμενη.

Οι συνηθισμένες μετρήσεις της 3-νιτροτυροσίνης στα βιολογικά δείγματα και ειδικά στα ούρα είναι ένα ενυπάρχων προκλητικό αναλυτικό πρόβλημα λόγω των χαμηλών επιπέδων της και την πολυπλοκότητα του δείγματος των ούρων. Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία οι τεχνικές μέτρησης που αναφέρονται είναι η χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) συζευγμένη με διάφορους ανιχνευτές [ηλεκτροχημικό ανιχνευτή, φθορίζων ανιχνευτή, ανιχνευτή υπεριώδους ορατού (UV), φασματογράφο μάζας (MS)] καθώς επίσης και ανοσοενζυμικές μέθοδοι όπως είναι η ELISA και τα dot blot (Western Blotting και Dot Blotting). Η LC-MS προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα. Στη βιβλιογραφία όμως υπάρχει μια σύγχυση στις τιμές που αναφέρει ο καθένας. Ο Halliwell και Kaur αναφέρουν τα επίπεδα της 3-νιτροτυροσίνης με HPLC να είναι πάνω από 272 ngr/ml στο αρθρικό υγρό. Ενώ ο Duncan και οι συνεργάτες του που τα μετρήσε με LC-MS τα βρήκε εκατό φορές μικρότερα (<1 ngr/ml) (Duncan 2003).

Αρχικά έγινε μια προσπάθεια ανάλυσης της 3-νιτροτυροσίνης με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) συζευγμένη με ηλεκτροχημική ανίχνευση και ανίχνευση υπεριώδους-ορατού (UV) στα ούρα. Αν και η εκχύλιση στερεάς-φάσης μείωσε την πολυπλοκότητα των χρωματογραφημάτων παρατηρήθηκε πάλι η ύπαρξη αρκετών ενδιάμεσων κορυφών στο χρωματογράφημα ακόμα και με δύο στάδια πλύσης. Η μεγάλη δυσκολία στην εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ανάλυσης ήταν η συχνότητα με την οποία οι μικρότερες κορυφές ενσωματωνόταν με τη κορυφή του αναλύτη μας, λόγω συνεκλουόμενης μόλυνσης. Αυτές οι κορυφές που εξαρτώνται από τη συγκέντρωση των ούρων σε διάφορα συστατικά θα οδηγούσαν σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρει και ο Bogdanov που αναφέρει

την παρουσία 8-14 κορυφών στο χρωματογράφημα ακόμη και μετά από αρκετά στάδια καθαρισμού των ούρων (Bogdanov 1999). Αυτές οι κορυφές ποικίλουν ανάμεσα στα άτομα και τις διαταραχές. Ο Hensley αναφέρει πως υπάρχει ένα συνεκλουόμενο συστατικό με την 3-νιτροτυροσίνη στο χρωματογράφημα, σε ασθενείς με Alzheimer που διαφέρει από την 3-νιτροτυροσίνη στα φασφατοφωτομετρικά χαρακτηριστικά (Hensley 1998). Για τους παραπάνω λόγους αποκλείστηκε η μέτρηση της 3-νιτροτυροσίνης με υγρή χρωματογραφία. Η 3-νιτροτυροσίνη μετρήθηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο με ειδικό κιτ που προμηθεύτηκε από την εταιρία HycultBiotechnology. Η ελάχιστη συγκέντρωση που μπορεί να μετρηθεί με το συγκεκριμένο αντιδραστήριο είναι 2nM. Το εύρος της μετρούμενης συγκέντρωσης είναι 2-1500 nM.

Παρασκευή διαλυμάτων

Το κιτ περιέχει 2 πλακίδια εργασίας Elisa που είναι καλυμμένα με το ειδικό αντίσωμα της 3-νιτροτυροσίνης. Τα περιεχόμενα του κιτ αποθηκεύθηκαν στους 4°C. Λίγο πριν τη χρήση τους τα αντιδραστήρια μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία 18-25 °C. Τα έτοιμα προς χρήση αντιδραστήρια του κιτ για μέτρηση 96 δειγμάτων ήταν τα παρακάτω:

Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης που περιέχει Tween 20 (20 ml).

Το διάλυμα αραιώθηκε 40 φορές με απιονισμένο νερό. Τα 20 ml διαλύθηκαν σε 780 ml απιονισμένο νερό.

Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης.

Διάλυμα PBS έχοντας πρωτεΐνη ως σταθεροποιητή και 2-χλωροακεταμίδη ως συντηρητικό.

3-νιτροτυροσίνη σε λυοφιλοποιημένη μορφή.

Ανασύσταση με 1 ml απιονισμένο νερό, ούτως ώστε να δημιουργηθεί διάλυμα 4μM.

Αντίσωμα ενάντια στη 3-νιτροτυροσίνη σε λυοφιλοποιημένη μορφή.

Ανασύσταση με 1 ml απιονισμένο νερό.

Υπεροξειδάση που συνδέεται στο αντίσωμα της 3-νιτροτυροσίνης σε λυοφιλοποιημένη μορφή.

Ανασύσταση με 1 ml απιονισμένο νερό και στη συνέχεια αραιώση στα 11 ml ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσης.

Διάλυμα τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB).

Έτοιμο προς χρήση.

Διάλυμα κιτρικού οξέος 2M.

Έτοιμο προς χρήση.

Κατεργασία δειγμάτων

Το πλάσμα αραιώθηκε 10 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης.

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Το πρότυπο διάλυμα 4μM αραιώθηκε στις συγκεντρώσεις του πίνακα σε σωλήνες πολυπροπυλενίου, ούτως ώστε να δημιουργηθεί το εύρος συγκέντρωσης 2-1500 nM (Πίνακας 33).

Πίνακας 33: Κατασκευή πρότυπης καμπύλης με διαδοχικές αραιώσεις.

Σωλήνες	Συγκέντρωση	Όγκος προτύπου που μεταφέρεται από τον ένα σωλήνα στον άλλον	Όγκος Ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσης
1	0		500
2	2,1	125	250
3	6,2	125	250
4	18,5	125	250
5	55,6	125	250
6	166,7	125	250
7	500	125	250
8	1500	125	250

Μέθοδος μέτρησης της 3-νιτροτυροσίνης

100 μl δείγματος και προτύπου προστέθηκαν στα πηγαδάκια του πλακιδίου εργασίας και επωάστηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C). Ακολούθησε 4 φορές πλύση με 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος, για απομάκρυνση ότι δεν συνδέθηκε ισχυρά με την 3-νιτροτυροσίνη. Προσθήκη 100 μl του διαλύματος που περιέχει το αντίσωμα έναντι στη 3-νιτροτυροσίνη και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε 4 φορές πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης όπως προηγουμένως και προσθήκη 100 μl διαλύματος που περιέχει την υπεροξειδάση για σύνδεση στο αντίσωμα της 3-νιτροτυροσίνης. Έγινε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και εκ νέου ακολούθησε 4 φορές πλύση με ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης όπως προηγουμένως. Προσθήκη 100μl διαλύματος TMB σε κάθε φρεάτιο και επώαση για

20-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 100μl διαλύματος κιτρικού οξέος 2M και το περιεχόμενο των φρεατίων μετρήθηκε στα 450 nm.

Υπολογισμός συγκέντρωσης

Τα πρότυπα διαλύματα έδωσαν τις παρακάτω απορροφήσεις σύμφωνα με τον παρακάτω Πίνακα 34. Κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη (Παράρτημα II) και υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις.

Πίνακας 34: Αναμενόμενες απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων.

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ
0	0,11
2,1	0,131
6,2	0,158
18,5	0,225
55,6	0,45
166,7	1,096
500	2,241
1500	3,049

3.2.9. Μέτρηση 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνης

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ) που παράγονται ενδογενώς ή εξωγενώς μπορούν να προκαλέσουν μετάλλαξη στο DNA και ως εκ τούτου βλάβη στο κύτταρο. Το νουκλεοσίδιο 2'-δεοξυγουανοσίνη (dG) αντιδρά με τις ΔΜΟ και υδροξυλιώνεται στην C-8 θέση παράγοντας την 8-υδρόξυ-2'-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG). Μετά την αποκατάσταση του κατεστραμμένου DNA, η 8-OHdG εκκρίνεται στα ούρα χωρίς περαιτέρω μεταβολισμό. Η 8-OHdG των ούρων είναι η πιο συχνά μελετημένη και ανιχνεύσιμη κατεστραμμένη βλάβη του DNA και έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί ως ένας ευαίσθητος δείκτης της οξειδωτικής βλάβης του DNA και του οξειδωτικού στρες *in vivo* (Peoples 2005).

Η 8-OHdG μπορεί να μετρηθεί στο DNA και στα σωματικά υγρά. Η μέτρηση της στα ούρα είναι προτιμότερη από ότι στο πλάσμα και στο DNA, γιατί στα ούρα είναι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Επίσης, η αποκοπή της 8-OHdG από το DNA δεν είναι μια γρήγορη διεργασία και

έτσι η έκκριση της στα ούρα είναι ισοδύναμη της δημιουργίας της στο DNA. Ένα άλλο μειονέκτημα της ανάλυσης της 8-OHdG στο DNA είναι ότι δημιουργείται εύκολα, ως ένα παραπροϊόν κατά την απομόνωση του DNA (10 φορές απόκλιση στις μετρήσεις μεταξύ των εργαστηρίων) (Kasai 2002). Στα ούρα όμως δεν υπάρχει αυτό το πρόβλημα, λόγω της υψηλής ποσότητας ουρικού οξέος (αντιοξειδωτικού) που αποτρέπει την παραπέρα οξειδωση της δεοξυγουανοσίνης στα ούρα.

Η μέτρηση της 8-OHdG στο γενωμικό DNA γίνεται με HPLC-ECD και GC/MS. Η μέτρηση της 8-OHdG μπορεί να γίνει επίσης στα κυκλοφορούντα λευκοκύτταρα. Σε αυτή την περίπτωση το αίμα υφίσταται μια κατεργασία για καθαρισμό του DNA (Fraga 1990) και μετά την προσθήκη νουκλεάσης P1 και ALP το δείγμα φιλτράρεται και αναλύεται στο σύστημα HPLC (Farinati 1999).

Τα επίπεδα της 8-OHdG στα ούρα και στο πλάσμα μπορούν να υπολογισθούν με αρκετές μεθόδους, όπως είναι η LC-MS/MS (υγρή χρωματογραφία με φασματογράφο μάζας), η GC-MS (αέρια χρωματογραφία με φασματογράφο μάζας) (Lin 2004), η HPLC-ECD (υγρή χρωματογραφία με ηλεκτροχημική ανίχνευση) (Peoples 2005, Helbock 1998, Shigenaga 1989) και η ELISA (Wu 2004). Η ELISA είναι λιγότερο ποσοτική από τις χρωματογραφικές μεθόδους και επιπλέον 10% των δειγμάτων έχουν μια τιμή 4 φορές μεγαλύτερη (Shigenaga 1997). Η ανίχνευση με MS είναι η καλύτερη γιατί επιτρέπει την ανίχνευση περισσοτέρων προϊόντων βλάβης και είναι δυνατή η χρήση ραδιοσημασμένων εσωτερικών προτύπων για ακριβή μέτρηση (Ravanat 1998). Από την άλλη πλευρά όμως οι μέθοδοι με GC και με MS/HPLC είναι επίπονες και δύσκολες για αναλύσεις ρουτίνας.

Η 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνη μετρήθηκε με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης, βασιζόμενη σε μια μέθοδο που στήθηκε στο εργαστήριο μας. Η μέθοδος αξιολογήθηκε από την μέτρηση της 8-OHdG στα ούρα υγιών εθελοντών ηλικίας 29 έως 65 χρονών.

Αρκετές χρωματογραφικές συνθήκες εξετάστηκαν. Ο διαχωρισμός του αναλύτη εξαρτάται από το pH, την ιονική δύναμη και την ποσότητα της οργανικής φάσης της κινητής φάσης καθώς επίσης και από τη χημεία της στήλης. Για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών χρωματογραφίας, δοκιμάστηκαν α) διαλύτες πυκνότητας 0-50 mM, β) διαλύτες με pH 3-6,5 και γ) διαλύτες με 2-10%

μεθανόλη, 2-10% ακετονιτρίλιο και διαλύτες με συνδυασμό ακετονιτρίλιο και μεθανόλη και δ) η χημεία της στήλης. Όσο αυξάνεται το pH από 3-5,5 και όσο αυξάνεται το ποσό του οργανικού διαλύτη, τόσο αυξάνονται οι χρόνοι έκλουσης. Πάνω από pH 6 μειώνονται οι χρόνοι έκλουσης. Η πυκνότητα του ρυθμιστικού διαλύματος δεν επηρέασε σημαντικά τη χρωματογραφία. Οι στήλες που δοκιμάστηκαν ήταν οι παρακάτω:

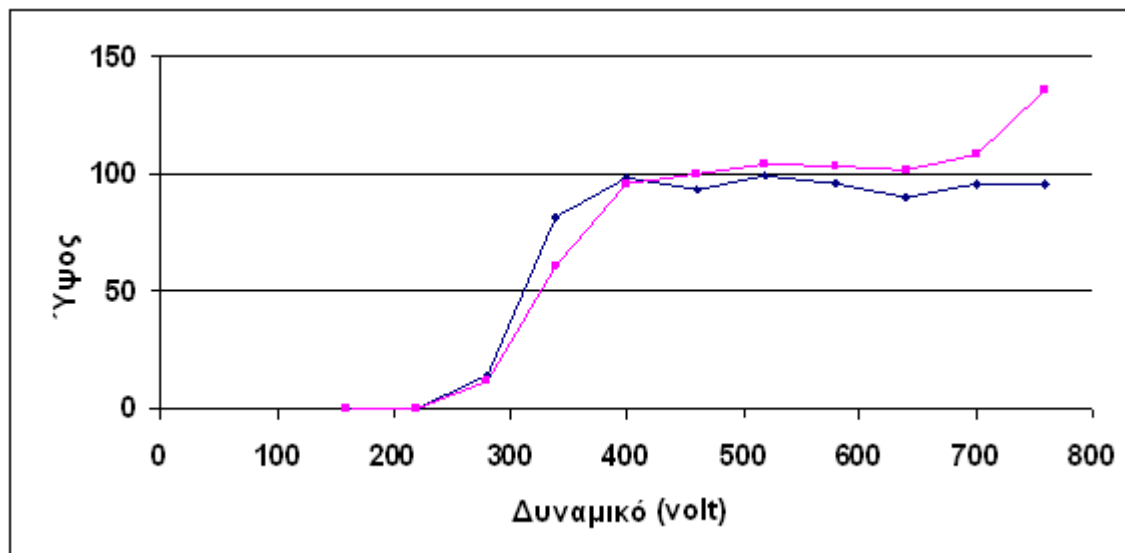
- ✓ Betabasic-C₁₈, 5 μm, 4.6 x 250 mm.
- ✓ Hypersil ODS, C₁₈ 5 μm, 4.6 x 250 mm.

Στη Betabasic-C₁₈, 5 μm, 4.6 x 250 mm ο καλύτερος διαλύτης είχε σύσταση 7% μεθανόλη 93% ρυθμιστικό διάλυμα 25mM οξικό αμμώνιο pH 4,5. Στην Hypersil ODS, C₁₈ 5 μm, 4.6 x 250 mm το καλύτερο χρωματογράφημα αντιστοιχούσε στο διαλύτη με σύσταση 3% ακετονιτρίλιο, 97% ρυθμιστικό διάλυμα 25mM CH₃COONH₄ pH 4.

Για τη μέτρηση ήταν αναγκαίος ο καθαρισμός των ούρων πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα χρωματογραφίας, λόγω της παρουσίας αρκετών αναλυτών. Ο καθαρισμός τους γίνεται σε στήλες εκχύλιση στερεάς φάσης (SolidPhaseExtraction:SPE). Για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης στερεάς φάσης (>80% ανάκτηση του αναλύτη στο έκλουσμα που να περιέχει όσο το δυνατόν λιγότερους άλλους αναλύτες) εξετάστηκαν στήλες διαφορετικής σύστασης από διάφορες εταιρίες και διάφοροι διαλύτες έκπλυσης και έκλουσης. Δοκιμάστηκαν οι εταιρίες Waters, Altech, Oasis, Bond Elut C₁₈, RIGAS. Ως διαλύτες έκπλυσης δοκιμάστηκαν νερό, ρυθμιστικά διαλύματα οξικού αμμωνίου και φωσφορικού καλίου, πυκνότητας 2-50 mM και pH 3-7.5, και οργανικά διαλύματα σύστασης 5-10% ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη. Ως διαλύτες έκλουσης δοκιμάστηκαν διαλύτες σύστασης 15-100% ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη. Από τις διάφορες εταιρίες καταλήξαμε στη Waters Sep Pac C₁₈ γιατί εκεί έχουμε την καλύτερη κατακράτηση κατά τις πλύσεις και την υψηλότερη ανάκτηση κατά την έκλυση σε σχέση με τα σπηλάκια των υπόλοιπων εταιριών που δοκιμάσαμε.

Για να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες για την ηλεκτροχημική ανίχνευση πραγματοποιήθηκαν υδροδυναμικά βολταμογραφήματα. Τα πρότυπα διαλύματα ή τα προκατεργασμένα δείγματα ούρων εισήχθησαν στο σύστημα HPLC και παρακολούθηθηκαν με το αναλυτικό ηλεκτρόδιο σε διαφορετικά δυναμικά (160, 220, 280, 340, 400, 460, 520, 580, 640, 700

και 760 mV). Η βέλτιστη ευαισθησία και επιλεκτικότητα για την 8-OHdG ήταν στα 400 mV. Η Εικόνα 86 δείχνει τα υδροδυναμικά βολταμογραφήματα που πάρθηκαν με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων και ούρων. Κάτω υπό αυτές τις συνθήκες το όριο ανίχνευσης ήταν 0.2 ng/mL.



Εικόνα 86: Υδροδυναμικά βολταμογραφήματα. Ύψος 8-OHdG vs δυναμικό στο πρότυπο (μπλέ) και στα ούρα (ροζ).

Κατεργασία δείγματος

Τα ούρα μετά τη συλλογή τους κατά την πρωινή ούρηση αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την ανάλυσή τους. Κατά την κατεργασία των δειγμάτων, τα δείγματα ξεπάγωσαν και διαλύθηκαν σε ίσο όγκο ουδέτερου ρυθμιστικού διαλύματος για να ανακτηθεί η 8-OHdG από το ίζημα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000 g για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα πρότυπα διαλύματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -25°C ή και στους 4°C . Ο καθαρισμός των ούρων έγινε σε στήλες εκχύλιση στερεάς φάσης (Sep Pac C_{18}) της Waters, σύμφωνα με τον Πίνακα 35. Μετά τον καθαρισμό, το έκλουσμα αραιώθηκε σε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος A και διατηρήθηκαν στους 4°C μέχρι την ανάλυσή τους.

Πίνακας 35: Βήματα καθαρισμού ούρων σε στήλες εκχύλιση στερεάς φάσης.

Κατεργασία	Προσθήκη δείγματος	Πλύσεις	Έκλουση
2 ml μεθανόλη	1 ml ούρα + 1 ml ρυθμιστικό διάλυμα A	1 ml 5% ακετονιτρίλιο σε ρυθμιστικό διάλυμα A	1 ml 30% ακετονιτρίλιο σε νερό
2 ml νερό		2 ml νερό	
2 ml ρυθμιστικό διάλυμα A (25 mM οξικό αμμώνιο pH 6,5)			

Στα δείγματα ούρων προστέθηκε πρότυπο με γνωστές συγκεντρώσεις 8-OHdG. Η ανάκτηση ήταν ικανοποιητική για τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα εμπεριέχονται στον Πίνακα 36.

Πίνακας 36: Ανάκτηση γνωστής ποσότητας 8-OHdG που προστέθηκε στα ούρα. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.

v	8-OHdG (ng/mL) προστέθηκε	8-OHdG (ng/mL) βρέθηκε	% Ανάκτηση
0	0	6±0,2	-
6	22	26±1,2	88±6
6	61	67±5,6	100±9
6	126	130±8,8	98±7

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

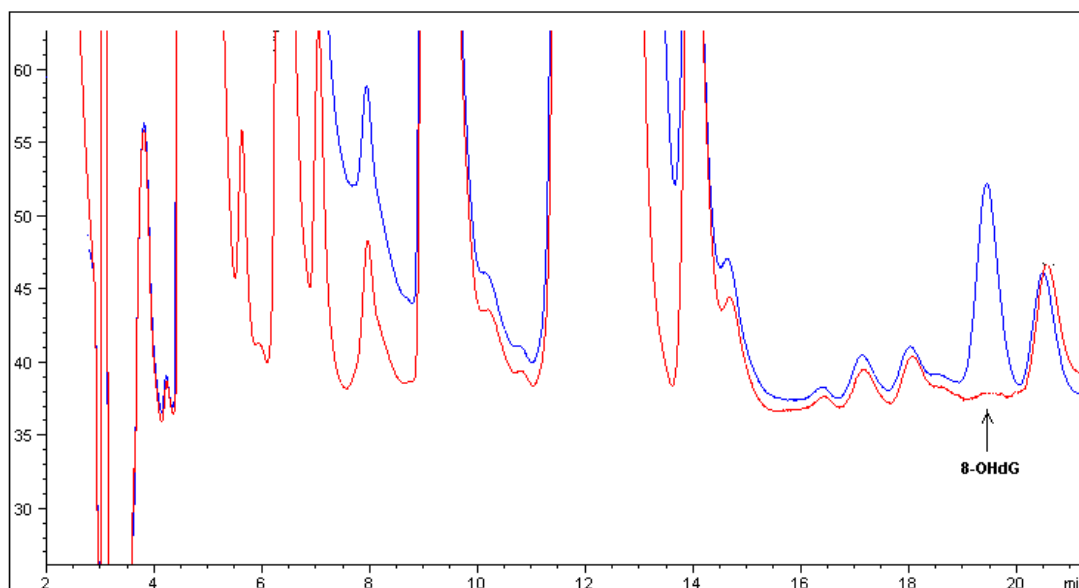
Από αρχικό υδατικό διάλυμα 8-υδροξυ-δεοξυγουανοσίνης 2000 ngr/ml, παρασκευάστηκαν με αραιώση σε νερό, 7 πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 5-250 ngr/ml (Πίνακας 37). Η μέθοδος ήταν γραμμική στο εύρος 5-250 ng/mL.

Πίνακας 37: Παρασκευή πρότυπης καμπύλης.

Σωλήνες	Συγκέντρωση	Όγκος προτύπου 2000 ng/ml που μεταφέρεται (μl)	Όγκος Νερού (μl)
1	5	5	1995
2	10	10	1990
3	20	20	1980
4	50	50	1950
5	100	100	1900
6	200	200	1800
7	500	500	1500

Μέθοδος ανάλυσης

Το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας (Agilent 1100) αποτελείται από μια αντλία, ένα απαερωτή κενού, ένα σύστημα εγχυσής τύπου Rheodyne 77251 που είναι εξοπλισμένο με έναν βρόγχο χωρητικότητας 100μl, έναν μεταβλητού μήκους κύματος ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού και ένα ηλεκτροχημικό ανιχνευτή με διπλό ηλεκτρόδιο τύπου Coulchem (ESA, Inc). Ο ηλεκτροχημικός ανιχνευτής έχει ένα σάνταρ ηλεκτρόδιο ανάλυσης (Model 5010) και ένα προστατευτικό ηλεκτρόδιο (Model 5020). Το ηλεκτρόδιο ανάλυσης είναι εξοπλισμένο με 2 πορώδη ηλεκτρόδια γραφίτη. Το ηλεκτροχημικό ηλεκτρόδιο ρυθμίστηκε στα 400 mV και το προστατευτικό στα 450 mV. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης C18 (Thermo Betabasic-18, 150 A, 5 μm, 4.6 x 250 mm) που προστατευόταν από προστήλη με C18 υλικό. Η έκλουση ήταν ισοκρατική σε θερμοκρασία δωματίου και σε ροή 1 ml/min, με κινητή φάση 7% (v/v) μεθανόλη σε 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 4,5. Η εκτίμηση και η σύγκριση των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε με ανίχνευση υπεριώδους-ορατού στα 254nm παράλληλα με την ηλεκτροχημική ανίχνευση. Κάτω υπό αυτές τις συνθήκες ο χρόνος έκλουσης της 8-OHdG από την στήλη ήταν 20 λεπτά και διαχωριζόταν πολύ καλά από τις άλλες ουσίες. Επικαλυμμένα χρωματογραφήματα ούρων και ούρων με πρότυπο 8-OHdG απεικονίζονται στην Εικόνα 87.



Εικόνα 87: Αλληλεπικαλυπτόμενα χρωματογραφήματα από δείγμα φυσιολογικών ούρων (κόκκινο) και από το ίδιο δείγμα ούρων που είχε προστεθεί 8-OHdG (μπλέ).

Υπολογισμός συγκέντρωσης

Από το κάθε χρωματογραφία καταγράφηκε το ύψος της κάθε κορυφής και υπολογίστηκε η συγκέντρωση από την πρότυπη καμπύλη (Παράρτημα II). Η συγκέντρωση της 8-OHdG εκφράστηκε ως ngr/mgr κρεατίνης, διαιρώντας τη συγκέντρωση της 8OHdG (ngr/ml) με τη συγκέντρωση της κρεατίνης του κάθε δείγματος (mgr/dl). Η κρεατίνη του κάθε δείγματος υπολογίστηκε βασισμένη σε μια μέθοδο όπου η κρεατίνη αντιδρά με πικρικό οξύ σε αλκαλικό περιβάλλον, σχηματίζοντας ένα χρωμογόνο σύμπλοκο. Η αύξηση της απορρόφησης που οφείλεται στο σχηματισμό του συμπλόκου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της κρεατίνης στο δείγμα. Μετά την αρχική φάση επώασης (1 λεπτό), η πορεία της αντίδρασης είναι σταθερή για 2 λεπτά. Το φιαλίδιο εργασίας αποτελούταν από υδροξειδίου του νατρίου 0,16 M και από διάλυμα πικρικού οξέος 4 M σε αναλογία 4:1.

3.2.10. Μέτρηση αλδεϋδών

Η λιπιδική υπεροξειδωση είναι ένας τεκμηριωμένος μηχανισμός κυτταρικής βλάβης στα φυτά και στα ζώα και χρησιμοποιείται ως δείκτης οξειδωτικής βλάβης στα κύτταρα και στους ιστούς. Τα λιπιδικά υπεροξειδία που προέρχονται από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι ασταθή και αποσυντίθενται για να δημιουργήσουν μια πολύπλοκη σειρά συστατικών. Αυτά περιλαμβάνουν τις αντιδραστικές αλδεϋδες, από τις οποίες η πιο σημαντική είναι η MDA. Έτσι, η μέτρηση της MDA χρησιμοποιείται ευρέως ως ένας δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης (Esterbauer 1991). Αυξημένα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης έχουν συσχετιστεί με μια ποικιλία χρόνιων ασθενειών σε ανθρώπους και σε άλλα μοντέλα (De Maria 1999, Browne 1999, Vento 2000, Valerio 1998). Η MDA αντιδρά με τα αμινοξέα στις πρωτεΐνες και σε άλλα βιομόρια για να δημιουργήσει μια ποικιλία προϊόντων, συμπεριλαμβανομένου των προϊόντων που διασταυρώνονται (Berri 1988). Η MDA επίσης δημιουργεί προθέματα στις βάσεις του DNA που είναι μεταλλαξιγόνες (Mao 1999, Marnett 1999A) και πιθανός καρκινογενείς. Οι σταυροσυνδέσεις με το DNA είναι ένα άλλο αποτέλεσμα της αντίδρασης μεταξύ DNA και MDA (Voitkun 1999). Τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης μπορούν να μετρηθούν με αρκετούς τρόπους (ιωδομετρικό, φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό, ενζυμικές μεθόδους). Για την ανίχνευση της στους ιστούς ή στα υγρά χρησιμοποιούνται ανοσοιστοχημικές τεχνικές με πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα και ανοσοχημικές μέθοδοι (Ushida 2003).

Μια κοινά χρησιμοποιούμενη μέθοδος της MDA είναι η μη-ειδική TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) μέθοδος. Υπάρχει και η DETBARS (1,3-diethyl-1-2-thiobarbituric acid reactive substances). Η DETBARS μέθοδος είναι πιο ευαίσθητη και αξιόπιστη, αλλά καμία από τις 2 μεθόδους δεν αποκάλυψε διαφορά μεταξύ ασθενών και υγιών σε κάποιες μελέτες (Jain 2002), ενώ σε άλλες (De Maria 1996) έχει βρεθεί σημαντική αύξηση της MDA σε ασθενείς με ηπατίτιδα C. Η TBAR μέθοδος ανιχνεύει κάθε δραστικό συστατικό θειοβαρβιτορικού οξέος όπως η MDA. Η MDA είναι ένα από τα αρκετά χαμηλού μοριακού βάρους τελικά προϊόντα που δημιουργούνται κατά την αποσύνθεση των οξειδωμένων λιπιδίων. Σε χαμηλό pH και αυξημένη θερμοκρασία, η MDA συμμετέχει σε αντιδράσεις πυρηνόφιλης προσθήκης με το 2-θειοβαρβιτορικό οξύ δημιουργώντας ένα κόκκινο και ένα φθορίζον χρωμογόνο σε αναλογία 1:2, που απορροφούν στα

532 nm και στα 553 nm αντίστοιχα. Το TBARS test δουλεύει πολύ καλά όταν εφαρμόζεται σε περιορισμένα συστήματα όπως τα λιποσωμάτια και τα μικροσωμάτια, αλλά η εφαρμογή τους στα σωματικά υγρά και σε δείγματα ιστών είναι μη-αξιόπιστη (Frankel 1991, Gutteridge 1986A). Αυτό γιατί:

1. Μόνο συγκεκριμένα προϊόντα υπεροξειδίων των λιπιδίων παράγουν MDA (σε χαμηλές ποσότητες) και η MDA δεν είναι το μοναδικό τελικό προϊόν των υπεροξειδωμένων λιπιδίων. Παράγονται και πολλές άλλες διαφορετικές αλδεΐδες, ως τελικά προϊόντα εκτός από την MDA και αυτές δημιουργούν χρωμογόνα με απορόφηση στα 532 nm (Kosugi 1987).

2. Το TBA test σπάνια μετρά την ελεύθερη MDA των οξειδωμένων λιπιδίων. Πιο συχνά μετρά την MDA που δημιουργείται από την αποσύνθεση των λιπιδικών υπεροξειδίων κατά το στάδιο θέρμανσης και οξίνισης του TBA test.

3. Αρκετά άλλα μη-λιπιδικά συστατικά όπως γλυκόζη, αμινοξέα είναι δραστικά με το TBA. Αυτό μπορεί να ξεπεραστεί, χρησιμοποιώντας HPLC για να διαχωριστούν αυτά τα συστατικά πριν τη θέρμανση και την οξίνιση. Οι δυσμενείς συνθήκες όμως αυτού του σταδίου παραμένουν.

4. Εφαρμογή της μεθόδου GC/MS για τη μέτρηση της MDA έχει δείξει ότι η κοινά χρησιμοποιούμενη TBARS μέθοδος υπερεκτιμά κατά 10 φορές περισσότερο τα πραγματικά επίπεδα της MDA. Αυτό προφανώς συμβαίνει λόγω το ότι το TBA είναι δραστικό και με άλλες αλδεΐδες και ότι παράγεται επιπλέον MDA κατά το στάδιο θέρμανσης και οξίνισης. Τόσο οι αλδεΐδες όσο και τα λιπιδικά υπεροξειδία επηρεάζονται από την τροφή, αφού απορροφούνται από τη δίαιτα και εκκρίνονται στα ούρα (Richelle 1999).

Οι ολικές υδροξυαλκενάλες και η MDA μετρήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο του Gerard-Monnier. Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση του χρωμογόνου αντιδραστήριου N-μεθυλική-2-φαινυλοινδόλη (R1, NMPI) με τη MDA στους 45°C. Ένα μόριο της MDA αντιδρά με 2 μόρια NMPI για να δημιουργήσει μια σταθερή χρωστική καρβοκυανίνης. Αυτή η χρωστική έχει μέγιστη απορρόφηση στα 586 nm. Η μέθοδος είναι ειδική για την MDA, επειδή οι 4-υδροξυαλκενάλες δεν παράγουν ένα συγκεκριμένο χρώμα στα 586nm στις συνθήκες της μεθόδου. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε υδροχλωρικό οξύ και υπό την προσθήκη προβουκόλης (αντιοξειδωτικό) για να μειωθεί η αντίδραση με τις 4-υδροξυαλκενάλες. Κάτω υπό αυτές τις συνθήκες υπάρχει λίγη

απορρόφηση στα 586nm για την 4-HNE, την πιο κοινή 4-υδροξυαλκενάλη που παράγεται στα κύτταρα που υπόκεινται στη λιπιδική υπεροξειδωση. Στη μέθοδο προετοιμάζεται μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας την MDA ως πρότυπο. Η συγκέντρωση στο άγνωστο δείγμα προσδιορίζεται από την απορρόφηση ενός αγνώστου δείγματος στα 586 nm. Η μέθοδος προσφέρει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να αναλυθεί ταυτόχρονα η MDA με τη 4-HNE, με αντικατάσταση του υδροχλωρικού οξέος με μεθανοσουλφονικό οξύ (Gerard-Monnier 1998).

Παρασκευή διαλυμάτων

Αντιδραστήριο R1 (Διάλυμα ενεργοποιημένης ινδόλης).

Προσθήκη 6 mL 32 μM FeCl_3 σε 18 mL 10 mM 1-μεθυλικής-2-φαινυλοινδόλης. Ο FeCl_3 και η 1-μεθυλική-2-φαινυλοινδόλη είναι διαλυμένα σε ακετονιτρίλιο. Αυτό το διάλυμα είναι σταθερό για 2 ημέρες στους 4°C.

Αντιδραστήριο R2.

Διάλυμα πυκνού HCl 37% (v/v). Είναι έτοιμο προς χρήση.

Αντιδραστήριο R3.

Διάλυμα 15,4 M μεθανοσουλφονικό οξύ. Είναι έτοιμο προς χρήση.

Πρότυπα διαλύματα.

Ως πρότυπο παρέχεται το τετραμεθοξυτροπάνιο (TMOP), επειδή η MDA δεν είναι σταθερή. Το TMOP υδρολύεται κατά το βήμα της επώασης στους 45°C το οποίο θα δημιουργήσει την MDA. Το πρότυπο παρέχεται ως 10mM πρότυπο διάλυμα. Λίγο πριν τη χρήση αραιώθηκε το πρότυπο 1/500 (v/v) σε νερό για να δώσει το 20 μM πρότυπο διάλυμα. Το τελευταίο τοποθετήθηκε στους 0-4°C μέχρι τη χρήση. Για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης αναμείχθηκαν οι παρακάτω όγκοι νερού και πρότυπων διαλυμάτων (Πίνακας 38).

Πίνακας 38: Κατασκευή πρότυπης καμπύλης.

Διαλύματα/Σωλήνες	1	2	3	4	5	6
Όγκος προτύπου (20 μM) (μl)	0	25	50	100	150	200
Όγκος νερού (μl)	200	175	150	100	50	0
Τελική συγκέντρωση (μM)	0	0,5	1	2	3	4

Κατεργασία Δείγματος

Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C . Τα δείγματα δεν πρέπει να ξαναψύχονται όταν αποψυχθούν και πρέπει να προστατεύονται από το φως, για να αποφευχθεί η φωτοοξειδωση. Συστήνεται η προσθήκη βουτυλιωμένου υδροξυτολουένιου (BHT) σε τελική συγκέντρωση 5mM. Το BHT παρέχεται ως 500mM διάλυμα σε ακετονιτρίλιο. Εάν κανένα αντιοξειδωτικό δεν προστίθεται, καινούργια λιπιδική υπεροξειδωση μπορεί να γίνει κατά τη κατεργασία του δείγματος, καταλήγοντας έτσι σε λανθασμένες τιμές.

Η μέθοδος σχεδιάστηκε για να μετρήσει την ελεύθερη MDA. Η συγκέντρωση όμως της ελεύθερης MDA στο πλάσμα είναι κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου και αντιστοιχεί στο 20% της ολικής MDA. Για αυτό μετράται η ολική MDA. Η συνδεδεμένη MDA, που αναπαριστά πάνω από το 80% στο πλάσμα μπορεί να υδρολυθεί στην παρουσία του BHT, σε pH 1-2 στους 60°C για 80 λεπτά. Η υδρόλυση παράγει αξιοσημείωτη μείωση σε pH λιγότερο από 1 και pH μεγαλύτερο του 2. Επειδή η MDA έχει μια ημίσεια ζωή σε θερμοκρασία δωματίου γύρω στις 2 ώρες, τα δείγματα πρέπει να κρατηθούν κρύα και να αναλύονται όσο πιο γρήγορα γίνεται μετά την υδρόλυση.

Μέθοδος μέτρησης 4-HNE και MDA

1. Προσθήκη 10 μL BHT 5mM σε κάθε σωλήνα.
2. Προσθήκη 200 μL ορού ή προτύπου.
3. Προσθήκη 5,3 μl συμπυκνωμένου HCl σε κάθε σωλήνα, κάλυψη σωλήνα και καλή ανάμιξη. Επώαση στους 60°C για 80 λεπτά.
3. Πάγωμα σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη 680 μl αντιδραστηρίου R1.
4. Καλή ανάμιξη και φυγοκέντρηση στις 13.000 g για 5 λεπτά.
5. Μεταφορά 660 μl υπερκείμενου σε νέο σωλήνα.
6. Προσθήκη αντιδραστηρίου R3.
7. Επώαση στους 45°C για 60 λεπτά.
8. Φυγοκέντρηση των αιωρούμενων σωματιδίων (π.χ. 10.000 στροφές για 10 λεπτά) για να παρθεί καθαρό υπερκείμενο.
9. Μεταφορά του καθαρού υπερκείμενου σε κυψελίδα.

10.Μέτρηση στα 586 nm.*

*Το χρώμα είναι σταθερό για το ελάχιστο 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Υπολογισμός Συγκέντρωσης

Η συγκέντρωση υπολογίζεται από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης $y=ax+b$ (Παράρτημα II).

Όπου $y=A_{586}$, $x=[MDA]$, $[MDA]$ = Η συγκέντρωση της MDA στο δείγμα*df

A_{586} = Απορρόφηση στα 586 nm του δείγματος

df = Παράγοντας αραιώσης

Χαρακτηριστικά Μεθόδου

Γραμμικότητα

Η απορρόφηση στα 586 nm είναι γραμμική σε εύρος 0,5-20 μ M. Κατάλληλα αποθηκευμένα και ακριβώς διαλυμένα πρότυπα πρέπει να έχουν παράγοντα μεταβλητότητας 10%.

Ακρίβεια

Η ακρίβεια της μεθόδου υπολογίστηκε με μέτρηση της MDA στο ρυθμιστικό διάλυμα κάθε ημέρα για 10 ημέρες. Τα αποτελέσματα ακρίβειας δίνονται σε μ M στον παρακάτω Πίνακα 39:

Πίνακας 39: Ακρίβεια μεθόδου.

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΧΑΜΗΛΗ	ΜΕΣΗ	ΥΨΗΛΗ
Ημέρες	10	10	10
Μέσος όρος	1,1	2	4,8
Τυπική απόκλιση	0,04	0,02	0,08
Παράγοντας μεταβλητότητας (%)	3,4	1,2	1,6

Ευαισθησία

Το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης προσδιορίζεται ως 5.2 της τυπικής απόκλισης ($v=10$) από το τυφλό σε απορρόφηση στα 586 nm.

Αναστολείς αντίδρασης.

➤ Ανάγοντα σάκχαρα: Σουκρόζη η φρουκτόζη, σε συγκεντρώσεις 50mM ή μεγαλύτερες στο δείγμα μπορούν να προκαλέσουν υψηλή μεταβλητότητα στην αντίδραση.

- Αντιοξειδωτικά: Γλουταθειόνη (200 μM), ασκορβικό οξύ (100 μM), προβουκόλη (1 mM) και το BHT δεν παρεμβαίνουν.
- Άλλα: Υπεροξειδίο του υδρογόνου στα 50 μM μειώνει την MDA κατά 13%.

Απόδοση μεθόδου.

1. *Οξειδωση δείγματος*: Η κινητική της ανάπτυξης χρώματος στο δείγμα μπορεί να ακολουθηθεί σε σύγκριση με το TMOP που παρέχεται με το σετ αντιδραστηρίων. Η A_{586} από το δείγμα μπορεί να φτάσει σε ένα πλατό και μετά να παραμείνει σταθερή. Η συνεχόμενη αύξηση στα 586 nm δείχνει δραστικότητα που δεν προέρχεται από την MDA ή οξειδωση που υπάρχει στο μέσο της αντίδρασης. Αυτό, μπορεί να είναι λόγω της χαμηλής υδρόλυσης της πρωτεϊνοσυνδεδεμένης MDA.

2. *Θολερότητα*: Παίρνεται το φάσμα των καθαρισμένων δειγμάτων στα 400 με 700 nm. Το μέσο της αντίδρασης μπορεί να συγκριθεί με αυτό που παρέχεται από το πρότυπο της TMOP. Η έλλειψη κορυφής στα 586 nm ή μια συνεχόμενη αύξηση στη βασική γραμμή μπορεί να προτείνει παρεμποδιστές ή μη ειδική δραστικότητα στο δείγμα.

3. *Δείγμα τυφλού*: Τα θολερά δείγματα μπορούν να δώσουν ακραίες τιμές καταλήγοντας σε μια συνεισφορά στην απορρόφηση στα 586 nm από το φως που διασκορπίζεται. Εάν το μέσο της αντίδρασης δεν καθαρίζει με τη φυγοκέντρηση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα ατομικό δείγμα τυφλού. Το τυφλό γίνεται με αντικατάσταση των 650 μL του αντιδραστηρίου R1 με διάλυμα 75% ακετονιτρίλιο και 25% μεθανόλη.

3.2.11. Μέτρηση των ισοπροστανίων

Τα ισοπροστανία ανήκουν στην οικογένεια των παραγώγων της προσταγλανδίνης. Δημιουργούνται *in vivo* από τη μη-ενζυμική οξειδωση του αραχιδονικού οξέος από τις ελεύθερες ρίζες. Ένα από τα κυριότερα ισοπροστανία, το 8-iso-PGF_{2a} (ανήκει στην οικογένεια των F₂-ισοπροστανίων), είναι χημικά σταθερό και μπορεί να ανιχνευθεί στο πλάσμα και στα ούρα. Τα F₂-ισοπροστανία έχουν αρκετές ιδιότητες, που τα καθιστούν αξιόπιστους δείκτες του οξειδωτικού στρες *in vivo*.

Τα F₂-ισοπροστανία έχει προταθεί από αρκετούς να είναι ο πιο αξιόπιστος δείκτης για την *in vivo* δημιουργία των ελευθέρων ριζών και τη λιπιδική υπεροξειδωση (Roberts 2000). Τα επίπεδα

τους δεν επηρεάζονται από την περιεκτικότητα της τροφής σε λιπίδια (Richelle 1999). Είναι σταθερά συστατικά και βρίσκονται σε ανιχνεύσιμες ποσότητες σε όλους τους βιολογικούς ιστούς (με τη μορφή εστέρων) και στα υγρά (σε ελεύθερη μορφή). Έτσι, μικρές αυξήσεις στη δημιουργία τους μπορούν να ανιχνευθούν σε περιπτώσεις ήπιου οξειδωτικού στρες. Η δημιουργία τους αυξάνεται δραματικά σε ζωικά μοντέλα οξειδωτικής βλάβης (Morrow 1990). Σε πείραμα όπου χορηγήθηκε σε ποντίκια CCL₄ (που επάγει μια οξεία οξειδωτική βλάβη στο ήπαρ), η αύξηση του F₂-ισοπροστανίου ήταν πιο δραματική (80 φορές) σε σχέση με την MDA που αυξήθηκε μόνο κατά 3 φορές (Roberts 2000).

Η μέτρηση των ελεύθερων ισοπροστανίων στο πλάσμα ή στα ούρα εκτιμά τη συνολική ενδογενή παραγωγή ισοπροστανίων. Ενώ η μέτρηση των εστεροποιημένων εκτιμά την έκταση του βαθμού της λιπιδικής υπεροξειδωσης στον ιστό που μας ενδιαφέρει. Τα F₂-ισοπροστανία είναι προτιμότερο να μετρώνται στα ούρα, από ότι στο πλάσμα γιατί στο πλάσμα απομακρύνονται γρήγορα από την κυκλοφορία και έτσι η μέτρηση τους αντικατοπτρίζει οξεία μορφή οξειδωτικού στρες και όχι χρόνιο στρες. Επιπλέον, τεχνητή δημιουργία της 8-επί-PGF_{2α} μπορεί να συμβεί κατά τη μεταχείριση του δείγματος και η παρατεταμένη αποθήκευση οδηγεί σε ψευδή αποτελέσματα (Morrow 1990). Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις στα ούρα παρέχουν ένα πιο αξιόπιστο δείκτη της χρόνιας μη-ενζυμικής λιπιδικής υπεροξειδωσης (Morrow 1996, Morrow 1997, Nourooz-Zadeh 2005, Roberts 2000).

Αρκετές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για μέτρηση των ισοπροστανίων. Αυτές είναι 1) ραδιοανοσολογικές ή ανοσοενζυμικές μέθοδοι (RIA, ELISA), 2) αέρια και υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφο μάζας, ηλεκτροχημικό ανιχνευτή και ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού.

Οι βασιζόμενες στη φασματοσκοπία μαζών (MS) είναι οι καλύτερες. Αυτές οι μέθοδοι απαιτούν αρχικά καθαρισμό των ούρων για απομόνωση των συστατικών τους, πριν την ποσοτικοποίηση τους. Λόγω έλλειψης εξοπλισμού MS/MS τα ισοπροστανία μετρήθηκαν με Elisa που είναι εξίσου μια αξιόπιστη μέθοδος. Οι συγκεντρώσεις του 15-ισοπροστανίου F_{2t} σε αρκετά δείγματα ούρων προσδιορίστηκαν με ανοσοενζυμικές μεθόδους και με GC/MS ακολουθούμενη από εκχύλιση στερεάς φάσης των δειγμάτων. Ο παράγοντας συσχέτισης r^2 βρέθηκε

ικανοποιητικός ($r > 0,8$). Συνεπώς η Elisa είναι μια αξιόπιστη μέθοδος μέτρησης των ισοπροστανίων. Μετρήθηκε το 15-ισοπροστανίο F2t (γνωστό επίσης ως 8-επί-PGF_{2a} ή 8-ισό-PGF_{2a}) με ανταγωνιστική ανοσοενζυμική μέθοδο.

Παρασκευή διαλυμάτων

Το κιτ περιέχει πλακίδιο εργασίας Elisa που είναι καλυμμένα με το ειδικό αντίσωμα του 15-ισοπροστανίου F2t. Τα περιεχόμενα του κιτ αποθηκεύθηκαν στους 4°C. Λίγο πριν τη χρήση τους τα αντιδραστήρια μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία 18-25 °C. Τα αντιδραστήρια του κιτ ήταν τα παρακάτω:

Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 40 ml.

Τα 40 ml ρυθμιστικού διαλύματος διαλύονται σε 200 ml απιονισμένο νερό.

Ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης 100 ml.

Έτοιμο προς χρήση.

15-ισοπροστανίου F2t πρότυπο.

2 φιαλίδια 60 ml συγκέντρωσης 1 µg/ml .

15-ισοπροστανίου F2t συζευγμένο με την υπεροξειδάση του horsedise (240 µl).

Για απόδοση της συνολικής μεθόδου, τα 240 µl συμπλέγματος προστίθενται σε 11,8 ml ρυθμιστικού διαλύματος ενίσχυσης.

Διάλυμα τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB) (25 ml).

Έτοιμο προς χρήση.

Διάλυμα θειικού οξέος 3M (25 ml).

Έτοιμο προς χρήση.

Κατεργασία δείγματος ισοπροστανίων

Στα ούρα μετά τη συλλογή τους προστέθηκε 50 µl 0,005% BHT και αποθηκεύθηκαν αμέσως στους -20°C. Τα επίπεδα τους δεν εξαρτώνται από την ώρα της συλλογής και από το εάν είναι ούρα 24ώρου ή όχι (Helmersson 1999). Τα ούρα αποψύχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 2.500 g για 5 λεπτά. Στη συνέχεια αραιώθηκαν 4 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης.

Κατασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Για τη κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναμείχθηκαν οι παρακάτω όγκοι προτύπου και ρυθμιστικού διαλύματος ενίσχυσης (Πίνακας 40).

Πίνακας 40: Κατασκευή πρότυπης καμπύλης.

ΠΡΟΤΥΠΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ισοπροστανίου (ngr/ml)	Ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης (μl)	Όγκος που μεταφέρεται (μl)	Πηγή από όπου μεταφέρεται	Τελικός Όγκος (μl)
S7	100	450	50	stock	300
S6	50	200	200	S7	300
S5	10	400	100	S6	300
S4	5	200	200	S5	300
S3	1	400	100	S4	400
S2	0,1	900	100	S3	500
S1	0,05	500	500	S2	1000
B0	0	300	-----	----	300

Μέθοδος ανάλυσης ισοπροστανίων

1. Προσθήκη 100 μl προτύπου ή αραιωμένων ούρων σε κάθε φρεάτιο.
2. Προσθήκη 100 μl διαλυμένου 15-ισοπροστανίου F2t συζευγμένου με την υπεροξειδάση.
3. Πλύση 3 φορές με 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος.
4. Προσθήκη 200 μl TMB υποστρώματος σε κάθε φρεάτιο.
5. Επώαση για 20-40 λεπτά μέχρι να παρατηρηθεί μπλε χρώμα.
6. Προσθήκη 50μl θειικού οξέος 3M σε κάθε φρεάτιο για να σταματήσει η αντίδραση. Το χρώμα θα αλλάξει από μπλε σε κίτρινο.
7. Μέτρηση του πλακιδίου εργασίας στα 450nm. Το πλακίδιο εργασίας μπορεί εναλλακτικά να μετρηθεί στα 650 nm στην απουσία της προσθήκης του θειικού οξέος 3M.

Υπολογισμός Συγκέντρωσης

Αφαιρείται η απορρόφηση του τυφλού από τις απορροφήσεις των δειγμάτων. Διαιρείται η τιμή της απορρόφησης που αντιστοιχεί στο B₀ δείγμα (Πίνακας 40) και πολλαπλασιάζετε επί 100 για να παρθούν οι %B₀ τιμές. Κατασκευάζετε το διάγραμμα των τιμών %B₀ (άξονας ψ) ως προς τη συγκέντρωση του προτύπου (κατασκευή πρότυπης καμπύλης) (Παράρτημα II). Η συγκέντρωση των ισοπροστανίων υπολογίστηκε από το διάγραμμα της πρότυπης καμπύλης. Στη

συνέχεια εκφράστηκε ως ng/mg κρεατινίνης, διαιρώντας τη συγκέντρωση των ισοπροστανίων (ng/ml) με τη συγκέντρωση της κρεατίνης του κάθε δείγματος (mg/dl). Η κρεατίνη του κάθε δείγματος υπολογίστηκε βασιζόμενη σε μια μέθοδο όπου η κρεατίνη αντιδρά με πικρικό οξύ σε αλκαλικό περιβάλλον, σχηματίζοντας ένα χρωμογόνο σύμπλοκο. Η αύξηση της απορρόφησης που οφείλεται στο σχηματισμό του συμπλόκου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της κρεατινίνης στο δείγμα. Μετά την αρχική φάση επώασης (1 λεπτό), η πορεία της αντίδρασης είναι σταθερή για 2 λεπτά. Το φιαλίδιο εργασίας αποτελούταν από υδροξειδίου του νατρίου 0,16 M και από διάλυμα πικρικού οξέος 4 M σε αναλογία 4:1.

3.3. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεικτών οξειδωτικού στρες απαιτεί πρώτα να είναι γνωστά ορισμένα χαρακτηριστικά της κατανομής των συχνοτήτων των προς ανάλυση μεταβλητών. Η κάθε κατανομή συχνοτήτων χαρακτηρίζεται από κάποιες παραμέτρους. Αυτές είναι οι παράμετροι κεντρικής τάσης (αριθμητικός μέσος, διάμεσος τιμή, επικρατούσα τιμή κ.τ.λ), οι παράμετροι διασποράς (η μέση τυπική απόκλιση, η διακύμανση, η τυπική απόκλιση, ο συντελεστής μεταβλητότητας, η ασυμμετρία και η κύρτωση), οι παράμετροι ασυμμετρίας και οι παράμετροι κύρτωσης (Τριχόπουλος 2001).

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθορίζουν και το είδος της κατανομής (κανονική ή μη). Οι μεταβλητές που αναλύθηκαν ακολουθούν υπερβολική καμπύλη και είναι φραγμένες προς το ένα άκρο. Οι κατανομές αυτές παρουσιάζουν μεγάλη απόκλιση από τη κανονική κατανομή. Για αυτό ως τιμές της μεταβλητής θεωρούνται οι τιμές των λογαρίθμων της μεταβλητής, των οποίων η κατανομή συχνοτήτων συχνά ακολουθεί τη λογαριθμοκανονική κατανομή. Οι λογάριθμοι των μεταβλητών ελέγχθηκαν για το αν ακολουθούν κανονική κατανομή με το κριτήριο d'Agostino και με τους ελέγχους καλής προσαρμογής (έλεγχος Kolomogorov-Smirnoff και χ^2 έλεγχος). Οι προς εξέταση παράμετροι που ακολουθούν κανονική κατανομή αναλύθηκαν με τον παραμετρικό έλεγχο ANOVA, F-έλεγχος. Ο έλεγχος αυτός είναι μια μονοπαραγοντική ανάλυση διακυμάνσεων με τη βοήθεια της οποίας ελέγχεται η ισότητα, των μέσων τιμών k δειγμάτων ($k \geq 2$) επί του συνόλου

τους. Η μέθοδος μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι μια φυσική επέκταση της μεθόδου σύγκρισης δυο μέσων τιμών.

Οι προς εξέταση παράμετροι που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή ελέγχθηκαν με τις μη παραμετρικές δοκιμασίες Kruskal-Wallis και Mann-Whitney. Η συγκεκριμένη μη παραμετρική ανάλυση μπορεί να εφαρμοσθεί και στην περίπτωση που τα δείγματα δεν είναι του ίδιου μεγέθους καθώς και στην περίπτωση που οι διακυμάνσεις των πληθυσμών είναι ανομοιογενείς.

Οι δείκτες που ακολουθούν κανονική κατανομή μετά από λογαρίθμηση, αναλύθηκαν με παραμετρικούς ελέγχους (ANOVA, t-test). Λόγω όμως του ότι οι αρχικές τιμές δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, τα αρχικά δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, ακόμη και μετά από λογαρίθμηση, παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος και αναλύθηκαν με τους μη παραμετρικούς ελέγχους (Mann Whitney, Kruskal Wallis). Οι τιμές όλων των δεικτών αναπαρίστανται με διαγράμματα τύπου "Box plot" ή διάγραμμα Whisker. Το διάγραμμα αυτό απεικονίζει τη διάμεσο τιμή, την ελάχιστη και τη μέγιστη τιμή, το πρώτο και το τρίτο τεταρτημόριο καθώς και το αν η κατανομή είναι θετικά ή αρνητικά λοξή (Rao 2007). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα StatView έκδοση 5.0.1, 1992-1998.

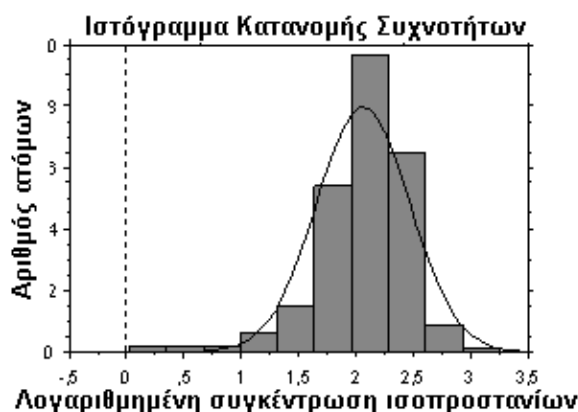
IV ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελετήθηκαν 7 δείκτες οξειδωτικής βλάβης (6 προϊόντα οξειδωτικής βλάβης και ένας ένζυμο που παράγει οξυγονούχες δραστικές ενώσεις). Τα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης ήταν τα ισοπροστανία, η MDA και η 4-HNE (προϊόντα οξειδωτικής βλάβης λιπιδίων), τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και η 3-νιτροτυροσίνη (προϊόντα οξειδωτικής βλάβης πρωτεϊνών), η 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνη (προϊόν οξειδωτικής βλάβης DNA), η οξειδωμένη γλουταθειόνη (δείκτης οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου) και η MPO. Όσον αφορά την αντιοξειδωτική άμυνα μελετήθηκαν 4 αντιοξειδωτικά ένζυμα (καταλάση, υπεροξειδική δισμουτάση, υπεροξειδάση και αναγωγή της γλουταθειόνης) και ένας αντιοξειδωτικός παράγοντας (ανηγμένη γλουταθειόνη). Η μελέτη των παραπάνω δεικτών έγινε στους ασθενείς με τα παρακάτω χρόνια νοσήματα του ήπατος (αυτοάνοση ηπατίτιδα, αυτοάνοσα χολοστατικά, πρωτοπαθής χολική κίρρωση, ηπατίτιδα Β, ηπατίτιδα C, αλκοολική ηπατοπάθεια, μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα) και σε μια ομάδα υγιών εθελοντών (μάρτυρες). Αρχικά έγιναν συγκρίσεις στο γενικό πληθυσμό των ασθενών για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες ανάμεσα στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στη συνέχεια αναλύθηκαν όλοι οι δείκτες οξειδωτικού στρες σε κάθε ασθένεια ξεχωριστά.

1. Επίπεδα προϊόντων οξειδωτικής βλάβης στα νοσήματα του ήπατος και στους μάρτυρες.

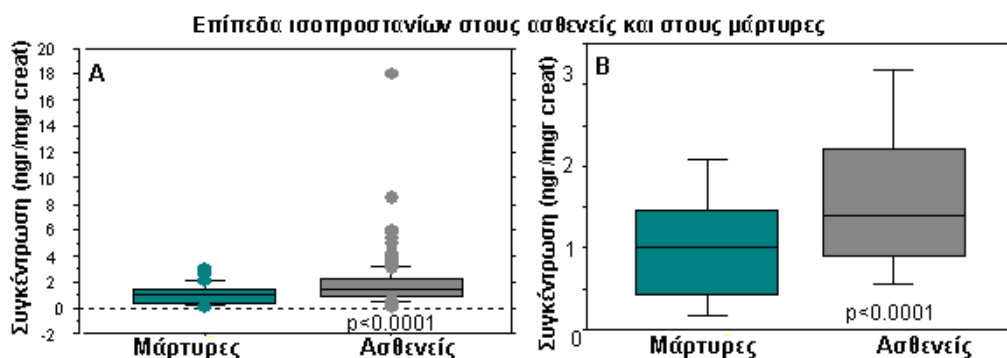
1.1. Επίπεδα ισοπροστανίων στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες.

Η κανονικότητα της κατανομής ελέγχθηκε με το τεστ Kolmogorov-Smirnov. Με λογαριθμοκανονική μετατροπή των δεδομένων απορρίφθηκε η κανονικότητα της καμπύλης σε στάθμη σημαντικότητας $p < 0.0001$ (Ιστόγραμμα 1). Η στατιστική ανάλυση έγινε με το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis.



Ιστόγραμμα 1: Κατανομή συχνοτήτων (άξονας ψ) της λογαριθμημένης μεταβλητής των ισοπροστανίων (άξονας χ).

Οι μάρτυρες είχαν τα μικρότερα επίπεδα ισοπροστανίων και διέφεραν σημαντικά από το σύνολο των ασθενών (Διάγραμμα 13).



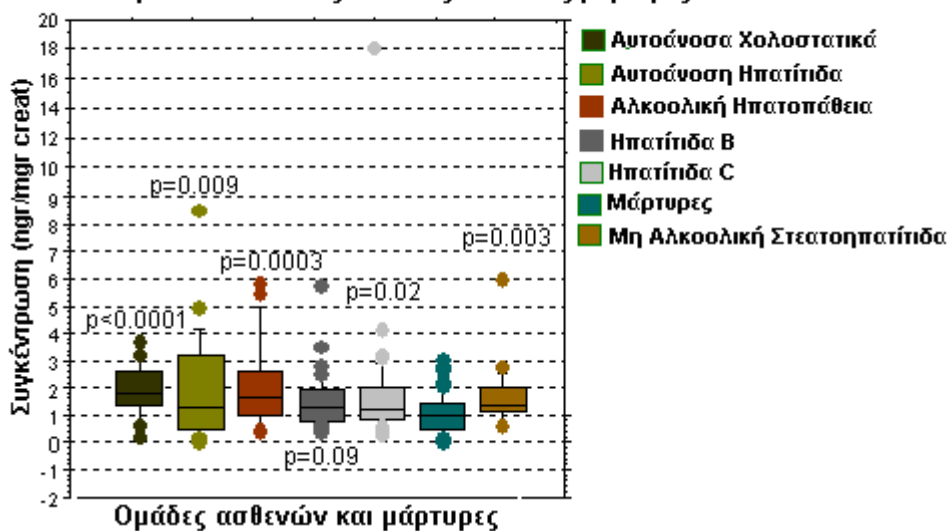
Διάγραμμα 13: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα των ισοπροστανίων στο σύνολο των ασθενών και στους μάρτυρες. A) Οι ασθενείς (n=235) διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες (n=75) [1(0,02-3) vs 1,4(0,01-18)], $p < 0.0001$. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση των ασθενών με τους μάρτυρες. B) Ο κύριος όγκος των τιμών έχει εύρος (0,2-2,1) για τους μάρτυρες και (0,5-3) για τους ασθενείς.

Αναλυτικότερα, τα υψηλότερα επίπεδα ισοπροστανίων ανιχνεύθηκαν σε αυτούς με αυτοάνοσα χολοστατικά. Χαμηλότερα επίπεδα είχαν οι ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια, οι ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, οι ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα, οι ασθενείς με ηπατίτιδα C και οι ασθενείς με ηπατίτιδα B με φθίνουσα σειρά (Διάγραμμα 14, Πίνακας 40). Οι ασθενείς με ιογενή ηπατίτιδα δεν διέφεραν σημαντικά από τους ασθενείς που είχαν μη ιογενές ηπατικό νόσημα.

Πίνακας 40: Επίπεδα ισοπροστανίων στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Η τιμή p υπολογίστηκε με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney και αναφέρεται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Κατηγορίες ασθενών και μαρτύρων	Αριθμός ατόμων (n=310)	Διάμεσος (εύρος)	Τιμή p
Μάρτυρες	n=75	1(0,02-3)	
Αυτοάνοσα χολοστατικά	n=49	1,8(0,18-3,7)	p<0.0001
Αλκοολική ηπατοπάθεια	n=29	1,7(0,38-5,8)	p=0.0003
Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα	n=25	1,4 (0,5-6)	p=0.003
Ηπατίτιδα C	n=47	1,2 (0,2-18)	p=0.02
Αυτοάνοση ηπατίτιδα	n=36	1,3(0,01-8,5)	p=0.009
Ηπατίτιδα B	n=49	1,2(0,4-5,8)	p=0.09

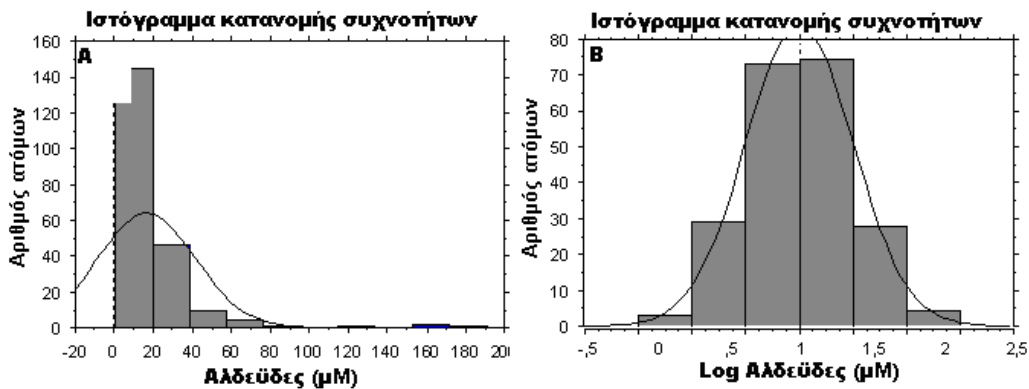
Επίπεδα ισοπροστανίων στους ασθενείς και στους μάρτυρες



Διάγραμμα 14: Διάγραμμα «Whisker ή box»: Επίπεδα ισοπροστανίων στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.

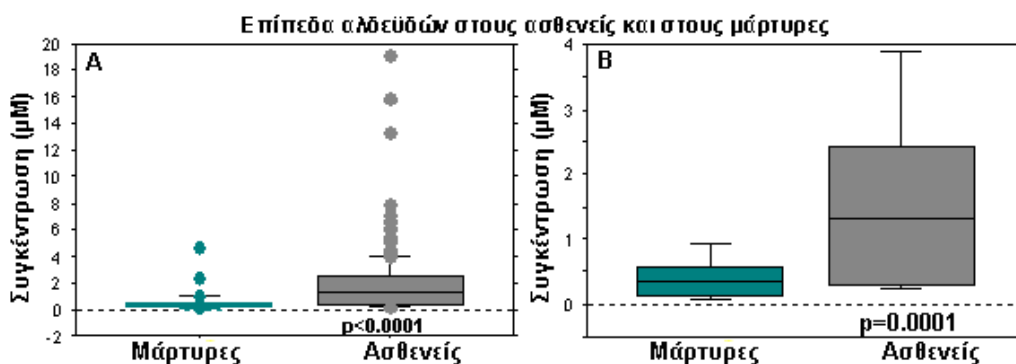
1.2. Επίπεδα αλδεϋδών στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες.

Η κανονικότητα της κατανομής ελέγχθηκε με το τεστ Kolmogorov-Smirnov (Ιστόγραμμα 2). Με λογαριθμοκανονική μετατροπή των δεδομένων έγινε αποδεκτή η κανονικότητα της καμπύλης σε στάθμη σημαντικότητας $p=0.003$. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τον παραμετρικό έλεγχο ANOVA.



Ιστόγραμμα 2: Κατανομή συχνότητων (άξονας ψ) της μεταβλητής των αλδεϋδών (A) και της λογαριθμημένης μεταβλητής των αλδεϋδών (B).

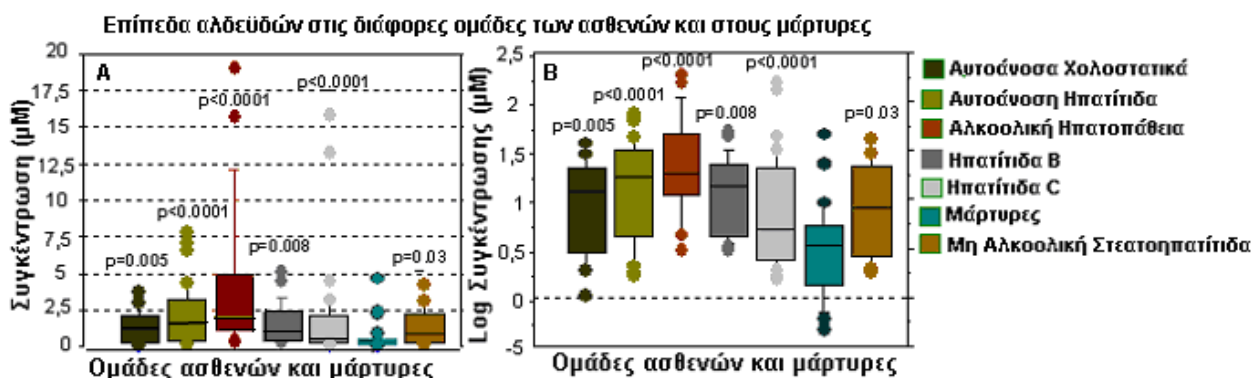
Οι μάρτυρες είχαν τα χαμηλότερα επίπεδα αλδεϋδών σε σχέση με το σύνολο των ασθενών ($p<0.0001$) (Διάγραμμα 15). Όλες οι ομάδες των ασθενών διέφεραν σημαντικά από τους μάρτυρες (Διάγραμμα 16).



Διάγραμμα 15: Διάγραμμα «Whisker ή box»: Επίπεδα αλδεϋδών στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. A) Οι ασθενείς ($n=235$) διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες ($n=75$) [13(1-19) vs 0,3(0,05-4,9), $p<0.0001$]. Οι τιμές των p προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA. B) Το ίδιο διάγραμμα με το A με τη διαφορά ότι είχαν αφαιρεθεί οι τιμές που απείχαν αρκετά από τον κύριο όγκο των τιμών.

Αναλυτικότερα, τα υψηλότερα επίπεδα αλδευδών σε σχέση με τους μάρτυρες, παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια [1,9(0,3-19) vs 0,3(0,05-4,9), $p < 0.0001$]. Ακολουθούν οι ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα [1,7(0,2-7,9) vs 0,3(0,05-4,9), $p < 0.0001$], ηπατίτιδα C [0,5(0,2-16) vs 0,3(0,05-4,9), $p < 0.0001$], ηπατίτιδα B [1,4(0,3-5) vs 0,3(0,05-4,9), $p = 0.008$], αυτοάνοσα χολοστατικά [1,2(0,1-3,8) vs 0,3(0,05-4,9), $p = 0.005$] και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα [0,8(0,2-4,3) vs 0,3(0,05-4,9), $p = 0.03$].

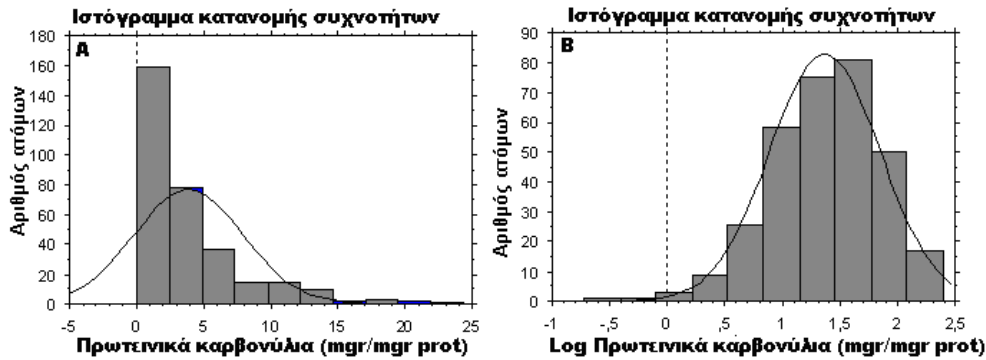
Οι ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια διέφεραν σημαντικά από τους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά [1,9(0,3-19) vs 1,2(0,1-3,8), $p = 0.002$], ηπατίτιδα C [1,9(0,3-19) vs 0,5(0,2-16), $p = 0.0002$] και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα [1,9(0,3-19) vs 0,8(0,2-4,3), $p = 0.0003$]. Οι ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα διέφεραν σημαντικά από τους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά [1,7(0,2-7,9) vs 1,2(0,1-3,8), $p = 0.02$], ηπατίτιδα C [1,7(0,2-7,9) vs 0,5(0,2-16), $p = 0.003$] και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα [1,7(0,2-7,9) vs 0,8(0,2-4,3), $p = 0.03$].



Διάγραμμα 16: Διαγράμματα «Whisker ή box»: Επίπεδα αλδευδών (Διάγρ. 16Α) και της λογαριθμημένης τιμής των αλδευδών (Διάγρ 16Β) στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Οι τιμές των p προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.

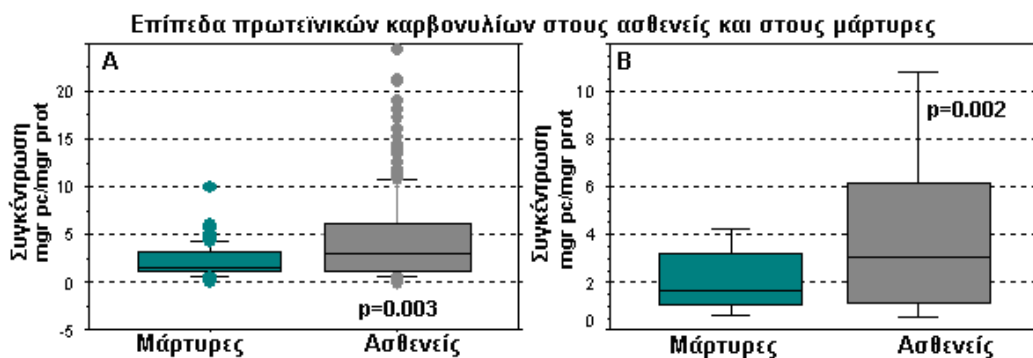
1.3.Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες.

Η κανονικότητα της κατανομής ελέγχθηκε με το τεστ Kolmogorov-Smirnov. Με λογαριθμοκανονική μετατροπή των δεδομένων έγινε αποδεκτή η κανονικότητα της καμπύλης σε στάθμη σημαντικότητας $p = 0.05$ (Ιστόγραμμα 3).

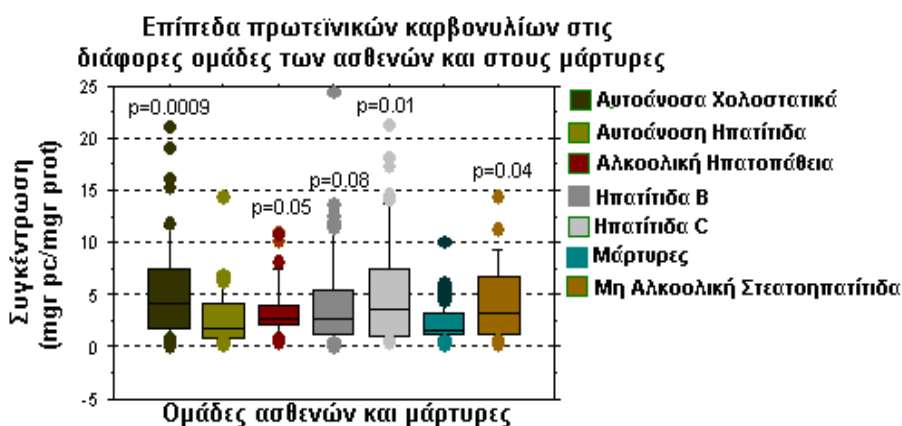


Ιστόγραμμα 3: Κατανομή συχνότητων (άξονας ψ) της μεταβλητής των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Διάγρ. Α) και της λογαριθμημένης μεταβλητής των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Διάγρ. Β).

Στους μάρτυρες τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με το σύνολο των ασθενών [1,6(0,1-9,9) vs 3,1(0,06-24), $p=0.003$] (Διάγραμμα 17). Οι περισσότερες ομάδες των ασθενών διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 18, Πίνακας 41) με εξαίρεση τους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και με ηπατίτιδα Β. Οι ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά είχαν τα υψηλότερα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων από τις υπόλοιπες ομάδες των ασθενών και διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα [4,1(0,01-21) vs 1,8(0,1-14), $p=0.001$] και τους μάρτυρες [4,1(0,01-21) vs 1,6(0,1-9,9), $p=0.0009$]. Ακολουθούν οι ασθενείς με ηπατίτιδα C που διέφεραν και αυτοί σημαντικά από τους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα [3,6(0,2-21) vs 1,8(0,1-14), $p=0.04$] και τους μάρτυρες [3,6(0,2-21) vs 1,6(0,1-9,9), $p=0.01$] (Διάγραμμα 18).



Διάγραμμα 17: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Α) Οι ασθενείς ($n=235$) διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες ($n=75$) [3,1(0,06-24) vs 1,6(0,1-9,9), $p=0.003$]. Οι τιμές των p προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA. Β) Ο κύριος όγκος των τιμών είχε εύρος (0,1-4,3) για τους μάρτυρες και (0,1-11) για τους ασθενείς.



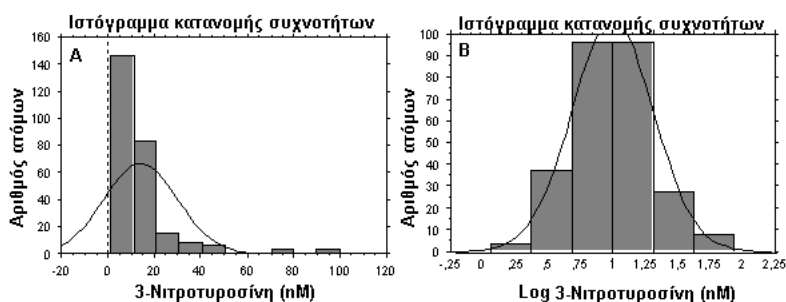
Διάγραμμα 18: Διάγραμμα «Whisker ή box»: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Οι τιμές των p προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.

Πίνακας 41: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές των p προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.

Κατηγορίες ασθενών και Μαρτύρων	Αριθμός ατόμων (n=310)	Διάμεσος τιμή (εύρος)	Τιμή p
Μάρτυρες	n=75	1,6(0,1-9,9)	
Αυτοάνοσα χολοστατικά	n=49	4,1(0,01-21)	p=0.0009
Αυτοάνοση ηπατίτιδα	n=36	1,8(0,1-14)	p=0.06
Αλκοολική ηπατοπάθεια	n=29	2,6(0,3-10,8)	p=0.05
Ηπατίτιδα Β	n=49	2,6(0,06-24)	p=0.08
Ηπατίτιδα C	n=47	3,6(0,2-21)	p=0.01
Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα	n=25	3,1(0,2-14)	p=0.04

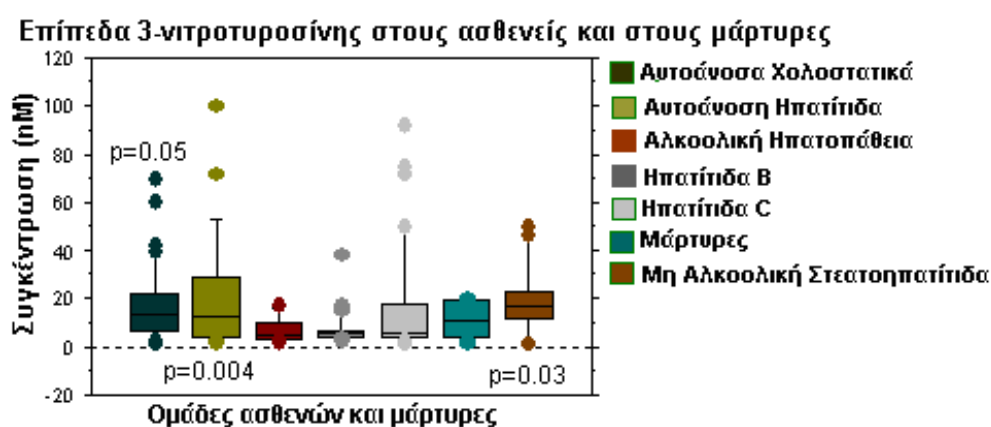
1.4. Επίπεδα 3-νιτροτυροσίνης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες.

Η κανονικότητα της κατανομής ελέγχθηκε με το τεστ Kolmogorov-Smirnov (Ιστόγραμμα 4). Με λογαριθμοκανονική μετατροπή των δεδομένων έγινε αποδεκτή η κανονικότητα της καμπύλης σε στάθμη σημαντικότητας $p=0.05$.



Ιστόγραμμα 4: Κατανομή συχνοτήτων (άξονας ψ) της μεταβλητής της 3-νιτροτυροσίνης (Διάγρ. Α) και της λογαριθμημένης μεταβλητής της 3-νιτροτυροσίνης (Διάγρ. Β).

Συγκριτικά με τους μάρτυρες, τα επίπεδα της 3-νιτροτυροσίνης παρουσίασαν σημαντική αύξηση στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα [9(1,5-20) vs 12(1,6-100), $p=0.004$], αυτοάνοσα χολοστατικά [9(1,5-20) vs 14(1,3-70), $p=0.05$] και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα [9(1,5-20) vs 17(1-50), $p=0.03$] (Διάγραμμα 19). Τα υψηλότερα επίπεδα μετρήθηκαν σε ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα. Τα χαμηλότερα επίπεδα μετρήθηκαν σε ασθενείς με ηπατίτιδα Β και με αλκοολική ηπατοπάθεια. Αυτές οι ομάδες διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, αυτοάνοση ηπατίτιδα και αυτοάνοσα χολοστατικά (Πίνακας 42).



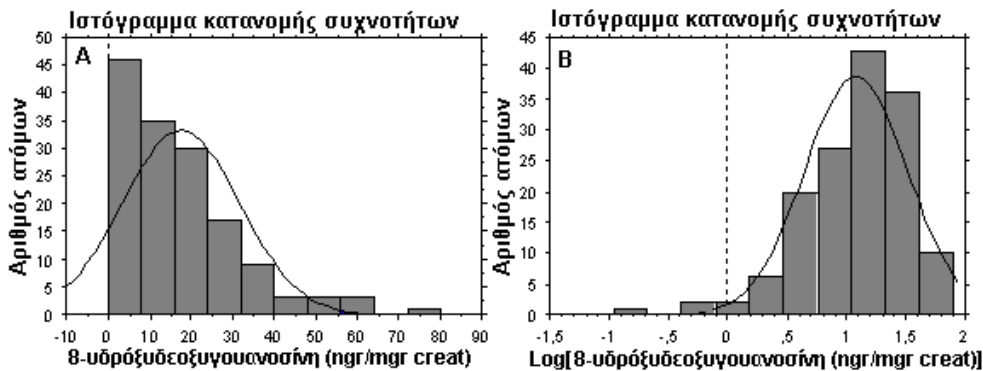
Διάγραμμα 19: Διάγραμμα «Whisker ή box»: Επίπεδα 3-νιτροτυροσίνης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Οι τιμές των p προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.

Πίνακας 42: Επίπεδα της 3-νιτροτυροσίνης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Ομάδες προς σύγκριση		Τιμή p
Αυτοάνοσα Χολοστατικά 14(1,3-70)	Αλκοολική ηπατοπάθεια 4,6(2,2-18)	0.005
Αυτοάνοσα Χολοστατικά 14(1,3-70)	Ηπατίτιδα Β 4,6(0,06-39)	0.002
Αυτοάνοση Ηπατίτιδα 12(1,6-100)	Αλκοολική Ηπατοπάθεια 4,6(2,2-18)	0.006
Αυτοάνοση Ηπατίτιδα 12(1,6-100)	Ηπατίτιδα Β 4,6(0,06-39)	0.003
Μη Αλκοολική στεατοηπατίτιδα 17(1,3-50)	Αλκοολική Ηπατοπάθεια 4,6(2,2-18)	0.005
Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα 17(1-50)	Ηπατίτιδα Β 4,6(0,06-39)	0.003
Ηπατίτιδα C 4,8(0,2-90)	Ηπατίτιδα Β 4,6(0,06-39)	0.05

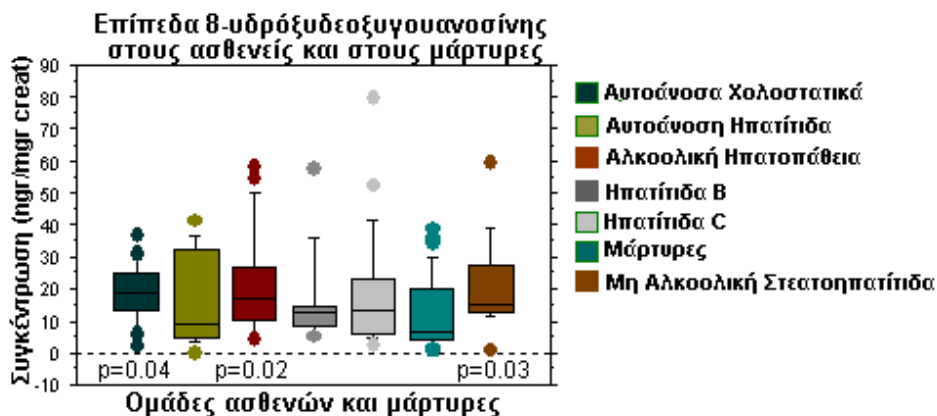
1.5. Επίπεδα 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες.

Η κανονικότητα της κατανομής ελέγχθηκε με το τεστ Kolmogorov-Smirnov. Με λογαριθμοκανονική μετατροπή των δεδομένων απορρίφθηκε η κανονικότητα της καμπύλης σε στάθμη σημαντικότητας $p=0.03$ (Ιστόγραμμα 5).



Ιστόγραμμα 5: Κατανομή συχνότητων (άξονας ψ) της μεταβλητής της 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνης (Διάγρ. Α) και της λογαριθμημένης μεταβλητής της 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνης (Διάγρ. Β).

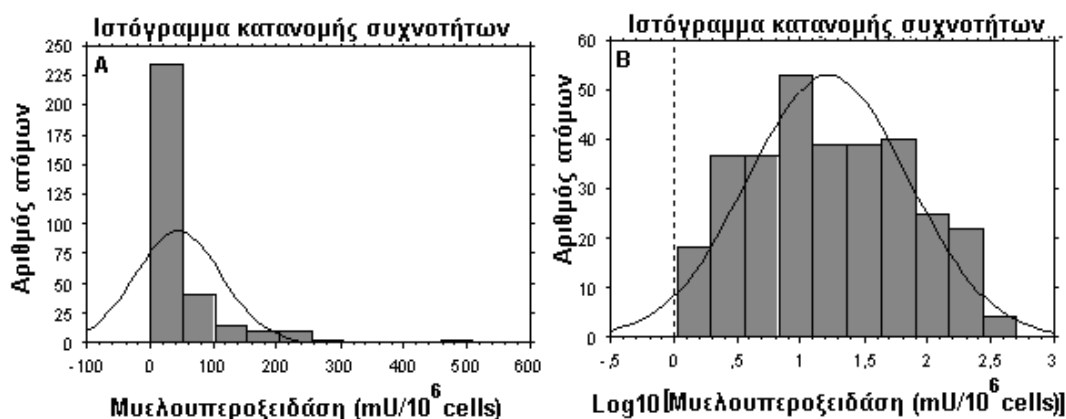
Συγκριτικά με τους μάρτυρες, όλες οι ομάδες των ασθενών παρουσίασαν αύξηση στα επίπεδα της 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνης (Διάγραμμα 20). Στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με μάρτυρες παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά [6(0,6-40) vs 19(1,9-37), $p=0.04$], αλκοολική ηπατοπάθεια [6(0,6-40) vs 17(0,1-60), $p=0.02$] και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα [6(0,6-40) vs 15(0,8-60), $p=0.03$].



Διάγραμμα 20: Διαγράμματα «Whisker ή box»: Επίπεδα 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.

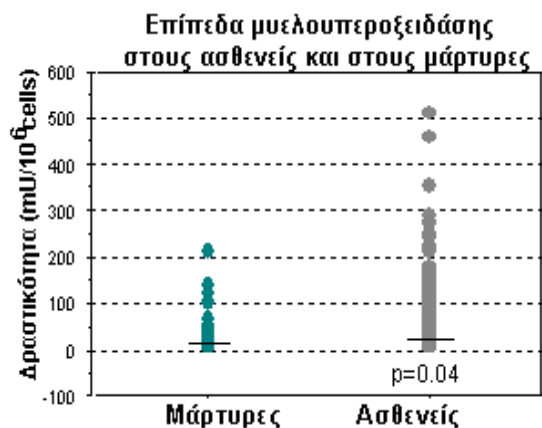
1.6. Επίπεδα μυελοϋπεροξειδάσης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες.

Η κατανομή του λογαρίθμου της MPO δεν ακολουθεί τη κανονική κατανομή (Ιστόγραμμα 6). Η κανονικότητα της κατανομής απορρίφθηκε με το χ^2 έλεγχο, σε στάθμη σημαντικότητας $p=0.001$. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τον έλεγχο Kruskal-Wallis.

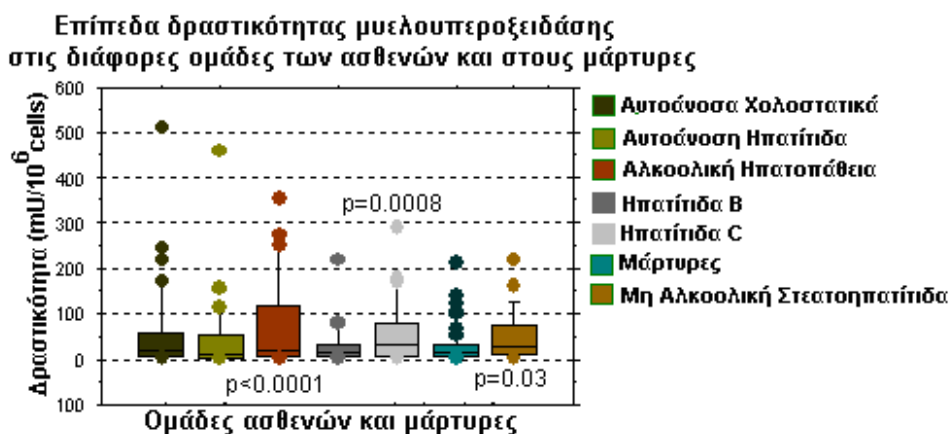


Ιστόγραμμα 6: Ιστόγραμμα κατανομής συχνοτήτων της αρχικής (Διάγρ.Α) και της λογαριθμημένης τιμής (Διάγρ.Β) της μυελοϋπεροξειδάσης. Καμία από τις δυο κατανομές δεν ήταν κανονική.

Οι ασθενείς είχαν στατιστικώς υψηλότερη δραστικότητα MPO σε σχέση με τους μάρτυρες [18(0,8-510) vs, $p=0.04$] (Διάγραμμα 21). Ανάμεσα στους ασθενείς δεν διέφεραν σημαντικά όλες οι ομάδες των ασθενών με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 22). Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν, στη σύγκριση των υγιών με τους ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια [11(1-214) vs 21(1,3-355), $p<0.0001$], τους ασθενείς με ηπατίτιδα C [11(1-214) vs 32(0,8-290), $p=0.0008$] και τους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα [11(1-214) vs 28(1,6-220), $p=0.03$] (Διάγραμμα 22). Οι ασθενείς με ηπατίτιδα C διέφεραν επίσης σημαντικά σε σχέση με τους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα [32(0,8-290) vs 10,5(1,2-463), $p=0.02$] και τους ασθενείς με ηπατίτιδα B [32(0,8-290) vs 12(1-222), $p=0.03$].



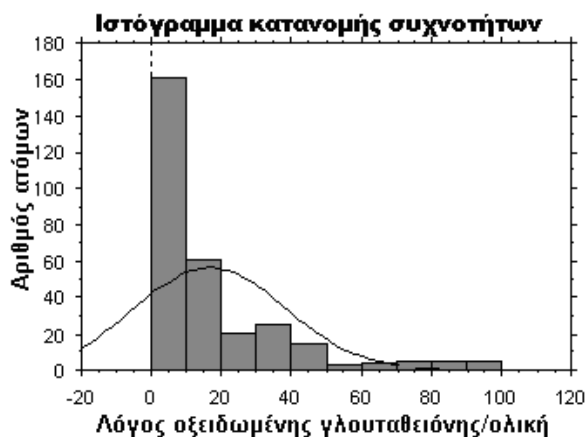
Διάγραμμα 21: Διάγραμμα διασποράς της μεταβλητής της MPO στο σύνολο των ασθενών και στους μάρτυρες. Απεικονίζεται η διάμεσος (οριζόντια γραμμή). Οι ασθενείς (n=235) διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες (n=75) [18(0,8-510) vs 11(1-214), p=0.04]. Η τιμή p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Mann Whitney”.



Διάγραμμα 22: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστικότητας της MPO στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.

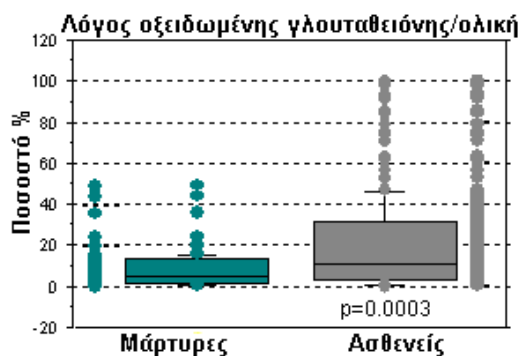
1.7. Επίπεδα οξειδωμένης γλουταθειόνης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες.

Η γλουταθειόνη βρίσκεται στην ανηγμένη (GSH) και στην οξειδωμένη μορφή (GSSG). Σε φυσιολογικές συνθήκες η ανηγμένη κατείχε το 90-95% της συνολικής γλουταθειόνης και η οξειδωμένη το 5-10%. Η πιο αξιόπιστη μέτρηση είναι η μέτρηση του λόγου της οξειδωμένης γλουταθειόνης προς την ολική γλουταθειόνη. Η κανονικότητα της κατανομής απορρίφθηκε σε στάθμη σημαντικότητας $p < 0.0001$ με το χ^2 έλεγχο, τόσο στις κανονικές τιμές, όσο και στις λογαριθμημένες (Ιστόγραμμα 7).



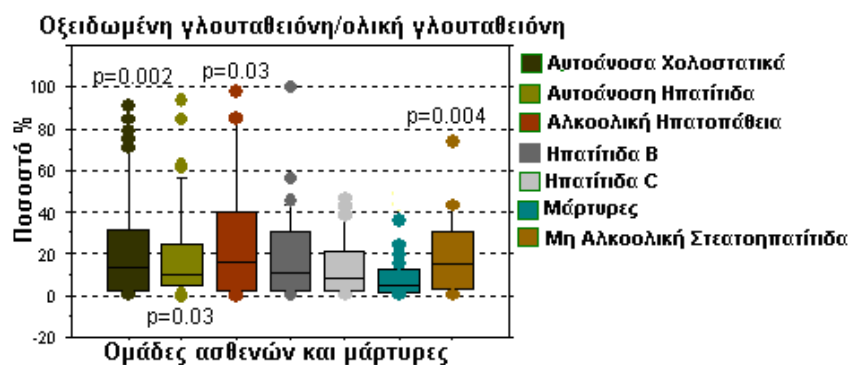
Ιστόγραμμα 7: Κατανομή συχνοτήτων (άξονας ψ) της μεταβλητής του λόγου οξειδωμένης γλουταθειόνης/ολική.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τον έλεγχο Kruskal-Wallis. Οι ασθενείς είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 23).



Διάγραμμα 23: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Οι ασθενείς ($n=235$) διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες ($n=75$) [10,7(0,1-100) vs 4,9(0,1-49), $p=0.0003$]. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney”. Ο κύριος όγκος των τιμών είχε εύρος για τους μάρτυρες (0,8-16) και για τους ασθενείς (0,8-47).

Συγκριτικά με τους μάρτυρες, ο λόγος οξειδωμένη γλουταθειόνη/ολική ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα [4,9(0,1-49) vs 9,5(0,1-93), $p=0.03$], αυτοάνοσα χολοστατικά [4,9(0,1-49) vs 14(0,2-92), $p=0.002$], αλκοολική ηπατοπάθεια [4,9(0,1-49) vs 16(0,3-97), $p=0.03$] και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα [4,9(0,1-49) vs 15(0,1-74), $p=0.004$] (Διάγραμμα 24). Το μεγαλύτερο ποσοστό οξειδωμένης γλουταθειόνης το είχαν οι ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια και διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους ασθενείς με ηπατίτιδα C, που είχαν το μικρότερο ποσοστό οξειδωμένης γλουταθειόνης [16(0,3-97) vs 8,3(0,1-47), $p=0.05$] (Διάγραμμα 24).

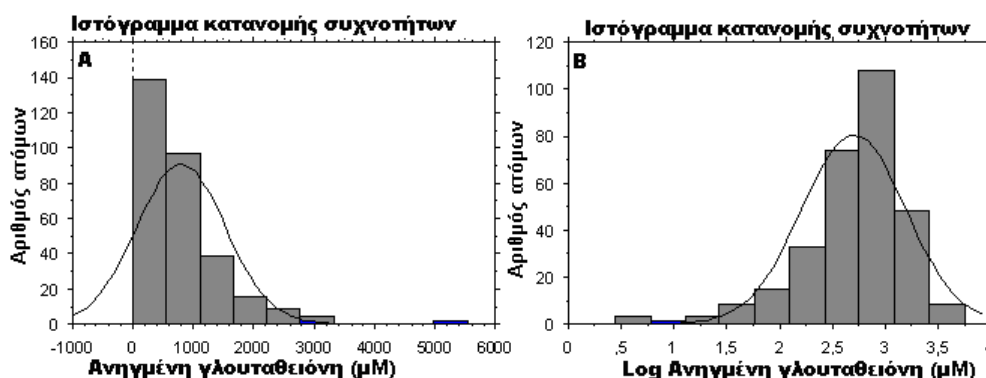


Διάγραμμα 24: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα του λόγου της οξειδωμένης γλουταθειόνης προς την ολική στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.

2. Επίπεδα αντιοξειδωτικών παραγόντων στα νοσήματα του ήπατος και στους μάρτυρες.

2.1. Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες.

Η κατανομή της λογαριθμημένης τιμής της ανηγμένης γλουταθειόνης δεν ήταν κανονική (Ιστόγραμμα 8). Η κανονικότητα της κατανομής απορρίφθηκε σε στάθμη σημαντικότητας $p < 0.0001$, με το χ^2 έλεγχο. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τον έλεγχο Kruskal-Wallis.



Ιστόγραμμα 8: Κατανομή συχνοτήτων (άξονας ψ) της μεταβλητής της ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγρ. Α) και της λογαριθμημένης μεταβλητής της ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγρ. Β).

Οι μάρτυρες είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης σε σχέση με όλες τις ομάδες των ασθενών (Πίνακας 43) (Διάγραμμα 25). Τα χαμηλότερα επίπεδα τα είχαν οι ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια που διέφεραν από όλες τις υπόλοιπες ομάδες των ασθενών

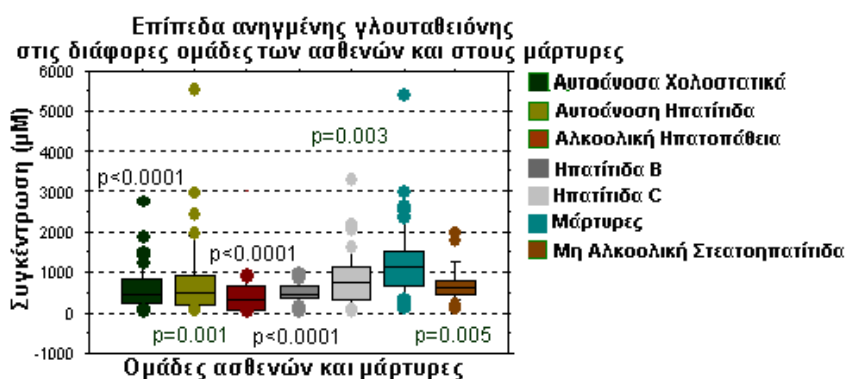
(Πίνακας 44). Από τις ομάδες των ασθενών τα υψηλότερα επίπεδα, παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με ηπατίτιδα C.

Πίνακας 43: Επίπεδα γλουταθειόνης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Η τιμή p υπολογίστηκε με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney και αναφέρεται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Ομάδες ασθενών και μαρτύρων	Αριθμός ατόμων (n=310)	Διάμεσος τιμή (εύρος)	Τιμή p
Μάρτυρες	n=75	1101(91-5409)	
Αλκοολική Ηπατοπάθεια	n=29	322(3-914)	<0.0001
Αυτοάνοσα Χολοστατικά	n=49	474(4-2743)	<0.0001
Ηπατίτιδα Β	n=49	441(21-991)	<0.0001
Ηπατίτιδα C	n=47	761(35-3287)	0.003
Μη αλκοολική Στεατοηπατίτιδα	n=25	602(77-1992)	0.005
Αυτοάνοση Ηπατίτιδα	n=36	512(51-5541)	0.001

Πίνακας 44: Συσχέτιση των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης στις διάφορες ομάδες των ασθενών με τους ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Η τιμή p υπολογίστηκε με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney και αναφέρεται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια.

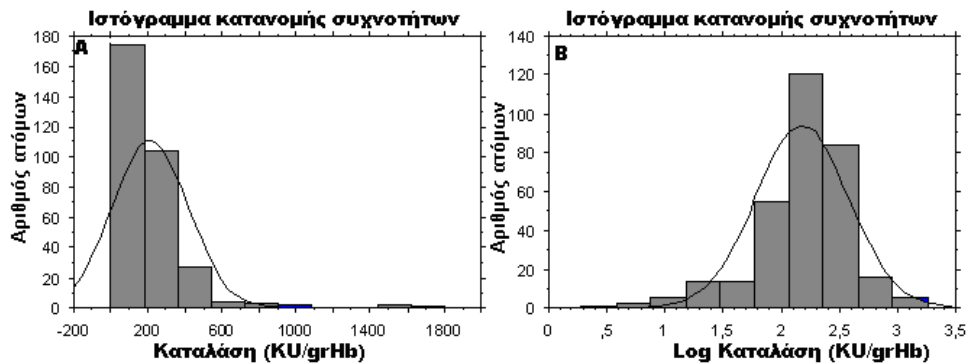
Ομάδες ασθενών	Αριθμός ατόμων (n=310)	Διάμεσος τιμή (εύρος)	Τιμή p
Αλκοολική Ηπατοπάθεια	n=29	322(3-914)	
Ηπατίτιδα C	n=47	761(35-3287)	<0.0001
Μη Αλκοολική Στεατοηπατίτιδα	n=25	602(77-1992)	0.0002
Αυτοάνοση Ηπατίτιδα	n=36	512(51-5541)	0.0001
Ηπατίτιδα Β	n=49	441(21-991)	0.02
Αυτοάνοσα Χολοστατικά	n=49	474(4-2743)	0.04



Διάγραμμα 25: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών, σε σχέση με τους μάρτυρες.

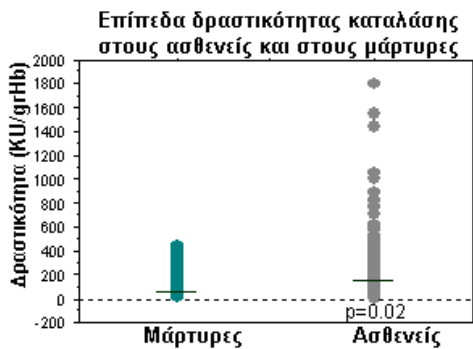
2.2. Επίπεδα δραστικότητας καταλάσης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες.

Η κατανομή της λογαριθμημένης τιμής της καταλάσης, δεν ήταν κανονική (Ιστόγραμμα 9). Ο έλεγχος έγινε με το χ^2 έλεγχο, όπου απορρίφθηκε η κανονικότητα της κατανομής σε στάθμη σημαντικότητας $p < 0.0001$. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τον έλεγχο Kruskal-Wallis.



Ιστόγραμμα 9: Κατανομή συχνοτήτων (άξονας ψ) της μεταβλητής της δραστικότητας της καταλάσης (Διάγρ. Α) και της λογαριθμημένης μεταβλητής της δραστικότητας της καταλάσης (Διάγρ. Β).

Οι ασθενείς είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη δραστικότητα σε σχέση με τους μάρτυρες [178(2-1800) vs 141(21-449), $p=0.02$] (Διάγραμμα 26).



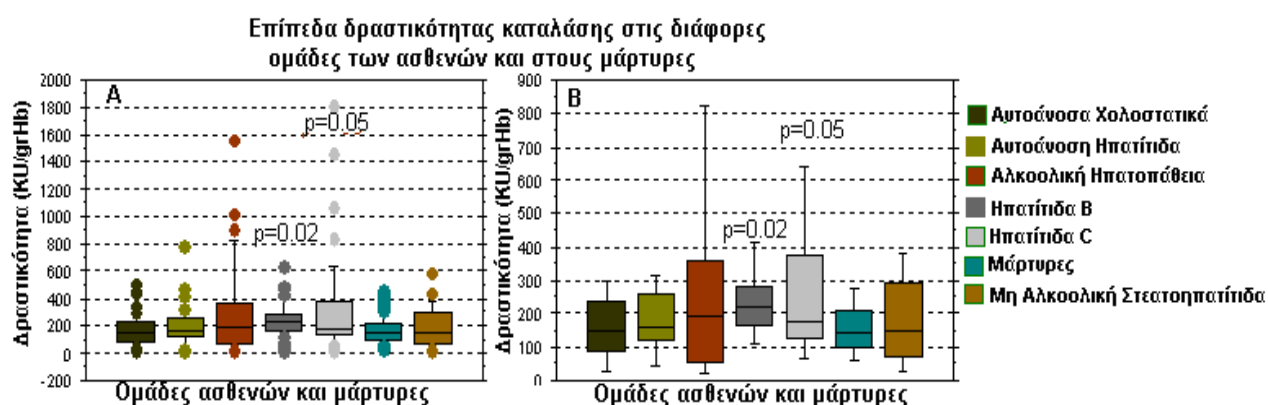
Διάγραμμα 26: Οι ασθενείς ($n=235$) διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες ($n=75$) [178(2-1800) vs 141(21-449), $p=0.02$]. Απεικονίζεται η διάμεσος (οριζόντια γραμμή). Η τιμή p υπολογίστηκε με τη μέθοδο "Mann Whitney" και αναφέρεται στη σύγκριση των ασθενών με τους μάρτυρες.

Οι ασθενείς με ιογενή ηπατίτιδα είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη δραστικότητα καταλάσης σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς [167(7-1800) vs 166(2-1554), $p=0.02$] και σε σχέση με τους μάρτυρες [167(7-1800) vs 141(21-449), $p=0.02$]. Αναλυτικότερα, η καταλάση είχε σημαντικά υψηλότερη δραστικότητα στους ασθενείς με ηπατίτιδα C [179(11-1800) vs 141(21-449), $p=0.05$] και στους ασθενείς με ηπατίτιδα B [222(7-628) vs 141(21-449), $p=0.02$] σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 27). Αυτές οι ομάδες διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους ασθενείς

με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα και τους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά που είχαν τη μικρότερη δραστικότητα (Πίνακας 45).

Πίνακας 45: Σύγκριση επιπέδων καταλάσης μεταξύ ασθενών και μαρτύρων, καθώς επίσης και μεταξύ των ομάδων των ασθενών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Η τιμή p υπολογίστηκε με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney.

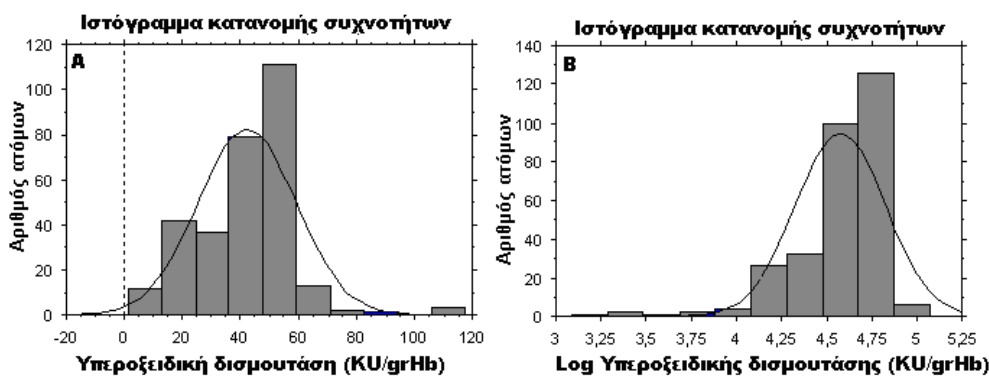
Ομάδες προς σύγκριση		Τιμή p
Ηπατίτιδα Β	Μάρτυρες	
222(7-628)	141(21-449)	0.02
Ηπατίτιδα Β	Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα	
222(7-628)	145(2-582)	0.02
Ηπατίτιδα Β	Αυτοάνοσα χολοστατικά	
222(7-628)	148(11-504)	0.04
Ηπατίτιδα C	Μάρτυρες	
179(11-1800)	141(21-449)	0.05
Ηπατίτιδα C	Μη αλκοολική Στεατοηπατίτιδα	
179(11-1800)	145(2-582)	0.04



Διάγραμμα 27: Διάγραμμα «Whisker ή box»: A) Επίπεδα δραστικότητας καταλάσης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες. B) Το ίδιο διάγραμμα με το A με τη διαφορά ότι αφαιρέθηκαν οι τιμές που απείχαν αρκετά από τον κύριο όγκο των τιμών.

2.3. Επίπεδα δραστικότητας υπεροξειδικής δισμουτάσης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες.

Η υπεροξειδική δισμουτάση δεν ακολουθούσε κανονική κατανομή. Η απόρριψη της κανονικότητας της κατανομής έγινε με το τεστ Kolmogorov-Smirnov σε στάθμη σημαντικότητας $p=0.003$. Οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων έγιναν με τη μη παραμετρική δοκιμασία Kruskal-Wallis που ήταν αντίστοιχη της ANOVA (Ιστόγραμμα 10).



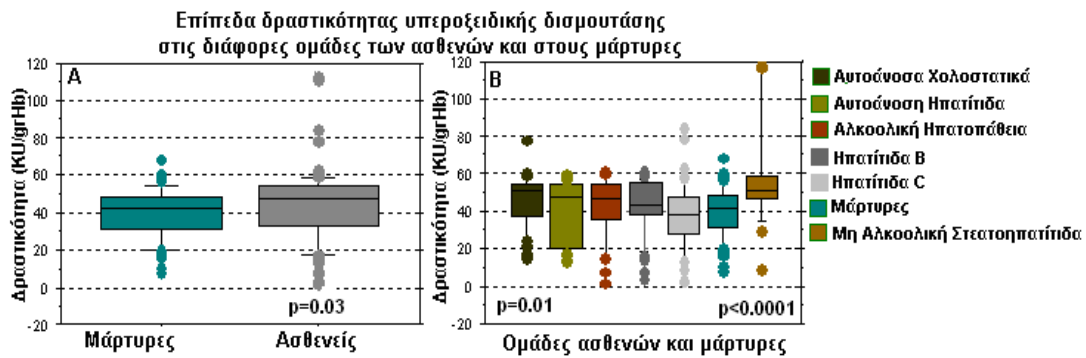
Ιστόγραμμα 10: Κατανομή συχνοτήτων (άξονας ψ) της μεταβλητής της δραστικότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγρ. Α) και της λογαριθμημένης μεταβλητής της δραστικότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγρ. Β).

Οι ασθενείς είχαν σημαντικά υψηλότερη δραστικότητα υπεροξειδικής δισμουτάσης σε σχέση με τους μάρτυρες [48(1-118) vs 42(8-68), $p=0.03$] (Διάγραμμα 28Α). Οι ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα είχαν την υψηλότερη δραστικότητα υπεροξειδικής δισμουτάσης σε σχέση με όλες τις άλλες ομάδες των ασθενών και διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα, τους ασθενείς με ηπατίτιδα Β, τους ασθενείς με ηπατίτιδα C, τους ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια και σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 28Β, Πίνακας 46).

Πίνακας 46: Σύγκριση επιπέδων υπεροξειδικής δισμουτάσης στους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες των ασθενών και τους μάρτυρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Η τιμή p υπολογίστηκε με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney και Kruskal Wallis και αναφέρεται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών, με τους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα.

Ομάδες ασθενών και μαρτύρων	Αριθμός ατόμων	Διάμεσος τιμή (εύρος)	Τιμή p
Μη Αλκοολική Στεατοηπατίτιδα	$n=25$	50(8-118)	
Μάρτυρες	$n=75$	42(8-68)	$p<0.0001$
Αυτοάνοση ηπατίτιδα	$n=36$	48(13-59)	$p=0.005$
Ηπατίτιδα Β	$n=49$	46(3-62)	$p=0.004$
Ηπατίτιδα C	$n=47$	39(2-85)	$p=0.007$
Αλκοολική ηπατοπάθεια	$n=29$	47(1-61)	$p=0.007$

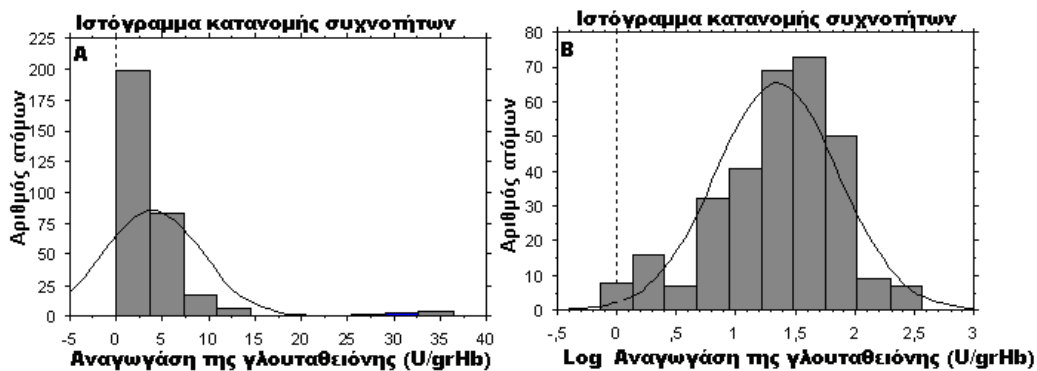
Συγκριτικά με τους μάρτυρες, οι ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα δραστικότητας [42(8-68) vs 51(14-78), $p=0.01$] και οι ασθενείς με ηπατίτιδα C είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα [42(8-68) vs 39(2-85), $p=0.02$].



Διάγραμμα 28: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστικότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες. Διάγρ. A) Σύγκριση ασθενών με μάρτυρες. Διάγρ. B) Σύγκριση των διαφόρων ομάδων των ασθενών με τους μάρτυρες.

2.4. Επίπεδα δραστικότητας της αναγωγής της γλουταθειόνης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες.

Τα επίπεδα της δραστικότητας της αναγωγής της γλουταθειόνης δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή (Ιστόγραμμα 11). Η απόρριψη της κανονικότητας της κατανομής έγινε με το τεστ Kolmogorov-Smirnov σε στάθμη σημαντικότητας $p<0.0001$. Οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων έγιναν με τη μη παραμετρική δοκιμασία Kruskal-Wallis και Mann Whitney.



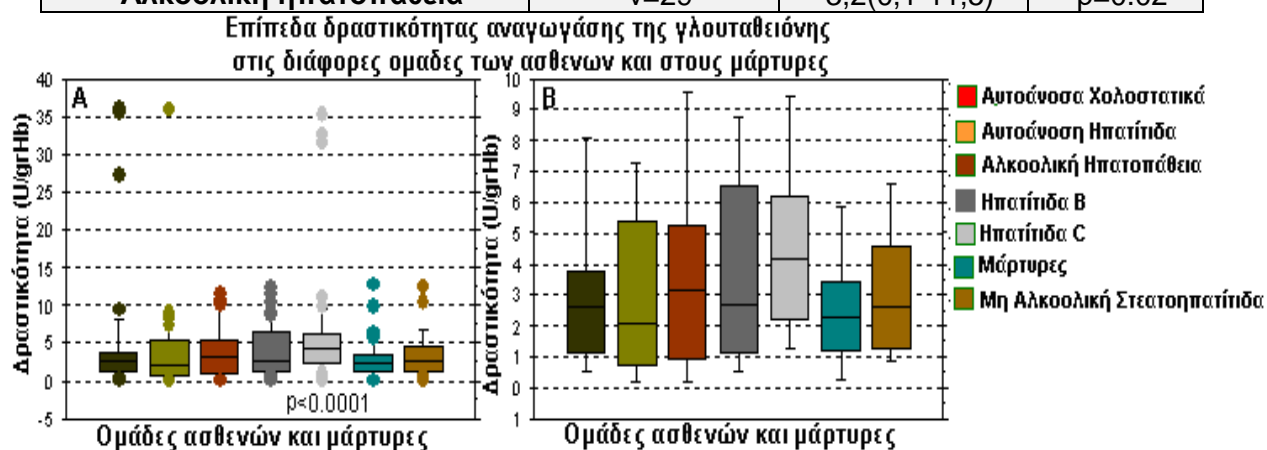
Ιστόγραμμα 11: Κατανομή συχνοτήτων (άξονας ψ) της μεταβλητής της δραστικότητας της αναγωγής της γλουταθειόνης (Διαγρ.Α) και της λογαριθμημένης μεταβλητής της δραστικότητας της αναγωγής της γλουταθειόνης (Διάγρ. Β).

Οι ασθενείς είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη δραστικότητα αναγωγής της γλουταθειόνης σε σχέση με τους μάρτυρες [2,8(0,07-36) vs 2,3(0,08-12), $p=0.03$]. Από τους ασθενείς, την υψηλότερη τιμή την είχαν οι ασθενείς με ηπατίτιδα C που διέφεραν σημαντικά από τους μάρτυρες [4,2(0,09-35) vs 2,3(0,08-12), $p<0.0001$] (Διάγραμμα 29) και τις υπόλοιπες ομάδες

των ασθενών (Πίνακας 47). Οι ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα είχαν τη μικρότερη δραστικότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες των ασθενών.

Πίνακας 47: Σύγκριση επιπέδων δραστικότητας αναγωγάσης της γλουταθειόνης στους ασθενείς με ηπατίτιδα C σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες των ασθενών και τους μάρτυρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Η τιμή p υπολογίστηκε με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney και αναφέρεται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους ασθενείς με ηπατίτιδα C.

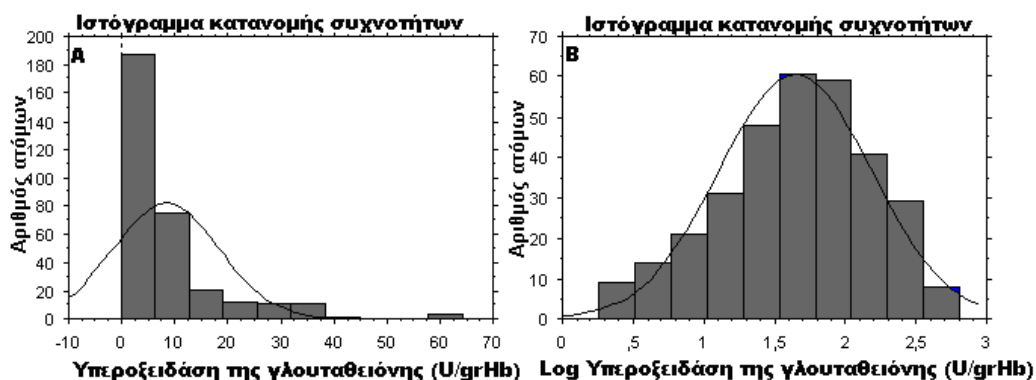
Ομάδες ασθενών και μάρτυρες	Αριθμός ατόμων (n=310)	Διάμεσος τιμή (εύρος)	Τιμή p
Ηπατίτιδα C	n=47	4,2(0,09-35)	
Μάρτυρες	n=75	2,3(0,08-12)	p<0.0001
Αυτοάνοση ηπατίτιδα	n=36	2,1(0,08-36)	p=0.001
Αυτοάνοσα χολοστατικά	n=49	2,6(0,1-36)	p=0.04
Ηπατίτιδα B	n=49	3,1(0,17-12)	p=0.03
Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα	n=25	2,6(0,07-12,6)	p=0.05
Αλκοολική ηπατοπάθεια	n=29	3,2(0,1-11,5)	p=0.02



Διάγραμμα 29: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Α) Επίπεδα δραστικότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες. Β) Το ίδιο διάγραμμα με το Α, με τη διαφορά ότι είχαν αφαιρεθεί οι τιμές που απείχαν αρκετά από τον κύριο όγκο των τιμών.

2.5. Επίπεδα δραστικότητας υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες.

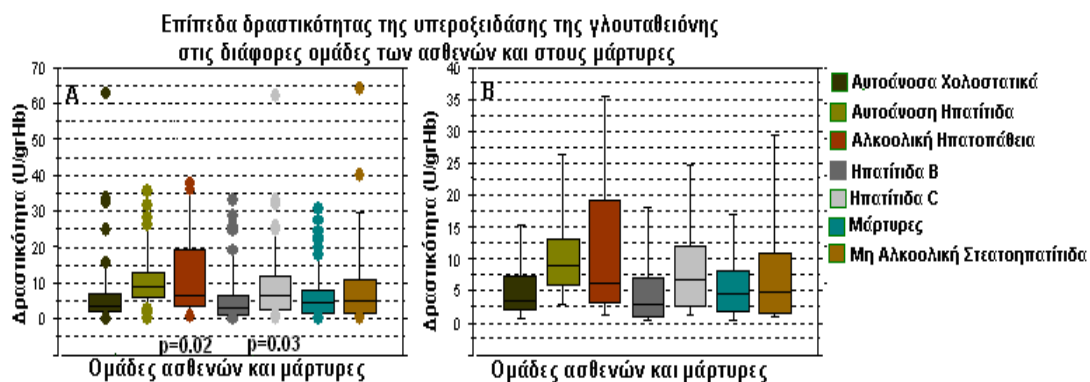
Η κανονικότητα της κατανομής ελέγχθηκε με το τεστ Kolmogorov-Smirnov. Με λογαριθμοκανονική μετατροπή των δεδομένων έγινε αποδεκτή η κανονικότητα της καμπύλης σε στάθμη σημαντικότητας $p=0.05$ (Ιστόγραμμα 12).



Ιστόγραμμα 12: Κατανομή συχνότητων (άξονας ψ) της μεταβλητής της δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Διάγρ. A) και της λογαριθμημένης μεταβλητής της δραστικότητας (Διάγρ. B).

Το σύνολο των ασθενών παρουσίαζε υψηλότερα επίπεδα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης σε σχέση με τους μάρτυρες, χωρίς όμως στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους [5,1(0,1-64) vs 4,5(0,3-31), $p=0.09$].

Οι ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και ηπατίτιδα C είχαν την υψηλότερη δραστικότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες των ασθενών και τους μάρτυρες (Διάγραμμα 30). Οι ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους ασθενείς με ηπατίτιδα B [8,6(0,6-36) vs 3,1(0,2-33), $p<0.0001$], τους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά [8,6(0,6-36) vs 4,9(0,1-63), $p=0.02$] και σε σχέση με τους μάρτυρες [8,6(0,6-36) vs 4,5(0,3-31), $p=0.02$]. Οι ασθενείς με ηπατίτιδα B είχαν τη χαμηλότερη δραστικότητα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους ασθενείς με ηπατίτιδα C [3,1(0,2-33), vs 6,7(0,2-62), $p=0.005$].



Διάγραμμα 30: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Α) Επίπεδα δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στις διάφορες ομάδες των ασθενών και στους μάρτυρες. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες. Β) Το ίδιο διάγραμμα με το Α με τη διαφορά ότι είχαν αφαιρεθεί οι τιμές που απείχαν αρκετά από τον κύριο όγκο των τιμών.

Οι ασθενείς με ηπατίτιδα C παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα δραστικότητα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης σε σχέση με τους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά [6,7(0,2-62) vs 4,9(0,1-63), $p=0.02$] και σε σχέση με τους μάρτυρες [6,7(0,2-62) vs 4,5(0,3-31), $p=0.03$].

3. Επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες σε σχέση με τα κλινικοεργαστηριακά δεδομένα των ασθενών.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε ομάδες που σχετίζονται με τη θεραπεία, τα εργαστηριακά ευρήματα, τα κλινικά ευρήματα και τα ιστοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά τους. Οι ομάδες των ασθενών φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 48. Στους ασθενείς συμπεριλήφθηκαν και 10 ασθενείς με σύνδρομο επικάλυψης ΜΑΣΗ με ΠΧΚ. Ως προς τη φλεγμονώδη δραστηριότητα στο ήπαρ μελετήθηκαν μόνο οι ασθενείς που η πρόσφατη βιοψία τους δεν απείχε αρκετό χρονικό διάστημα από την ημερομηνία συλλογής του δείγματος.

Πίνακας 48: Κλινικοεργαστηριακά δεδομένα του συνόλου των ασθενών.

Κατηγορίες	Αριθμός ασθενών n=245
Εργαστηριακά ευρήματα	
Βιοχημική δραστηριότητα (ναι/όχι)	78/167
Θεραπεία και έκβαση της	
Θεραπεία (ναι/όχι)	109/35
Μετά από θεραπεία	24
Ανταπόκριση στη θεραπεία (υπό θεραπεία) (ναι/όχι)	74/35
Ανταπόκριση στη θεραπεία (μετά από θεραπεία)(ναι/όχι)	16/8
Ιστοπαθολογοανατομικά ευρήματα	
Κίρρωση (ναι/όχι)	59/186
Βιοχημική δραστηριότητα στους κίρρωτικούς (ναι/όχι)	25/34
Βιοχημική δραστηριότητα στους μη κίρρωτικούς (ναι/όχι)	54/132
Αντιρροπούμενη κίρρωση (ναι/όχι)	37/22
Βαθμός ίνωσης	
Ελάχιστη ίνωση	9
Ήπια ίνωση	76
Μέτρια ίνωση	27
Έντονη ίνωση	59
Φλεγμονώδη δραστηριότητα	
Ελάχιστη/ήπια	37
Μέτρια/έντονη	12

3.1. Επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες σε σχέση με τους δείκτες ηπατικής βλάβης στο σύνολο των ασθενών.

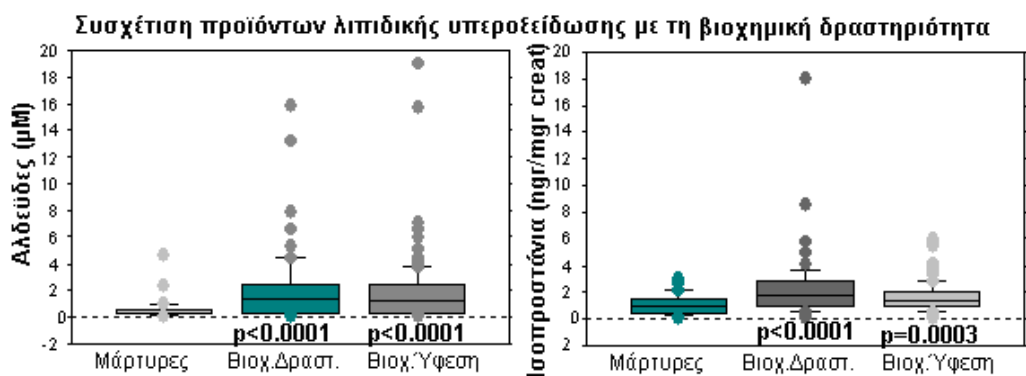
3.1.1. Συσχέτιση προϊόντων οξειδωτικής βλάβης με τους δείκτες ηπατικής βλάβης στο σύνολο των ασθενών.

Ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα παρουσίαζαν τάση αύξησης στα επίπεδα των ισοπροστανίων, των αλδεϋδών, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, της 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνης, της 3-νιτροτυροσίνης, της MPO και της οξειδωμένης γλουταθειόνης σε σχέση με τους ασθενείς που ήταν σε βιοχημική ύφεση (Πίνακας 49). Στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μόνο ως προς τα επίπεδα των ισοπροστανίων ανάμεσα στις δυο ομάδες [1,5(0,01-18) vs 1,3(0,07-5,9), $p=0.05$]. Ασθενείς τόσο με όσο και χωρίς βιοχημική δραστηριότητα παρουσίασαν στατιστικά υψηλότερα επίπεδα αλδεϋδών, ισοπροστανίων (Διάγραμμα 31) και οξειδωμένης γλουταθειόνης, σε σχέση με τους μάρτυρες (Πίνακας 49). Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, η MPO (Διάγραμμα 32) και η 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνη διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες μόνο στους ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα (Πίνακας 49).

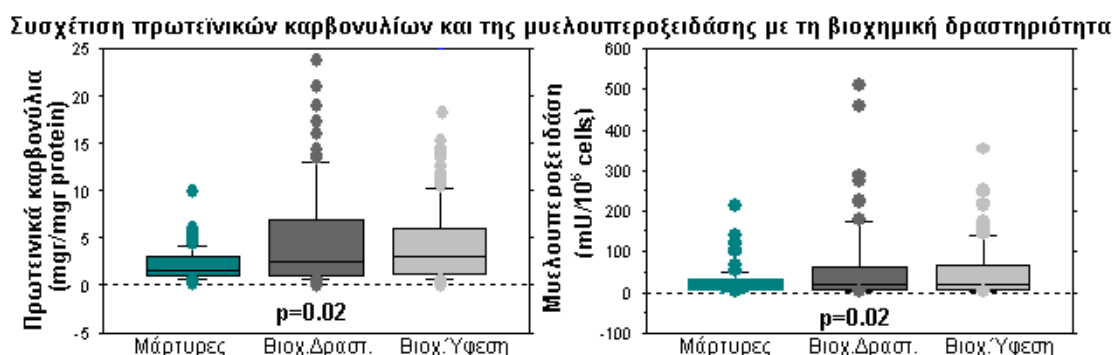
Πίνακας 49: Δείκτες οξειδωτικής βλάβης ανάλογα με την ύπαρξη βιοχημικής δραστηριότητας στο σύνολο των ασθενών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεϋδες και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τους υπόλοιπους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

	Μάρτυρες ($n=75$)	Βιοχημική ύφεση ($n=167$)	Βιοχημική δραστηριότητα ($n=78$)
Ισοπροστανία	1(0,02-3)	1,3(0,07-5,9)****	1,5(0,01-18)****
Αλδεϋδες	0,3(0,05-4,9)	1,3(0,1-19)****	1,4(1,2-16)****
Πρωτεϊνικά καρβονύλια	1,6(0,1-10)	3(0,02-17)	2,5(0,07-24)**
8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνη	6(0,6-46)	14,3(1,9-58)	19,6(0,1-80)**
Μυελουπεροξειδάση	11,4(1-214)	16(0,1-355)	16(0,1-511)**
Οξειδωμένη γλουταθειόνη	4,9(0,1-49)	0,6(0,03-98)****	9,3(0,04-98)****

* $0.1 > p > 0.05$, ** $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.001$.



Διάγραμμα 31: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Συσχέτιση των αλδεϋδών και των ισοπροστανίων με την παρουσία ή όχι βιοχημικής δραστηριότητας στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Mann Whitney” για τα ισοπροστανία και με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεϋδες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.



Διάγραμμα 32: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Συσχέτιση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της MPO με την παρουσία ή όχι βιοχημικής δραστηριότητας στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Mann Whitney” για τη MPO και με τη μέθοδο ANOVA για τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

3.1.2 Συσχέτιση αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους δείκτες ηπατικής βλάβης στο σύνολο των ασθενών

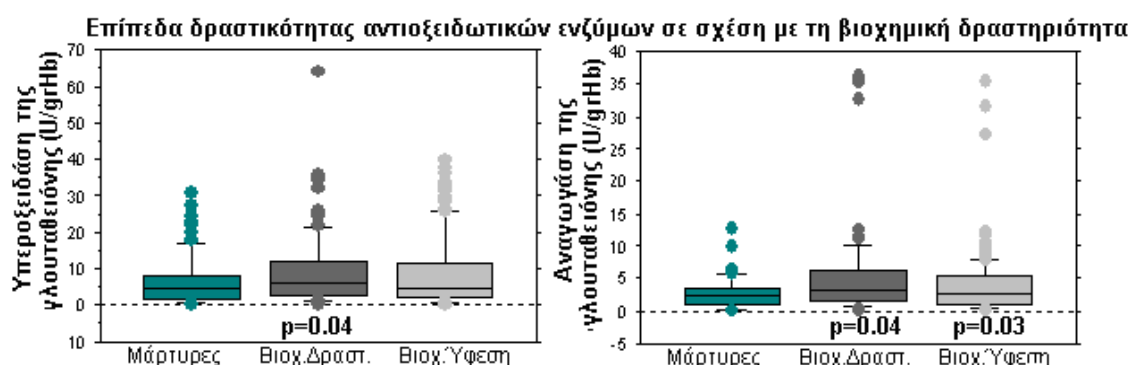
Τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης ήταν σημαντικά χαμηλότερα στους ασθενείς που είχαν βιοχημική δραστηριότητα σε σχέση με τους ασθενείς που ήταν σε βιοχημική ύφεση [494(3,9-3286) vs 493(1-5541), $p=0.005$] και σε σχέση με τους μάρτυρες [494(3,9-3286) vs 1101(91-5409), $p<0.0001$]. Οι ασθενείς που βρισκόταν σε βιοχημική ύφεση είχαν ανάλογα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης σε σχέση με τους μάρτυρες. Ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα παρουσίαζαν σημαντική αύξηση των επιπέδων της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης σε σχέση με τους μάρτυρες (Πίνακας 50, Διάγραμμα 33). Ασθενείς χωρίς βιοχημική δραστηριότητα δεν

παρουσίασαν διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες. Η δραστικότητα της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς που βρισκόταν σε βιοχημική ύφεση σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντίθετα, οι ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτες διαφορές ως προς τη δραστικότητα των παραπάνω αντιοξειδωτικών ενζύμων σε σχέση με τους μάρτυρες (Πίνακας 50, Διάγραμμα 34). Συνοπτικά στους ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα παρατηρήθηκε τάση αύξησης της δραστικότητας της αναγωγάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και τάση μείωσης στη γλουταθειόνη, στη δραστικότητα της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης σε σχέση με τους ασθενείς που ήταν σε βιοχημική ύφεση.

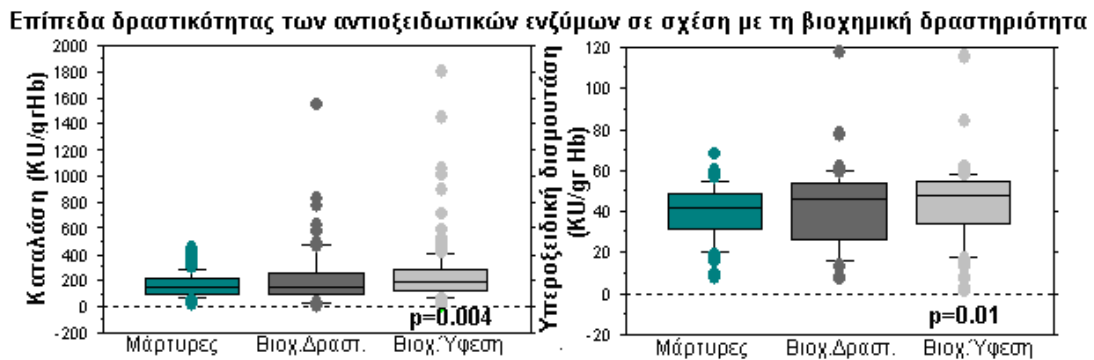
Πίνακας 50: Συσχέτιση των δεικτών αντιοξειδωτικής άμυνας σε σχέση με τη βιοχημική δραστηριότητα, στο σύνολο των ασθενών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

	Μάρτυρες (v=75)	Βιοχημική ύφεση (v=78)	Βιοχημική δραστηριότητα (v=167)
Ανηγμένη γλουταθειόνη	1101(91-5409)	493(1-5541)	494(3,9-3286)****
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	4,5(0,3-31)	4,6(0,09-40)	6,2(0,4-64)**
Αναγωγάση της γλουταθειόνης	2,3(0,08-12)	2,7(0,07-35)**	3,2(0,08-36)**
Υπεροξειδική δισμουτάση	42(8-68)	47(1,2-116)***	47(7-117)
Καταλάση	141(21-449)	187(5-1800)***	149(4,7-1600)

*0.1>p>0.05, **p≤0.05, ***p≤0.01, ****p≤0.001.



Διάγραμμα 33: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Συσχέτιση της δραστικότητας της υπεροξειδάσης και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης με την παρουσία ή όχι βιοχημικής δραστηριότητας στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.



Διάγραμμα 34: Διάγραμμα «Whisker ή box»: Συσχέτιση δραστικότητας καταλάσης και υπεροξειδικής δισμουτάσης με την παρουσία ή όχι βιοχημικής δραστηριότητας στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

3.2. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη θεραπεία και την έκβαση της στο σύνολο των ασθενών

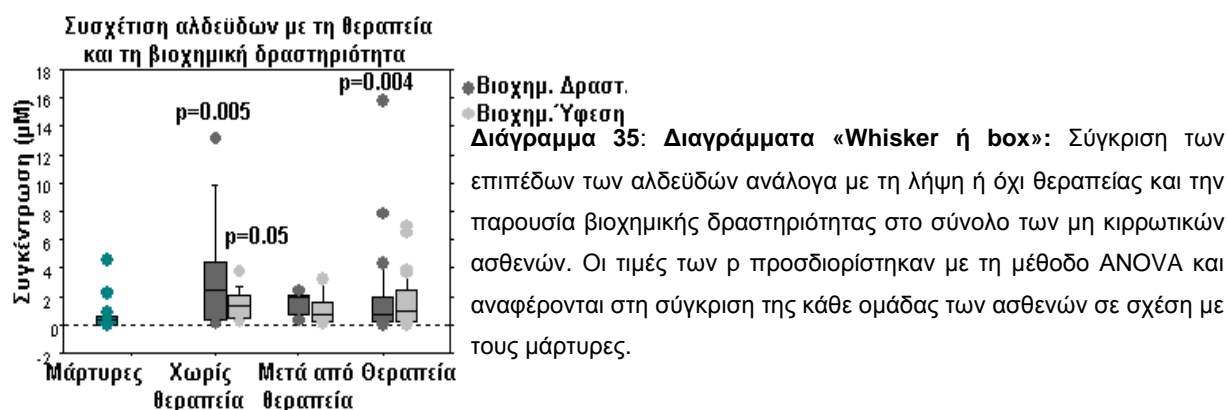
Η επίδραση της θεραπείας στους δείκτες οξειδωτικής βλάβης ελέγχθηκε μόνο στους ασθενείς που δεν είχαν κίρρωση. Στους μη κίρρωτικούς συμπεριλαμβάνονται 90 ασθενείς που ελάμβαναν θεραπεία, 18 ασθενείς που ελέγχθηκαν μετά τη θεραπεία και 29 ασθενείς που δεν είχαν ακόμη λάβει θεραπεία (Πίνακας 51).

Πίνακας 51: Κατηγοριοποίηση ασθενών ανάλογα με τη θεραπεία και την ύπαρξη βιοχημικής δραστηριότητας. Αναγράφεται ο αριθμός των ασθενών στη κάθε κατηγορία.

Ομάδες ασθενών	Αριθμός ασθενών
Υπό Θεραπεία	v=90
Χωρίς βιοχημική δραστηριότητα	v=64
Βιοχημική δραστηριότητα	v=26
Μετά από θεραπεία	v=18
Χωρίς βιοχημική δραστηριότητα	v=13
Βιοχημική δραστηριότητα	v=5
Πριν τη θεραπεία	v=29
Χωρίς βιοχημική δραστηριότητα	v=18
Βιοχημική δραστηριότητα	v=11

3.2.1. Συσχέτιση προϊόντων οξειδωτικής βλάβης με τη θεραπεία και την έκβασης της στο σύνολο των μη κίρρωτικών ασθενών.

Οι ασθενείς που δεν πήραν ποτέ θεραπεία παρουσίαζαν τάση αύξησης των επιπέδων των αλδευδών (Διάγραμμα 35, Πίνακας 52) σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν λάβει θεραπεία στο παρελθόν ή συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Συγκριτικά με τους μάρτυρες, οι ασθενείς τόσο με, όσο και χωρίς βιοχημική δραστηριότητα που δεν πήραν ποτέ θεραπεία παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα αλδευδών. Οι ασθενείς που συλλέχθηκε το δείγμα μετά τη διακοπή της θεραπείας δεν διέφεραν σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντίθετα, οι ασθενείς που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας παρουσίαζαν στατιστικώς υψηλότερα επίπεδα αλδευδών σε σχέση με τους μάρτυρες μόνο στην ομάδα των ασθενών που παρουσίαζε βιοχημική δραστηριότητα [0,8(0,25-15,8) vs 0,3(0,05-4,9), $p=0.004$].

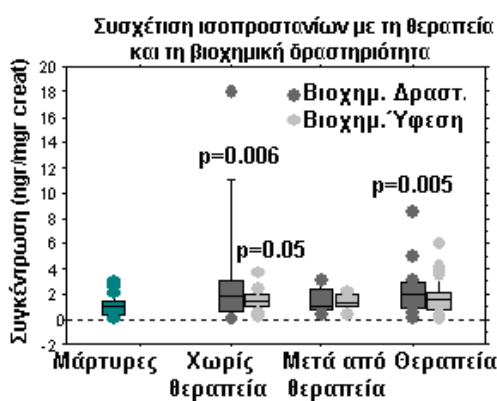


Πίνακας 52: Επίπεδα αλδευδών στο σύνολο των μη κίρρωτικών ασθενών ανάλογα με τη λήψη ή όχι θεραπείας και την παρουσία βιοχημικής δραστηριότητας. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Mann Whitney και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

	Χωρίς θεραπεία ($n=29$)	Μετά από θεραπεία ($n=18$)	Θεραπεία ($n=90$)	Μάρτυρες ($n=75$)
Σύνολο	1,6(0,18-13)****	0,8(0,19-3,3)***	0,85(0,1-16)***	0,3(0,05-4,9)
Χωρίς βιοχημική δραστηριότητα	1,3(0,25-3,8)**	0,7(0,2-3,3)	1(0,1-7)	
Βιοχημική δραστηριότητα	2,4(0,19-13)***	1,3(0,4-2,4)	0,8(0,1-16)***	

* $0.1 > p > 0.05$, ** $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.001$.

Ως αναφορά στα επίπεδα των ισοπροστανίων, οι ασθενείς που δεν είχαν λάβει ακόμη φαρμακευτική αγωγή παρουσίαζαν τάση αύξησης των επιπέδων τους σε σχέση με τους ασθενείς που ελάμβαναν θεραπεία ή σε σχέση με τους ασθενείς που μελετήθηκαν μετά τη διακοπή της θεραπείας (Διάγραμμα 36, Πίνακας 53). Οι ασθενείς αυτοί είχαν στατιστικά υψηλότερα επίπεδα ισοπροστανίων σε σχέση με τους μάρτυρες είτε βρισκόταν σε βιοχημική ύφεση είτε βρισκόταν σε βιοχημική δραστηριότητα (Πίνακας 53). Στους ασθενείς που ελέγχθηκαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας παρατηρήθηκε στατιστικώς υψηλότερη παραγωγή ισοπροστανίων σε σχέση με τους μάρτυρες, μόνο στους ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα. Οι ασθενείς που ελέγχθηκαν μετά το πέρας της θεραπείας δεν διέφεραν συγκριτικά με τους μάρτυρες.



Διάγραμμα 36: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα ισοπροστανίων ανάλογα με τη λήψη ή όχι θεραπείας και την παρουσία βιοχημικής δραστηριότητας στο σύνολο των μη κίρρωτικών ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Mann Whitney και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

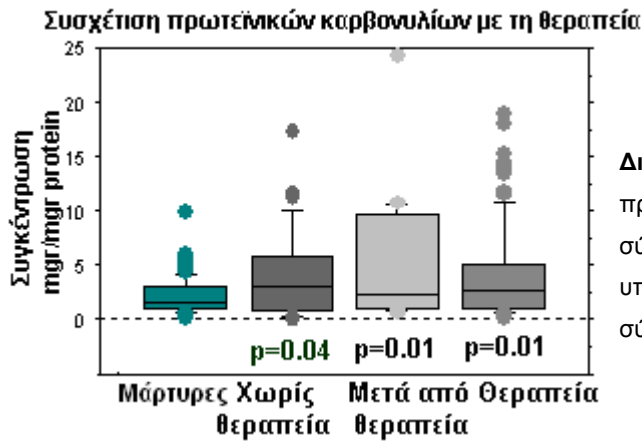
Πίνακας 53: Επίπεδα ισοπροστανίων σε μη κίρρωτικούς ασθενείς ανάλογα με τη λήψη ή όχι θεραπείας και την παρουσία βιοχημικής δραστηριότητας στο σύνολο των μη κίρρωτικών ασθενών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Mann Whitney και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

	Χωρίς θεραπεία v=29	Μετά από θεραπεία v=18	Θεραπεία v=90	Μάρτυρες v=75
Ισοπροστανία	1,5(0,01-18)***	1,3(0,4-3,2)	1,6(0,08-8,5)****	1(0,02-3)
Χωρίς βιοχημική δραστηριότητα	1,4(0,24-3,7)**	1,3(0,4-2,2)	1,5(0,08-5,9)	
Βιοχημική δραστηριότητα	1,8(0,01-18)***	0,9(0,4-3,2)	2(0,16-8,5)***	

*0.1>p>0.05, **p≤0.05, ***p≤0.01, ****p≤0.001.

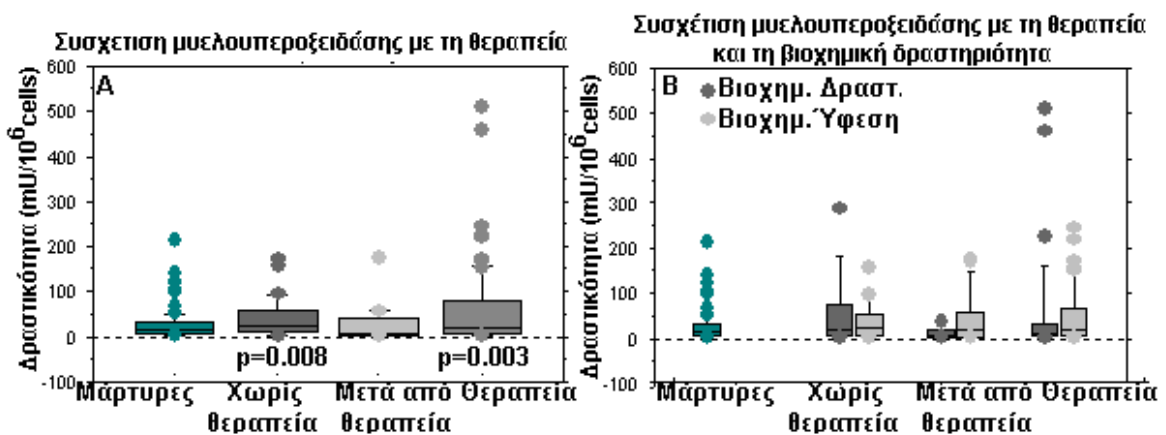
Ως προς τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, όλες οι υποκατηγορίες των ασθενών με βάση τη λήψη ή όχι θεραπείας διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες. Τα υψηλότερα επίπεδα παρατηρήθηκαν στους ασθενείς που μελετήθηκαν μετά τη θεραπεία [2,9(0,6-24) vs 1,6(0,1-10), p=0.01]. Ακολουθούν οι ασθενείς που δεν είχαν λάβει φαρμακευτική αγωγή [4(0,02-17) vs 1,6(0,1-

10), $p=0,04$] και οι ασθενείς που ελέγχθηκαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας [3(0,1-21) vs 1,6(0,1-10), $p=0,01$] (Διάγραμμα 37). Οι ασθενείς που ήταν μετά τη θεραπεία είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους ασθενείς που έπαιρναν θεραπεία [2,9(0,6-24) vs 3(0,1-21), $p=0,03$].



Διάγραμμα 37: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με τη θεραπεία, στο σύνολο των μη κίρρωτικών ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Ως προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη, την 8-υδροξυ-δεοξυγουανοσίνη και τη 3-νιτροτυροσίνη δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές με βάση τη λήψη ή όχι θεραπείας. Ως προς τη μυελοϋπεροξειδάση, οι ασθενείς που δεν είχαν λάβει ακόμη φαρμακευτική αγωγή [24(0,83-180) vs 11(1-214), $p=0,008$] και οι ασθενείς που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας [16(1-511) vs 11(1-214), $p=0,003$] είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 38A). Οι διαφορές αυτές αφορούσαν κυρίως τους ασθενείς που είχαν αυξημένους δείκτες ηπατικής βλάβης (Διάγραμμα 38B).



Διάγραμμα 38: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστικότητας MPO σε σχέση με τη φάση της θεραπείας (Διάγρ 38A) και την παρουσία βιοχημικής δραστηριότητας (Διάγρ 38B) στο σύνολο των μη κίρρωτικών ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

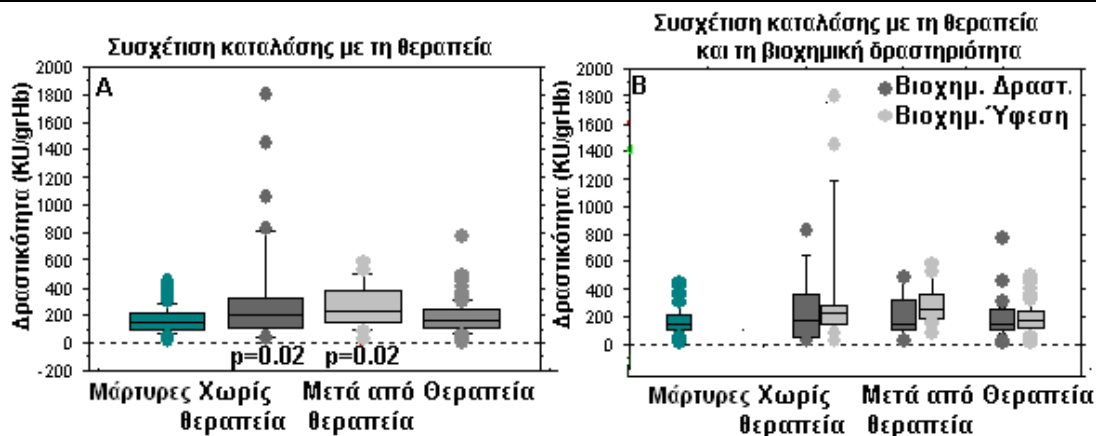
3.2.2. Συσχέτιση αντιοξειδωτικών παραγόντων με τη θεραπεία και την έκβαση της στο σύνολο των μη κίρρωτικών ασθενών.

Καταλάση και αναγωγή της γλουταθειόνης.

Ασθενείς που ελάμβαναν θεραπεία είχαν παρόμοια δραστικότητα σε σχέση με μάρτυρες. Αντίθετα, άτομα που δεν είχαν λάβει ποτέ θεραπεία και αυτοί που ελέγχθηκαν μετά το τέλος της θεραπείας είχαν σημαντικά υψηλότερη δραστικότητα σε σχέση με μάρτυρες (Πίνακας 54 και 55, Διάγραμμα 39 και 40).

Πίνακας 54: Επίπεδα δραστικότητας καταλάσης σε μη κίρρωτικούς ασθενείς ανάλογα με τη φάση της θεραπείας. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Mann Whitney και αναφέρονται στη σύγκριση των υποομάδων μεταξύ τους.

Ομάδες προς σύγκριση		
Χωρίς θεραπεία (n=29)	Μάρτυρες (n=75)	Τιμή p
205(26-1800)	141(21-449)	0.02
Μετά από θεραπεία (n=18)	Μάρτυρες (n=75)	
221(27-592)	141(21-449)	0.02
Χωρίς Θεραπεία (n=29)	Θεραπεία (n=90)	
205(26-1800)	156(4,7-771)	0.02
Μετά από θεραπεία (n=18)	Θεραπεία (n=90)	
221(27-592)	156(4,7-771)	0.02

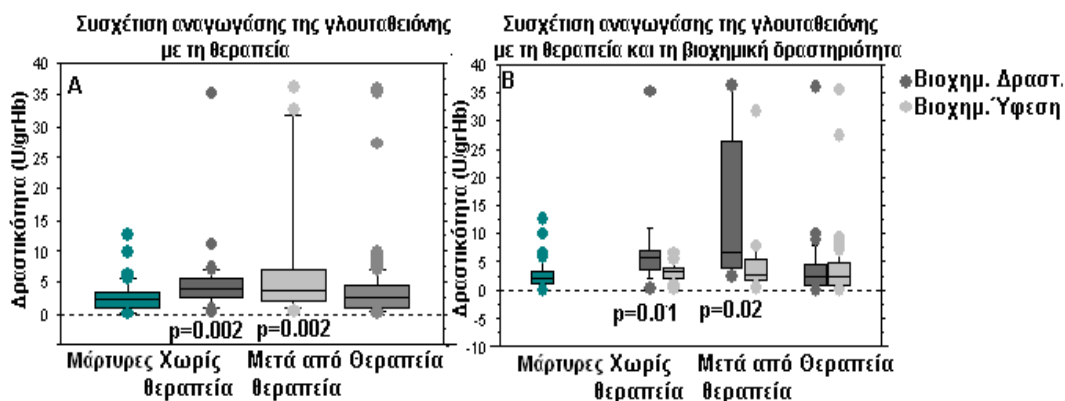


Διάγραμμα 39: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστικότητας καταλάσης σε σχέση με τη φάση της θεραπείας (Διάγρ 39A) και την παρουσία βιοχημικής δραστηριότητας (Διάγρ 39B) στο σύνολο των μη κίρρωτικών ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Ως αναφορά στην αναγωγή της γλουταθειόνης, οι σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες παρατηρήθηκαν στους ασθενείς που είχαν βιοχημική δραστηριότητα. Συγκρινόμενοι οι ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα που δεν είχαν λάβει ακόμη θεραπεία [5(0,5-35) vs 2,3(0,08-12), $p=0.01$] και οι ασθενείς που μελετήθηκαν μετά τη θεραπεία [7(2,5-36) vs 2,3(0,08-12), $p=0.02$] είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα αναγωγής της γλουταθειόνης σε σχέση με μάρτυρες (Διάγραμμα 40B). Αντίθετα, οι ασθενείς που βρισκόταν σε βιοχημική ύφεση είχαν παρόμοια επίπεδα δραστηριότητας αναγωγής της γλουταθειόνης σε σχέση με μάρτυρες, ανεξάρτητα από το αν ελάμβαναν ή όχι θεραπεία.

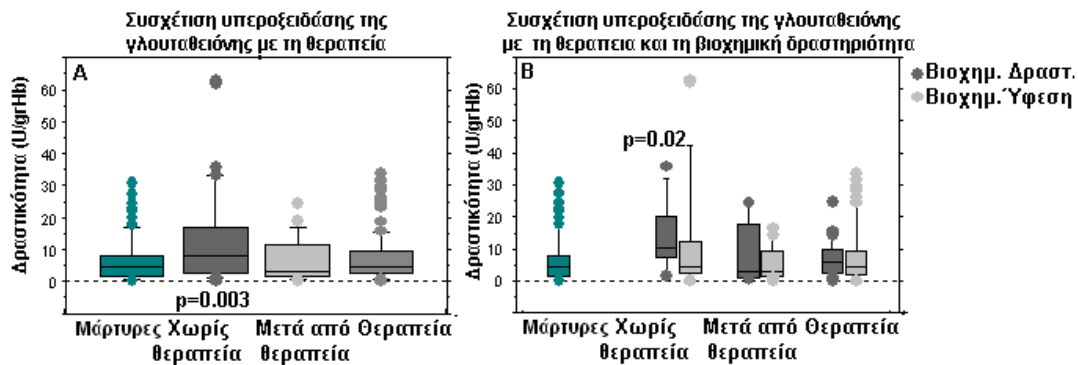
Πίνακας 55: Επίπεδα δραστηριότητας αναγωγής της γλουταθειόνης σε μη κίρρωτικούς ασθενείς ανάλογα με τη φάση της θεραπείας. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Mann Whitney και αναφέρονται στη σύγκριση των υποομάδων μεταξύ τους.

Ομάδες προς σύγκριση		Τιμή p
Χωρίς θεραπεία (n=29)	Μάρτυρες (n=75)	
3,9(0,5-35)	2,3(0,08-12)	0.02
Μετά από θεραπεία (n=18)	Μάρτυρες (n=75)	
3(0,3-36)	2,3(0,08-12)	0.002
Χωρίς Θεραπεία (n=29)	Θεραπεία (n=90)	
3,9(0,5-35)	2,5(0,08-36)	0.02
Μετά από θεραπεία (n=18)	Θεραπεία (n=90)	
3(0,3-36)	2,5(0,08-36)	0.01



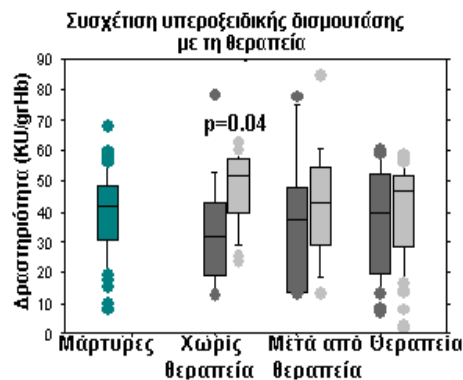
Διάγραμμα 40: Διάγραμμα «Whisker ή box»: Επίπεδα δραστηριότητας αναγωγής της γλουταθειόνης σε σχέση με τη φάση της θεραπείας (Διάγρ 40A) και την παρουσία βιοχημικής δραστηριότητας (Διάγρ 40B) στο σύνολο των μη κίρρωτικών ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Η δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς που δεν είχαν λάβει θεραπεία σε σχέση με τους μάρτυρες [7,7(0,6-63) vs 4,5(0,3-31), $p=0.003$] και σε σχέση με τους ασθενείς που λήφθηκε το δείγμα κατά τη διάρκεια της θεραπείας [7,7(0,6-63) vs 4,8(0,09-34), $p=0.03$] (Διάγραμμα 41).



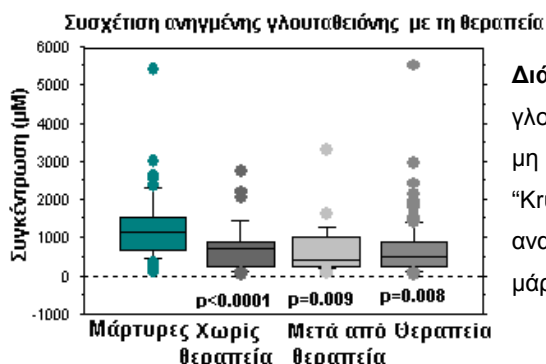
Διάγραμμα 41: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστικότητας υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης σε σχέση με τη φάση της θεραπείας (Διάγρ 41A) και την παρουσία βιοχημικής δραστηριότητας (Διάγρ 41B) στο σύνολο των μη κίρρωτικών ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA και αναφέρονται στη σύγκριση των επιμέρους ομάδων με τους μάρτυρες.

Η δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης δεν παρουσίαζε αξιοσημείωτες διαφορές σε σχέση με τη φάση της θεραπείας. Όταν όμως μελετήθηκε η δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης σε σχέση με το αν οι ασθενείς ήταν σε βιοχημική δραστηριότητα στα διάφορα στάδια της θεραπείας, τότε οι ασθενείς που δεν είχαν λάβει φαρμακευτική αγωγή και είχαν φυσιολογικούς δείκτες ηπατικής βλάβης είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη δραστικότητα σε σχέση με τους μάρτυρες [52(24-63) vs 42(8-68), $p=0.04$]. Σε όλες τις φάσεις της θεραπείας, η ομάδα των ασθενών που είχε φυσιολογικούς δείκτες ηπατικής βλάβης παρουσίαζε ήπια αύξηση της διαμέσου τιμής της δραστικότητας, σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντίθετα, οι ασθενείς που είχαν αυξημένους δείκτες ηπατικής βλάβης παρουσίαζαν τάση μείωσης της διαμέσου της δραστικότητας σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 42).



● Βιοχημ. Δραστ.
● Βιοχημ. Ύφεση
Διάγραμμα 42: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Σύγκριση της δραστηριότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης ανάλογα με τη λήψη ή όχι θεραπείας και την παρουσία βιοχημικής δραστηριότητας στο σύνολο των μη κίρρωτικών ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Ως προς την ανηγμένη γλουταθειόνη, όλες οι ομάδες των ασθενών διέφεραν σημαντικά από τους μάρτυρες ανεξάρτητα από το αν ελάμβαναν θεραπεία ή όχι (Διάγραμμα 43). Τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τόσο στους ασθενείς που ήταν σε βιοχημική ύφεση όσο και στους ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα (Πίνακας 56).



Διάγραμμα 43: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης σε σχέση με τη φάση της θεραπείας στο σύνολο των μη κίρρωτικών ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Πίνακας 56: Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης σε μη κίρρωτικούς ασθενείς ανάλογα με τη φάση της θεραπείας και τη βιοχημική δραστηριότητα. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Mann Whitney και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

	Χωρίς θεραπεία (v=29)	Μετά από Θεραπεία (v=18)	Θεραπεία (v=90)	Μάρτυρες (v=75)
Ανηγμένη γλουταθειόνη	703(18-2743)****	420(72-3287)***	499(4-5541)***	1101 (91-5409)
Βιοχημική ύφεση	703(18-2206)	420(72-3287)	420(72-3287)	
Βιοχημική δραστηρ.	579 (132-2743)	532 (193-1029)	529 (49-5541)	

*0.1>p>0.05, **p≤0.05, ***p≤0.01, ****p≤0.001.

3.3. Επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες σε σχέση με την κίρρωση.

3.3.1. Συσχέτιση προϊόντων οξειδωτικής βλάβης σε σχέση με την κίρρωση.

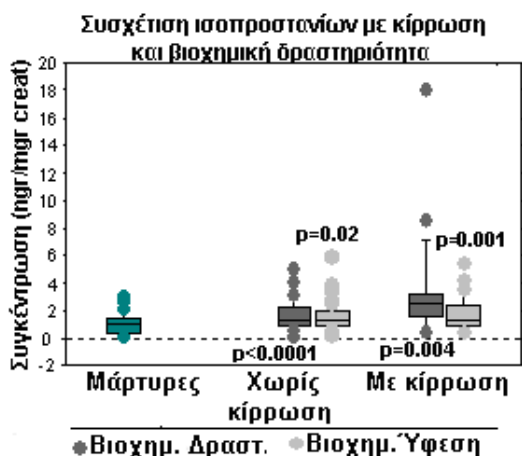
Τα επίπεδα των προϊόντων οξειδωτικής βλάβης ανάλογα με την παρουσία ή όχι κίρρωσης και βιοχημικής δραστηριότητας παρουσιάζονται στον Πίνακα 57. Οι ασθενείς που είχαν κίρρωση, παρουσίαζαν αύξηση των επιπέδων των ισοπροστανίων (Διάγραμμα 44), των αλδευδών (Διάγραμμα 45), των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Διάγραμμα 46), της 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνης και της οξειδωμένης γλουταθειόνης (Διάγραμμα 47) σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς και τους μάρτυρες. Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ κίρρωτικών και μη κίρρωτικών παρατηρήθηκε μόνο στα επίπεδα των ισοπροστανίων [1,8(0,38-18) vs 1,3(0,01-16), $p=0.04$]. Η δραστικότητα της MPO ήταν σημαντικά υψηλότερη στους μη κίρρωτικούς σε σχέση με τους μάρτυρες [19(0,8-511) vs 11(1-214), $p=0.007$]. Αντίθετα, οι κίρρωτικοί δεν διέφεραν από τους μάρτυρες.

Ως αναφορά τα προϊόντα λιπιδικής υπεροξειδωσης, τόσο οι κίρρωτικοί όσο και οι μη κίρρωτικοί παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με μάρτυρες ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι βιοχημικής δραστηριότητας (Διάγραμμα 44, 45B, Πίνακας 57). Ως προς τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και την οξειδωμένη γλουταθειόνη, τόσο οι κίρρωτικοί όσο και οι μη κίρρωτικοί παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με μάρτυρες (Διάγραμμα 46, 47A, Πίνακας 57). Ως προς τη 3-νιτροτυροσίνη δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές, ενώ στην 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνη παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση σε σχέση με τους μάρτυρες, μόνο στους κίρρωτικούς [7,5(3,9-80) vs 6(0,6-46), $p=0.004$].

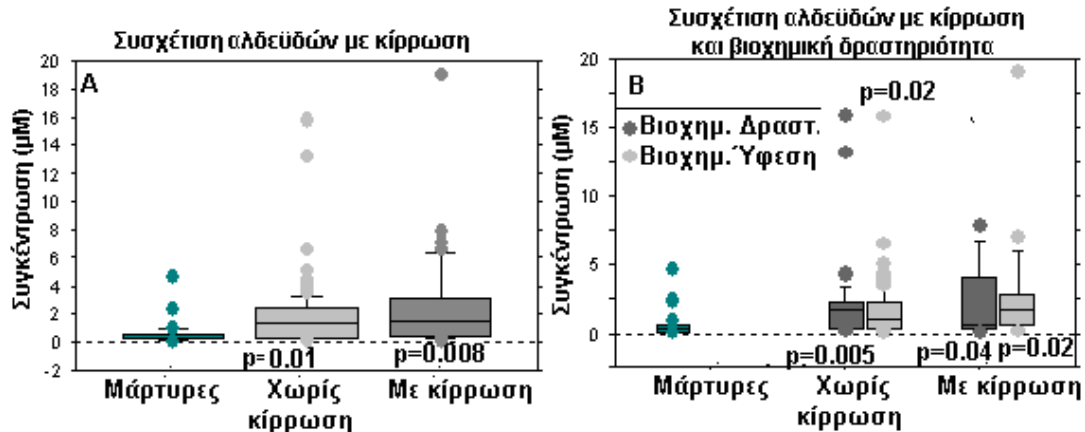
Πίνακας 57: Προϊόντα οξειδωτικής βλάβης σε σχέση με την παρουσία ή όχι κίρρωσης και βιοχημικής δραστηριότητας, στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney και ANOVA και αναφέρεται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

	Ασθενείς με κίρρωση (v=59)	Ασθενείς χωρίς κίρρωση (v=186)	Μάρτυρες (v=75)
Αλδεΐδες	1,4(0,1-19)***	1,3(0,01-16)***	0,3(0,05-4,9)
Βιοχημική ύφεση	1,5(0,1-19)**	0,9(0,1-16)**	
Βιοχημική δραστηριότητα	0,3(0,2-7,5)**	1,6(0,15-16)***	
Ισοπροστανία	1,8(0,38-18)****	1,3(0,01-6)****	1(0,02-3)
Βιοχημική ύφεση	0,9(0,4-5,4)****	1,3(0,07-6)**	
Βιοχημική δραστηριότητα	2,6(0,38-18)***	1,3(0,01-5)****	
Πρωτεϊνικά καρβονύλια	3,4(0,16-21)****	3(0,02-24)****	1,6(0,1-10)
Βιοχημική ύφεση	2,8(0,16-21)	3(0,07-24)	
Βιοχημική δραστηριότητα	3,4(0,3-21)	2,5(0,02-19)	
3-Νιτροτυροσίνη	5(1-60)	9(1-100)	10(1,5-20)
Βιοχημική ύφεση	10(1,5-60)	7(1-91)	
Βιοχημική δραστηριότητα	5(1-40)	17(1,9-100)	
Μυελουπεροξειδάση	15(1-357)	19(0,8-511)***	11(1-214)
Βιοχημική ύφεση	18(1,3-289)	20,5(1,06-244)***	
Βιοχημική δραστηριότητα	9,8(1-355)	12(0,83-511)	
Οξειδωμένη γλουταθειόνη	11(0,09-100)****	10(0,1-100)***	4,9(0,1-49)
Βιοχημική ύφεση	21(0,89-100)****	12(0,1-91)**	
Βιοχημική δραστηριότητα	8,6(0,09-98)****	7,3(0,14-100)**	
8-υδρόξυ-δεοξυγουανασίνη	17,5(3,9-80)***	15(0,1-60)	6(0,6-46)
Βιοχημική ύφεση	12(4,1-80)	15(0,8-60)	
Βιοχημική δραστηριότητα	28,5(3,9-58)	13(0,1-31)	

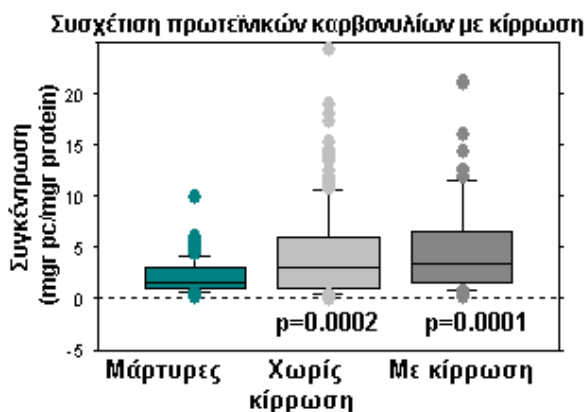
*0.1>p>0.05, **p≤0.05, ***p≤0.01, ****p≤0.001.



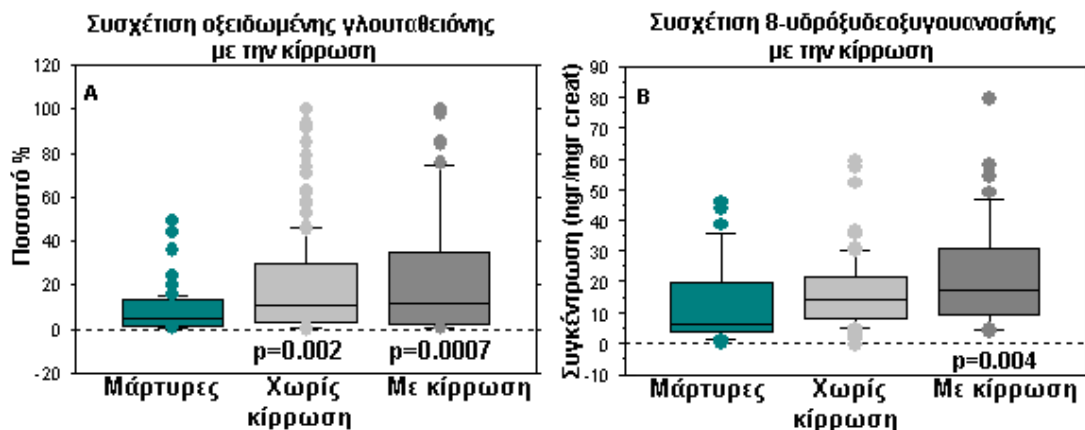
Διάγραμμα 44: Διάγραμμα «Whisker ή box». Επίπεδα των ισοπροστανίων ανάλογα με την παρουσία κίρρωσης και βιοχημικής δραστηριότητας στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.



Διάγραμμα 45: Διάγραμμα «Whisker ή box»: Επίπεδα αλδευδών ανάλογα με την παρουσία κίρρωσης (Διάγρ. 45A) και βιοχημικής δραστηριότητας (Διάγρ. 45B) στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.



Διάγραμμα 46: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με την παρουσία κίρρωσης στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.



Διάγραμμα 47: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα ποσοστού οξειδωμένης γλουταθειόνης (Διάγρ.47A) και 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνης (Διάγρ. 47B) σε σχέση με την παρουσία κίρρωσης στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.

3.3.2. Συσχέτιση αντιοξειδωτικών παραγόντων με την κίρρωση.

Τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών παραγόντων ανάλογα με την παρουσία ή όχι κίρρωσης και βιοχημικής δραστηριότητας σε σύγκριση με αυτά των μαρτύρων παρουσιάζονται στο Πίνακα 58. Αναλυτικότερα παρατηρήθηκε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς [373(3-2966) vs 517(4-5541), $p=0.01$] (Διάγραμμα 48). Στους κίρρωτικούς παρατηρήθηκε ήπια μείωση στη δραστικότητα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (Διάγραμμα 49A), της καταλάσης (Διάγραμμα 50A) και της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγραμμα 50B) σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς (Διάγραμμα 49B).

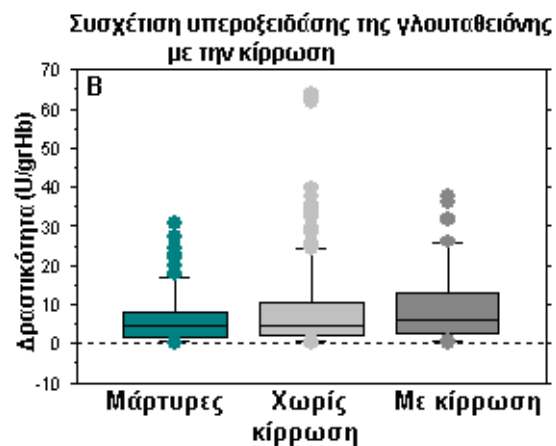
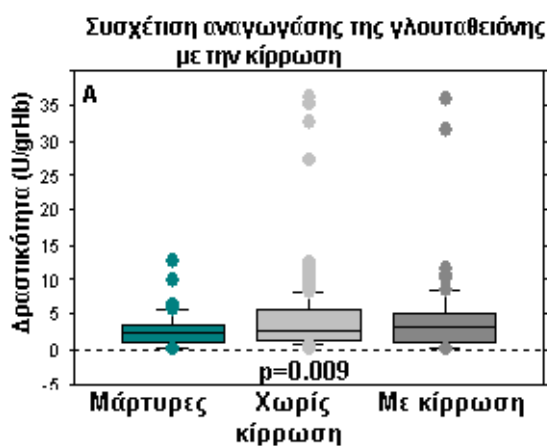
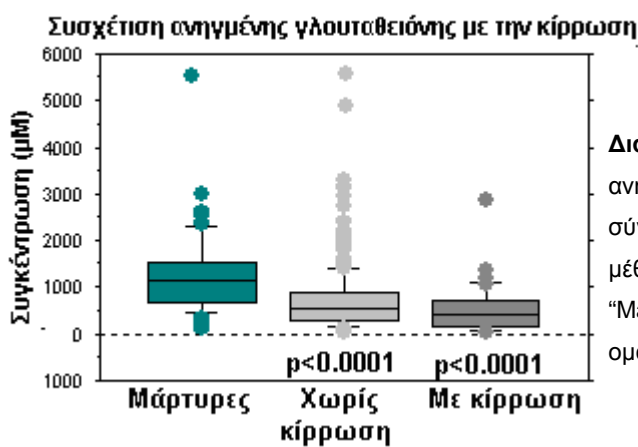
Πίνακας 58: Επίπεδα παραγόντων αντιοξειδωτικής άμυνας σε σχέση με την παρουσία ή όχι κίρρωσης και βιοχημικής δραστηριότητας, στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

	Ασθενείς με κίρρωση (n=59)	Ασθενείς χωρίς κίρρωση (n=186)	Μάρτυρες (n=75)
Ανηγμένη γλουταθειόνη	373(3-2966) ^{****}	517(4-5541) ^{****}	1101(91-5409)
Βιοχημική ύφεση	462(5,7-1362) ^{****}	491(3,9-3286) ^{****}	
Βιοχημική δραστηριότητα	259(3-2966) ^{****}	602(48-5541) ^{****}	
Καταλάση	169(4,7-1554)	185(1,9-1800) ^{***}	141(21-449)
Βιοχημική ύφεση	192(15-1455) [*]	186(1,9-1800) ^{***}	
Βιοχημική δραστηριότητα	145(4,8-1554)	150(21-833)	
Υπεροξειδική δισμουτάση	43(1,2-60)	48(2,1-117) ^{**}	42(8-68)
Βιοχημική ύφεση	41(1,2-59)	49(2,1-116)	
Βιοχημική δραστηριότητα	45(13-60)	47(7-117)	
Αναγωγάση της γλουταθειόνης	3,3(0,08-36)	2,7(0,07-36) ^{***}	2,3(0,08-12)
Βιοχημική ύφεση	2,7(0,2-32)	2,6(0,07-35) ^{**}	
Βιοχημική δραστηριότητα	3,2(0,08-36)	2,8(0,08-36) ^{***}	
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	6,1(0,24-38) [*]	4,7(0,09-64)	4,5(0,3-31)
Βιοχημική ύφεση	5,9(0,24-38)	4,3(0,09-63)	
Βιοχημική δραστηριότητα	8,7(0,7-32)	5,9(0,43-64)	

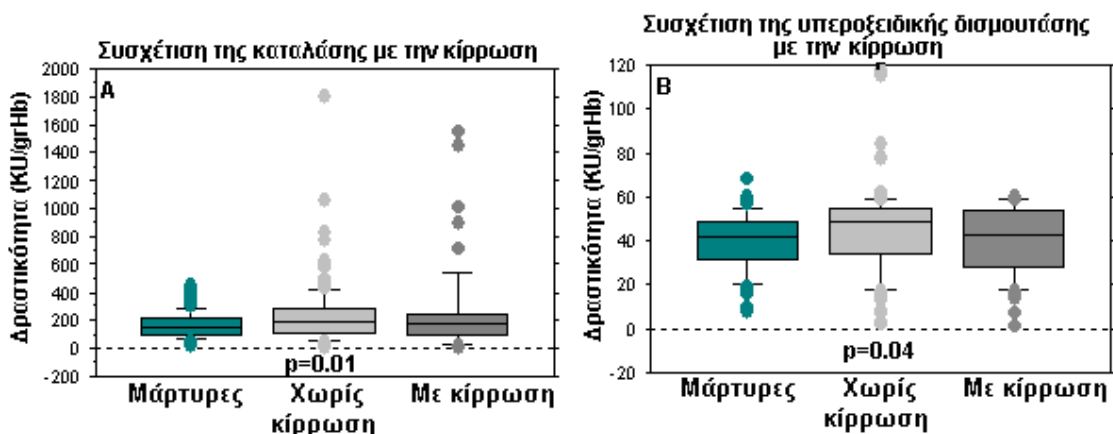
^{*}0.1> p >0.05, ^{**} p ≤0.05, ^{***} p ≤0.01, ^{****} p ≤0.001.

Στα αντιοξειδωτικά ένζυμα τόσο στους ασθενείς με βιοχημική ύφεση όσο και στους ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα παρατηρήθηκε μείωση του εύρους της δραστικότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς με εξαίρεση την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Πίνακας 58). Η ανηγμένη γλουταθειόνη ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους κίρρωτικούς και στους μη κίρρωτικούς σε σχέση με τους μάρτυρες, ανεξάρτητα

από το αν οι ασθενείς είχαν αυξημένους δείκτες ηπατικής βλάβης ή όχι. Στους ασθενείς που είχαν αυξημένους δείκτες ηπατικής βλάβης, η διάμεσος τιμή της ανηγμένης γλουταθειόνης ήταν μειωμένη κατά 56% στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς [259(3-2966) vs 602(48-5541), $p=0.007$]. Αντίθετα, στους ασθενείς που είχαν φυσιολογικούς δείκτες ηπατικής βλάβης, η διάμεσος τιμή της ανηγμένης γλουταθειόνης ήταν ελάχιστα μειωμένη, ενώ το εύρος ήταν αισθητά μειωμένο, στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς [462(517-1362) vs 491(3,9-3286), $p=0.3$].



Διάγραμμα 49: Διάγραμμα «Whisker ή box»: Επίπεδα δραστηκότητας αναγωγότητας της γλουταθειόνης (Διάγρ. 49A) και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Διάγρ. 49B) στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.

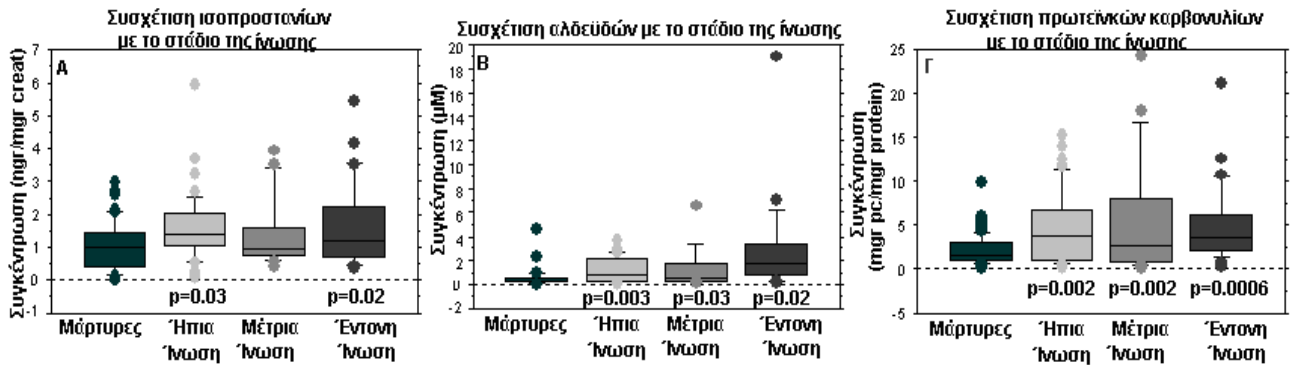


Διάγραμμα 50: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστηριότητας καταλάσης (Διάγρ. 50A) και υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγρ. 50B) στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.

3.4.Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικών στρες με τα ιστοπαθολογοανατομικά ευρήματα στο σύνολο των ασθενών.

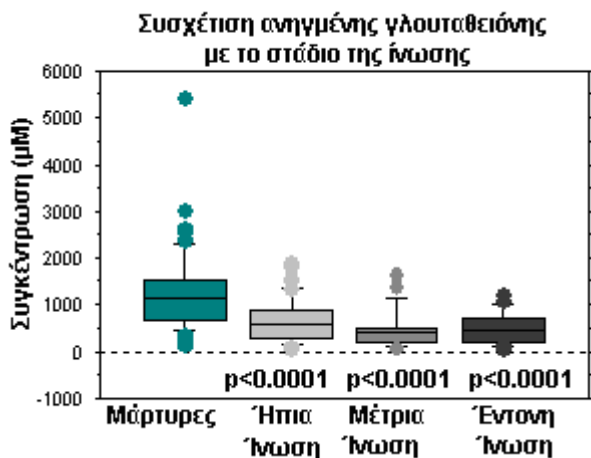
3.4.1. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με το στάδιο της ίνωσης στο σύνολο των ασθενών.

Το στάδιο της ίνωσης ελέγχθηκε στους ασθενείς που είχαν φυσιολογικούς δείκτες ηπατικής βλάβης, γιατί όπως αναφέρθηκε στις προηγούμενες ενότητες, η παρουσία βιοχημικής δραστηριότητας επιδρά στους δείκτες οξειδωτικής βλάβης και στην αντιοξειδωτική άμυνα. Ως αναφορά στα πρωτεϊνικά καρβονύλια και στα ισοπροσάνια, τα υψηλότερα επίπεδα παρατηρήθηκαν στους ασθενείς που είχαν έντονη ίνωση (Πίνακας 59). Οι ασθενείς με ήπια και μέτρια ίνωση συνέχιζαν να έχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων και αλδευδών σε σχέση με τους μάρτυρες, αλλά δεν διέφεραν μεταξύ τους. Ως προς τις αλδεϋδες, οι ασθενείς που είχαν έντονη ίνωση είχαν στατιστικώς σημαντική υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν μέτρια ίνωση [1,8(0,17-19) vs 0,54(0,16-6,5), $p=0.02$] και σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν ήπια ίνωση [1,8(0,17-19) vs 0,7(0,12-3,8), $p=0.002$] (Διάγραμμα 51).



Διάγραμμα 51: Διαγράμματα «Whisker ή box»: Επίπεδα προϊόντων οξειδωτικής βλάβης λιπιδίων (Διάγρ. 51A, 51B) και πρωτεϊνών (Διάγρ. 51Γ) στα διάφορα στάδια της ίνωσης στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεϋδες και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τα ισοπροστανίνα και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Ως αναφορά στα αντιοξειδωτικά ένζυμα, οι μόνες σημαντικές διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν στην ανηγμένη γλουταθειόνη που ήταν σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τους υγιείς σε όλα τα στάδια της ίνωσης. Το επίπεδο της ανηγμένης γλουταθειόνης μειωνόταν παράλληλα με την αύξηση του σταδίου της ίνωσης (Διάγραμμα 52).



Διάγραμμα 52: Διαγράμματα “Whisker ή box”: Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης στα διάφορα στάδια της ίνωσης στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.

Πίνακας 59: Επίπεδα προϊόντων οξειδωτικής βλάβης και αντιοξειδωτικών παραγόντων σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης, στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεΐδες, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και τη 3-νιτροτυροσίνη και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τους υπόλοιπους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

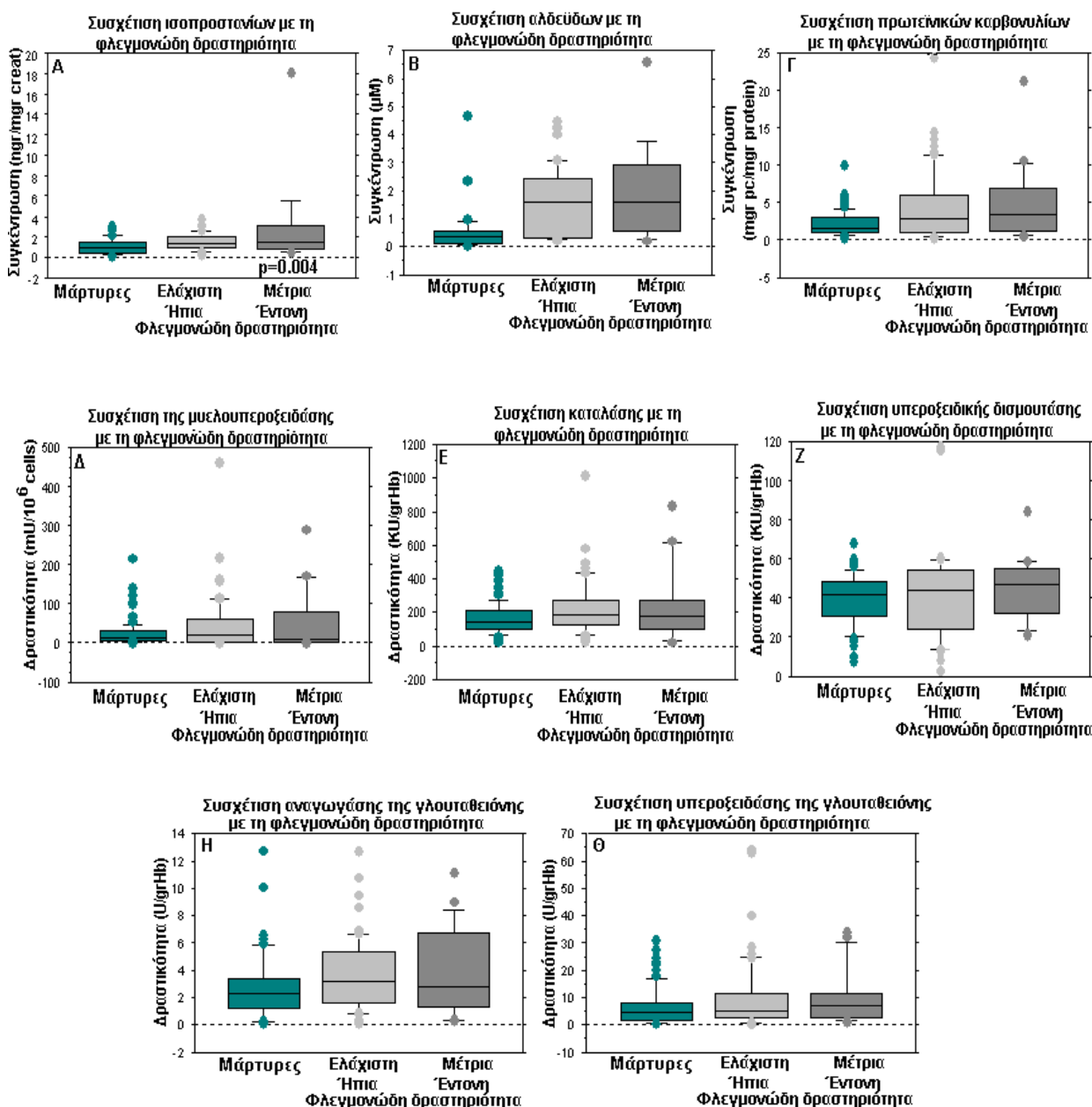
	Ήπια ίνωση (n=56)	Μέτρια ίνωση (n=19)	Έντονη ίνωση (n=38)	Μάρτυρες (n=75)
Ισοπροστάνια	1,4(0,08-5,9)**	1(0,4-3,9)	1,3(0,36-5,4)**	1(0,02-3)
Αλδεΐδες	0,7(0,12-3,8)***	0,5(0,16-6,5)**	1,8(0,17-19)**	0,3 (0,05-4,9)
Πρωτεϊνικά Καρβονύλια	3,7(0,24-15)***	2,6(0,14-24)***	3,5(0,27-21)****	1,6(0,1-10)
3-Νιτροτυροσίνη	14(0,1-93)	15(0,1-40)	10(0,1-60)	10(0,1-20)
Μυελουπεροξειδάση	24(1,5-220)	8,4(1,3-155)	11,9(1-355)	11,4 (1-214)
8-υδροξύ δεοξυγουανοσίνη	15(0,1-60)	8(0,1-35)	17(5-80)	6(0,6-40)
Οξειδωμένη Γλουταθειόνη/ολική	10,4(0,1-91)	10,2(0,2-62)	9,2(0,09-98)	4,9(0,1-49)
Ανηγγμένη γλουταθειόνη	535(3,9-1871)****	431(47-1611)****	430(5,7-1362)****	1101 (91-5409)
Καταλάση	162(11-494)	179(63-593)	188(15,5-1455)**	141 (21-449)
Υπεροξειδική δισμουτάση	47(2-61)	46(18-84)	42(1,2-59)	42(8-68)
Υπεροξειδάση της γλουταθειονης	4,3(0,2-63)	3,2(0,36-12)	5,9(0,24-37,9)	4,5(0,3-31)
Αναγωγή της γλουταθειονης	2,6(0,07-9,5)	3,7(0,1-8,8)	2,4(0,16-31,6)	2,3 (0,08-12)

*0.1>p>0.05, **p≤0.05, ***p≤0.01, ****p≤0.001.

3.4.2. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη φλεγμονώδη δραστηριότητα στο σύνολο των ασθενών.

Ως αναφορά τη φλεγμονώδη δραστηριότητα στο ήπαρ, οι ασθενείς κατατάχθηκαν στις παρακάτω ομάδες. Σε ασθενείς με ελάχιστη/ήπια φλεγμονώδη δραστηριότητα και σε αυτούς που είχαν μέτρια/έντονη φλεγμονώδη δραστηριότητα. Μελετήθηκαν μόνο οι ασθενείς που η πρόσφατη βιοψία τους δεν απέιχε αρκετό χρονικό διάστημα από την ημερομηνία συλλογής του δείγματος. Εβδομήντα πέντε ασθενείς στο σύνολο των 245 πληρούσαν τις παραπάνω προϋποθέσεις (57 με ελάχιστη/ήπια φλεγμονώδη δραστηριότητα και 18 με μέτρια/έντονη φλεγμονώδη δραστηριότητα). Στο σύνολο των ασθενών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ αυτών των 2 ομάδων. Συγκριτικά με τους μάρτυρες, παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ισοπροστανίων [1,4(0,36-18) vs 1(0,02-3), p=0.004] στους ασθενείς με μέτρια/έντονη δραστηριότητα. Επίσης παρατηρήθηκε τάση αύξησης στην ομάδα των ασθενών που είχε

μέτρια/έντονη δραστηριότητα, στα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης και στη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Διάγραμμα 53).



Διάγραμμα 53: Διαγράμματα «Whisker ή box»: Επίπεδα προϊόντων οξειδωτικής βλάβης λιπιδίων (Διάγρ. 53A, 53B) και πρωτεϊνών (Διάγρ. 53Γ), δραστικότητας MPO (Διάγρ. 53Δ) και αντιοξειδωτικών ενζύμων (Διάγρ. 53 Ε,Ζ,Η,Θ), σε σχέση με το βαθμό της φλεγμονώδους δραστηριότητας στο σύνολο των ασθενών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεύδες και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τους υπόλοιπους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

4. Επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες στις ιογενείς ηπατίτιδες.

Επιλέχθηκαν 96 ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες (49 ασθενείς είχαν χρόνια ηπατίτιδα Β και 47 ασθενείς είχαν χρόνια ηπατίτιδα C). Οι ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες είχαν υψηλότερα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης και υψηλότερη δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων σε σχέση με τους μάρτυρες. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με μάρτυρες παρατηρήθηκαν στα ισοπροσάνια [1,2(0,24-18) vs 1(0,02-3), $p=0.01$], στις αλδεΐδες [0,8(0,16-15,8) vs 0,3(0,05-4,9), $p<0.0001$], στα πρωτεϊνικά καρβονύλια [3(0,06-24) vs 1,6(0,1-10), $p=0.009$], στην MPO [18(0,8-289) vs 11,4(1-214), $p=0.05$], στην ανηγμένη γλουταθειόνη [500(21-3286) vs 1101 (91-5409), $p<0.0001$], στην καταλάση [167(7-1800) vs 141(21-449), $p=0.0009$] και στην αναγωγή της γλουταθειόνης [3,8(0,08-35) vs 2,3(0,08-12), $p=0.0005$].

Οι ασθενείς με ηπατίτιδα C είχαν υψηλότερα επίπεδα στους περισσότερους δείκτες σε σχέση με τους ασθενείς με ηπατίτιδα Β. Σημαντικές διαφορές μεταξύ ασθενών με ηπατίτιδα C και Β παρατηρήθηκαν στις αλδεΐδες [0,5(0,2-16) vs 1,4(0,3-5), $p=0.04$], στη 3-νιτροτυροσίνη [4,8(0,2-90) vs 4,6(0,06-39), $p=0.05$], στην MPO [32(0,8-280) vs 12(1-222), $p=0.03$], στην υπεροξειδική δισμουτάση [39(2-85) vs 46(3-62), $p=0.05$], στην αναγωγή της γλουταθειόνης [4,2(0,09-35) vs 3,1(0,17-12), $p=0.03$] και στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης [6,7(0,2-62) vs 3,1(0,2-33), $p=0.005$].

4.1. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τα εργαστηριακά ευρήματα στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες.

4.1.1. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με την παρουσία ενεργού ιικού πολλαπλασιασμού στους μη κίρρωτους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες.

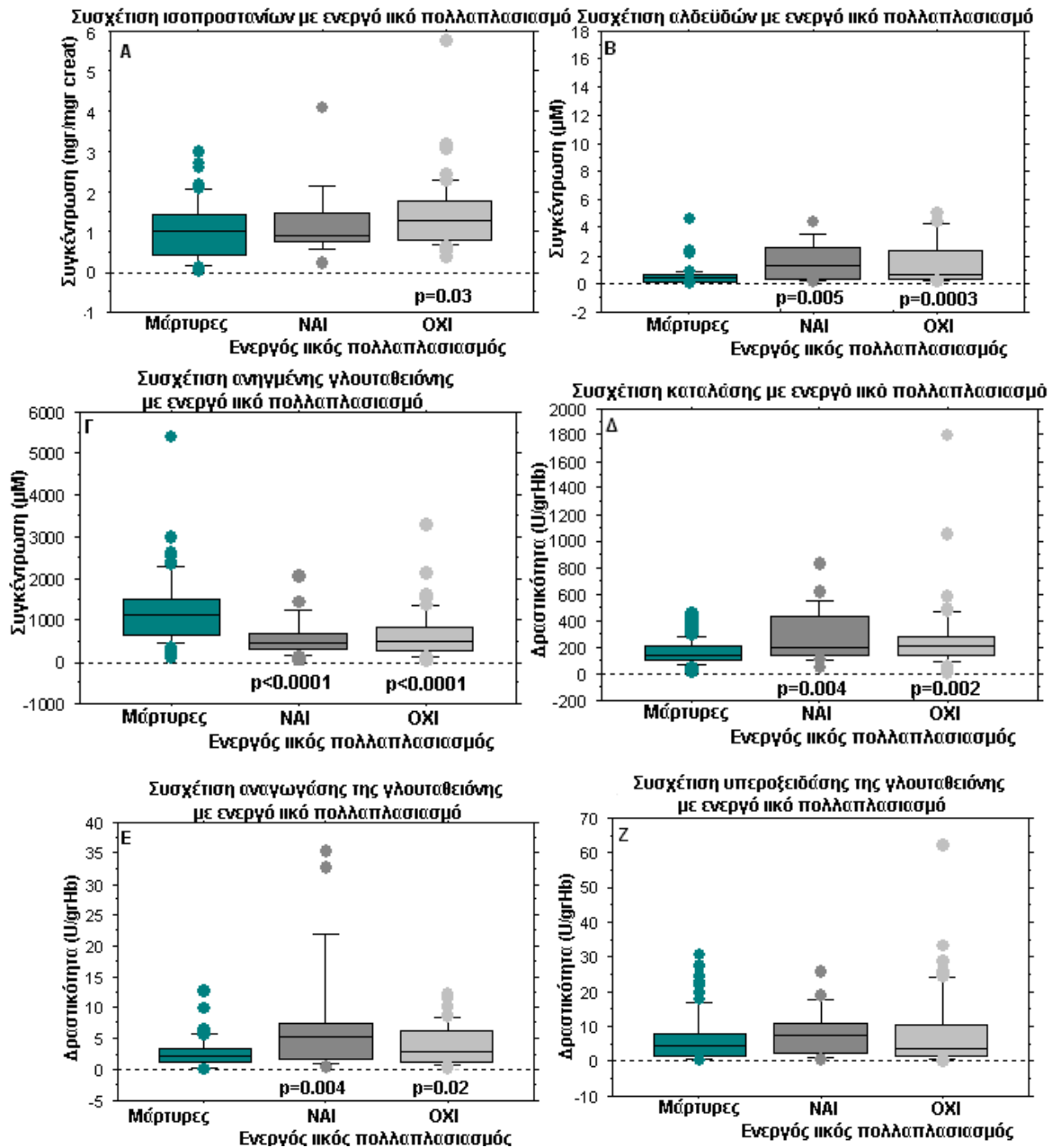
Η συσχέτιση των εργαστηριακών ευρημάτων με τους δείκτες οξειδωτικού στρες ελέγχθηκε μόνο στους μη κίρρωτους γιατί η κίρρωση επιδρά αρνητικά στη δραστικότητα των περισσότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Στη σύγκριση των ασθενών με ενεργό ιικό πολλαπλασιασμό ($n=20$) με τους ασθενείς που δεν είχαν ($n=56$) δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά σε καμία παράμετρο. Οι ασθενείς που είχαν ενεργό ιικό πολλαπλασιασμό (12 HCV, 8

HBV) είχαν υψηλότερη δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, αναγωγή της γλουταθειόνης, καταλάση) και χαμηλότερη ανηγμένη γλουταθειόνη σε σχέση με τους ασθενείς που δεν είχαν ενεργό ιικό πολλαπλασιασμό (31 HCV, 25 HBV) (Διάγραμμα 54, Πίνακας 60). Δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές, ως προς τα επίπεδα της υπεροξειδικής δισμουτάσης και των προϊόντων οξειδωτικής βλάβης μεταξύ των δυο ομάδων των ασθενών. Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στη σύγκριση των επιμέρους ομάδων με τους μάρτυρες. Αναλυτικότερα, τα επίπεδα των αλδεϊδών (Διάγραμμα 54B), της ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγραμμα 54Γ), της καταλάσης (Διάγραμμα 54Δ), της αναγωγής (Διάγραμμα 54E) και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Διάγραμμα 54Z) ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τους μάρτυρες, τόσο στους ασθενείς που είχαν όσο και στους ασθενείς που δεν είχαν ενεργό ιικό πολλαπλασιασμό.

Πίνακας 60: Επίπεδα προϊόντων οξειδωτικής βλάβης και αντιοξειδωτικών παραγόντων σε σχέση με την παρουσία ή όχι ενεργού ιικού πολλαπλασιασμού, στους μη κίρρωτικούς ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεΐδες, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και την 3-νιτροτυροσίνη και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τους υπόλοιπους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

	Ενεργός ιικός Πολλαπλασιασμός (v=20)	Μη ενεργός ιικός πολλαπλασιασμός (v=56)	Μάρτυρες (v=75)
Ισοπροστάνια	0,9(0,24-4,1)	1,3(0,4-5,7)**	1(0,2-3)
Αλδεΐδες	1,3(0,2-4,4)***	1,1(0,2-5,1)****	0,3(0,05-4,9)
Πρωτεϊνικά Καρβονύλια	2,7(0,2-17)	3,3(0,06-24)	1,6(0,1-10)
3-Νιτροτυροσίνη	5,6(3,2-72)	5,5(1-92)	10(0,1-20)
8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνη	9,8(4,6-36)	13(4,6-80)	6(0,6-46)
Μυελουπεροξειδάση	9,1(0,83-173)	21(1-222)	11,4(1-214)
Οξειδωμένη Γλουταθειόνη/ολική	6,1(0,6-100)	11(0,1-57)	4,9(0,1-49)
Ανηγμένη γλουταθειόνη	473(35-2076)****	500(21-3287)****	1101(91-5409)
Καταλάση	201(56-833)***	197(6,8-1800)***	141(21-449)
Υπεροξειδική δισμουτάση	40(13-78)	43(2,6-85)	42(8-68)
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	8(0,6-25)	2,5(0,18-62)	4,5(0,3-31)
Αναγωγή της γλουταθειόνης	5(0,51-35)***	3(0,08-12,5)**	2,3(0,08-12)

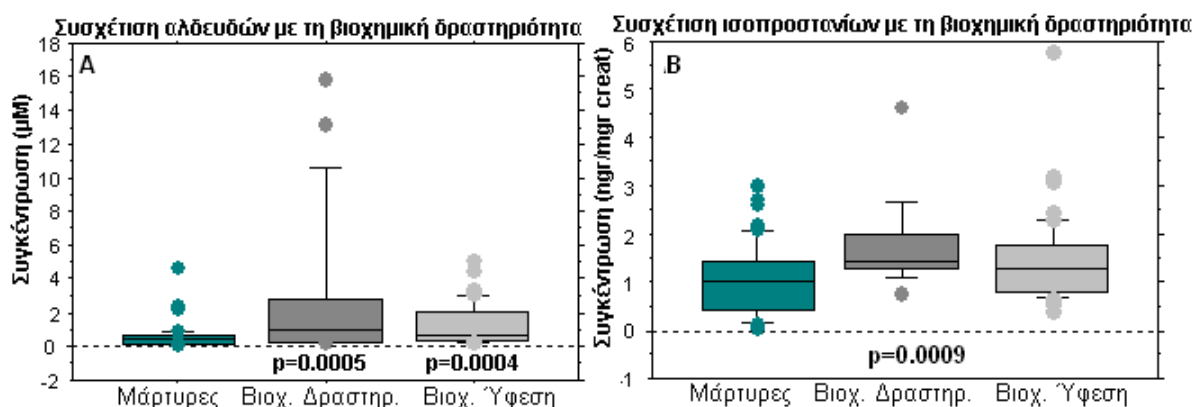
*0.1>p>0.05, **p≤0.05, ***p≤0.01, ****p≤0.001.



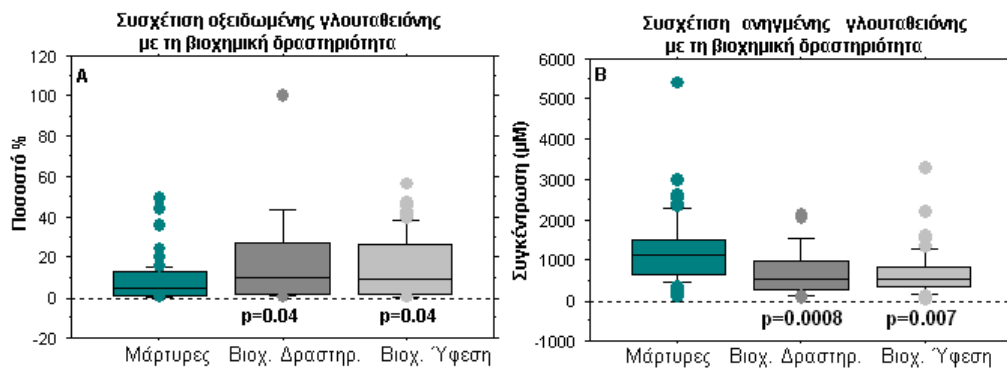
Διάγραμμα 54: Διαγράμματα «Whisker ή box»: Επίπεδα προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης (Διάγρ. 54A, 54B), ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγρ. 54Γ) και δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων (Διάγρ. 54 Δ, Ε, Ζ) σε σχέση με την παρουσία ή όχι ενεργού ιικού πολλαπλασιασμού, στους μη κίρρωτικούς ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεύδες και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τους υπόλοιπους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

4.1.2. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με δείκτες ηπατικής βλάβης στους μη κίρρωτικούς ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες.

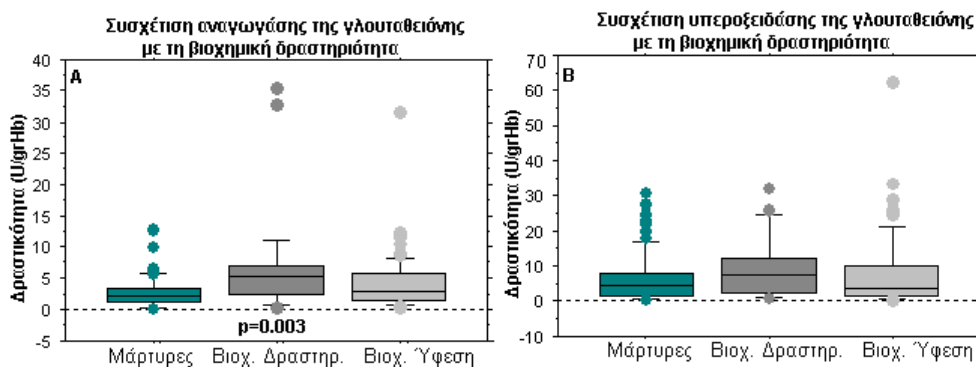
Οι ασθενείς που είχαν βιοχημική δραστηριότητα (n=28) είχαν περισσότερα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης (αλδεΐδες, ισοπροστανία) (Διάγραμμα 55), υψηλότερα επίπεδα οξειδωμένης γλουταθειόνης και χαμηλότερα ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγραμμα 56), αυξημένη δραστικότητα αναγωγάσης και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Διάγραμμα 57) και μειωμένη δραστικότητα καταλάσης και υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγραμμα 58) σε σχέση με τους ασθενείς που ήταν σε βιοχημική ύφεση (n=74). Η υπεροξειδική δισμουτάση ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους ασθενείς που βρισκόταν σε βιοχημική δραστηριότητα σε σχέση με τους ασθενείς που παρουσίαζαν βιοχημική ύφεση [34(7-78) vs 45(2-84), p=0.004] και σε σχέση με τους μάρτυρες [34(7-78) vs 42(8-68), p=0.02] (Διάγραμμα 58B). Στις υπόλοιπες παραμέτρους δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ ασθενών με βιοχημική δραστηριότητα και βιοχημική ύφεση. Συγκριτικά με τους μάρτυρες, τα επίπεδα των αλδεϋδών και της οξειδωμένης γλουταθειόνης ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα, ενώ τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης ήταν σημαντικά χαμηλότερα, στους ασθενείς με και χωρίς βιοχημική δραστηριότητα. Αντίθετα, τα επίπεδα των ισοπροστανίων και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης ήταν σημαντικά υψηλότερα μόνο στους ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα.



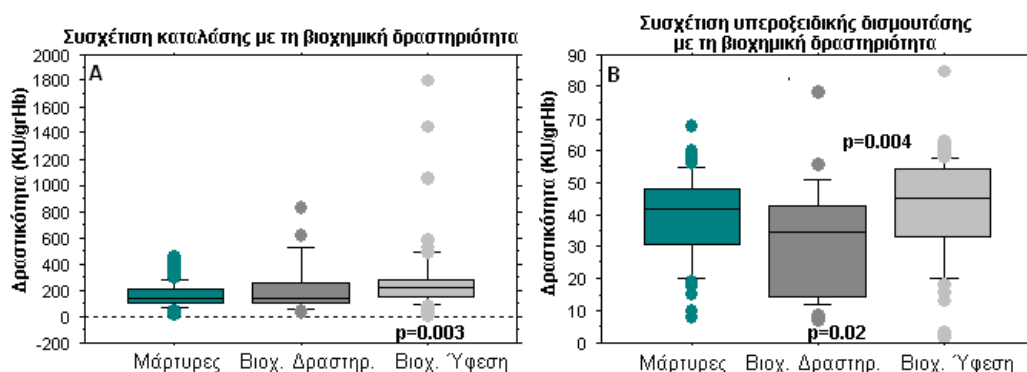
Διάγραμμα 55: Διαγράμματα «Whisker ή box». Επίπεδα προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης σε σχέση με τους δείκτες ηπατικής βλάβης, στους μη κίρρωτικούς ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” για τα ισοπροστανία και με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεΐδες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.



Διάγραμμα 56: Διαγράμματα «Whisker ή box»: Επίπεδα οξειδωμένης (Διάγρ. 56A) και ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγρ. 56B) σε σχέση με τους δείκτες ηπατικής βλάβης, στους μη κίρρωτικούς ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.



Διάγραμμα 57: Διαγράμματα «Whisker ή box». Επίπεδα αναγωγής (Διάγρ. 57A) και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Διάγρ. 57B) σε σχέση με τους δείκτες ηπατικής βλάβης, στους μη κίρρωτικούς ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.



Διάγραμμα 58: Διαγράμματα «Whisker ή box». Επίπεδα δραστηριότητας καταλάσης (Διάγρ. 58A) και υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγρ. 58B) σε σχέση με τους δείκτες ηπατικής βλάβης στους μη κίρρωτικούς ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney”. Οι τιμές p που είναι στη βάση του διαγράμματος αναφέρονται στη σύγκριση με τους μάρτυρες και οι τιμές p που είναι ανάμεσα στις δυο ομάδες αναφέρονται στη σύγκριση αυτών των δυο ομάδων.

4.2. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη θεραπεία και την έκβαση της στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες.

Ως βιοχημική ανταπόκριση στη θεραπεία ορίζεται η μείωση των επιπέδων των αμινοτρανσφερασών (ALT και AST) σε φυσιολογικά επίπεδα και ως ιολογική ανταπόκριση στη θεραπεία ορίζεται η μη ανίχνευση του HCV-RNA ή του HBV DNA με τη μέθοδο της PCR στον ορό. Οι ασθενείς στους οποίους λήφθηκε το δείγμα μετά το τέλος της θεραπείας κατατάχθηκαν σε δυο ομάδες ανάλογα με την έκβαση της θεραπείας: α) ασθενείς με ιολογική και βιοχημική ανταπόκριση στο τέλος της θεραπείας και 6 μήνες μετά τη διακοπή της αγωγής (παρατεταμένη βιοχημική και ιολογική ανταπόκριση), β) ασθενείς που υποτροπίασαν παρά την αρχική ανταπόκριση στο τέλος της αγωγής ή ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν καθόλου στη θεραπεία. Οι ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες που ήταν υπό θεραπεία κατατάχθηκαν σε δυο ομάδες ανάλογα με την ανταπόκριση στη θεραπεία: α) ασθενείς με συνδυασμένη ανταπόκριση (ιολογική και βιοχημική) (ανταπόκριση στη θεραπεία), β) ασθενείς με ιολογική και βιοχημική δραστηριότητα (μη ανταπόκριση στη θεραπεία).

4.2.1. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη θεραπεία και την έκβαση της στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες που ελάμβαναν θεραπεία.

Όσον αφορά τη θεραπεία, 24 ασθενείς (13 ασθενείς με ηπατίτιδα C, 11 ασθενείς με ηπατίτιδα B) ελέγχθηκαν ενώ ελάμβαναν θεραπεία. Οι ασθενείς που ελάμβαναν θεραπεία δεν διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες σε καμία παράμετρο. Από αυτούς 16 ασθενείς ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία (10 ασθενείς με ηπατίτιδα C, 6 ασθενείς με ηπατίτιδα B) και 8 ασθενείς δεν ανταποκρίθηκαν (3 ασθενείς με ηπατίτιδα C, 5 ασθενείς με ηπατίτιδα B). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ αυτών που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία και αυτών που δεν ανταποκρίθηκαν σε καμία παράμετρο. Εξαιρέση αποτέλεσε η καταλάση, όπου οι ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα σε σχέση με αυτούς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία [200(113-490) vs 142(11-227), $p=0.05$] και σε σχέση με τους μάρτυρες [200(113-490) vs 141(21-449), $p=0.03$].

Οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία δεν διέφεραν σε σχέση με τους μάρτυρες. Οι ασθενείς όμως που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία παρουσίαζαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερες τιμές στην αναγωγή της γλουταθειόνης, στην καταλάση, στην οξειδωμένη γλουταθειόνη και στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη ανηγμένη γλουταθειόνη σε σχέση με τους μάρτυρες (Πίνακας 61). Στα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των ομάδων.

Πίνακας 61: Συσχέτιση επιπέδων δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων και οξειδωμένης γλουταθειόνης στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες που είναι υπό θεραπεία και δεν ανταποκρίθηκαν σε σχέση με τους μάρτυρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

	Μη ανταπόκριση στη θεραπεία (v=8)	Μάρτυρες (v=75)	Τιμή p
Αναγωγή της γλουταθειόνης	4,1(0,7-8,8)	2,3(0,08-12)	0.02
Καταλάση	200(113-490)	141(21-449)	0.03
Ανηγμένη γλουταθειόνη	398(48-680)	1101(91-5409)	0.006
Οξειδωμένη γλουταθειόνη	1,9(0,68-16,4)	4,9(0,1-49)	0.002

*0.1>p>0.05, **p≤0.05, ***p≤0.01, ****p≤0.001.

Στο σύνολο των ασθενών που ελάμβαναν θεραπεία, οι ασθενείς με ηπατίτιδα C (v=13) είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα δραστηριότητας MPO [13(0,1-225) vs 30(0,1-230), p=0.05], υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης [2,4(0,1-35) vs 6(0,1-63), p=0.02] και σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα δραστηριότητας υπεροξειδικής δισμουτάσης [45(2-63) vs 37(0,1-85), p=0.05] και ανηγμένης γλουταθειόνης [750(5-3250) vs 400(3-1000), p=0.01] σε σχέση με τους ασθενείς με ηπατίτιδα B (v=11).

4.2.2. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη θεραπεία και την έκβαση της στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες που μελετήθηκαν μετά το τέλος της θεραπείας.

Επιλέχθηκαν για μελέτη 21 ασθενείς που είχαν λάβει θεραπεία στο παρελθόν (13 ασθενείς με ηπατίτιδα C, 8 ασθενείς με ηπατίτιδα B). Από αυτούς, 8 ασθενείς δεν είχαν ανταποκριθεί στη θεραπεία (3 ασθενείς με ηπατίτιδα C, 5 ασθενείς με ηπατίτιδα B) και 13 ασθενείς είχαν ανταποκριθεί (10 ασθενείς με ηπατίτιδα C, 3 ασθενείς με ηπατίτιδα B). Το σύνολο των ασθενών

που μελετήθηκαν μετά τη θεραπεία είχαν σε σχέση με τους μάρτυρες σημαντικά υψηλότερα επίπεδα αλδευδών [8(1,9-33) vs 0,3(0,05-4,9), $p=0.0004$], υψηλότερη δραστικότητα καταλάσης και αναγωγάσης της γλουταθειόνης, χαμηλότερη ανηγμένη γλουταθειόνη και υψηλότερη οξειδωμένη γλουταθειόνη (Πίνακας 62). Σύγκριση μόνο των ασθενών που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία με τους μάρτυρες ανέδειξε παρόμοια αποτελέσματα. Αντίθετα, στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία δεν παρατηρήθηκαν οι παραπάνω διαφορές, αλλά εμφάνιζαν παραπλήσια επίπεδα σε όλους τους δείκτες οξειδωτικού στρες σε σχέση με τους μάρτυρες.

Πίνακας 62: Επίπεδα ορισμένων δεικτών οξειδωτικού στρες, σε σχέση με τη μη ανταπόκριση στη θεραπεία στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες που μελετήθηκαν μετά τη θεραπεία. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεύδες και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τους υπόλοιπους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

	Μετά από θεραπεία ($n=21$)	Μη ανταπόκριση στη θεραπεία ($n=8$)	Μάρτυρες ($n=75$)
Αναγωγή της γλουταθειόνης	3,2(0,3-33)	4,2(1,8-33)	2,3(0,08-12)
Ανηγμένη γλουταθειόνη	499(71-3286)	532(193-1072)	1101(91-5409)
Κατάλαση	246(85-592)	145(105-492)	141(21-449)
Οξειδωμένη γλουταθειόνη	10(0,09-100)***	4(0,6-100)**	4,9(0,1-49)
Αλδεύδες	8(1,9-33)****	19(4-25)***	0,3(0,05-4,9)

* $0.1 > p > 0.05$, ** $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.001$.

Συγκριτικά με τους ασθενείς που ελέγχθηκαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας, οι ασθενείς που είχαν λάβει θεραπεία στο παρελθόν εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη δραστικότητα καταλάσης [163(11-493) vs 246(85-592), $p=0.009$]. Στους υπόλοιπους δείκτες δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων.

4.2.3. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τους δείκτες ηπατικής βλάβης στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες που δεν είχαν λάβει θεραπεία.

Οι ασθενείς που ελέγχθηκαν πριν λάβουν θεραπεία ήταν 26 (21 ασθενείς με ηπατίτιδα C και 5 ασθενείς με ηπατίτιδα B). Είχαν υψηλότερη δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων και υψηλότερα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης σε σχέση με τους ασθενείς που ελάμβαναν θεραπεία και σε σχέση με τους μάρτυρες. Η σύγκριση των ασθενών που δεν είχαν λάβει θεραπεία και αυτών που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας ανέδειξε σημαντική διαφορά στις αλδεύδες [1,4(0,19-13) vs 0,24(0,2-15,8), $p=0.03$] και στην υπεροξειδική δισμουτάση [41(13-78)

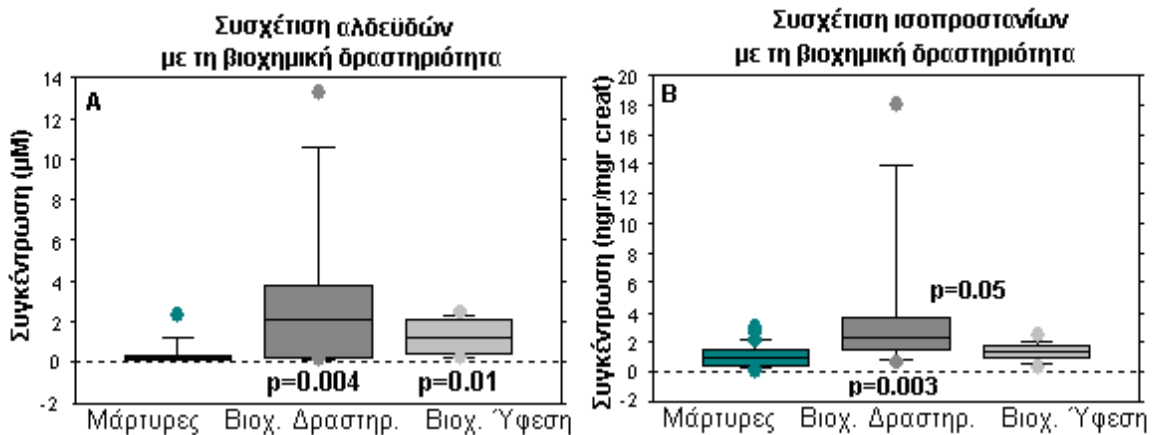
vs 39(2,6-50), $p=0.05$]. Οι ασθενείς που ελέγχθηκαν πριν λάβουν θεραπεία είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες σε σχέση με τους μάρτυρες στους παρακάτω δείκτες: αλδεΰδες [1,4(0,19-13) vs 3(0,48-47), $p=0.0004$], ισοπροσάνια [1,5(0,24-18) vs 10(0,2-30), $p=0.006$], MPO [26(0,83-290) vs 1,1(0,03-2,3), $p=0.04$], καταλάση [220(27-3887) vs 141(21-449), $p=0,04$], υπεροξειδάση της γλουταθειόνης [7,8(0,2-62) vs 5(0,3-31), $p=0.002$] και αναγωγή της γλουταθειόνης [4,1(0,5-35) vs 2(0,08-13), $p=0.0005$]. Αντίθετα, τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τους μάρτυρες [761(35-2206) vs 1101(91-5409), $p=0.008$]. Τα επίπεδα των αλδεϋδών και της ανηγμένης γλουταθειόνης διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες τόσο στους ασθενείς που είχαν φυσιολογικές αμινοτρανσφεράσες όσο και στους ασθενείς που είχαν αυξημένες (Πίνακας 63).

Στους ασθενείς που είχαν βιοχημική δραστηριότητα παρατηρήθηκε τάση αύξησης στα περισσότερα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης (ισοπροσάνια, αλδεΰδες, πρωτεϊνικά καρβονύλια, μυελοϋπεροξειδάση) (Διάγραμμα 59 και 60), στη δραστικότητα της αναγωγής και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Διάγραμμα 61) και μείωση στη δραστικότητα της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγραμμα 62) σε σχέση με τους ασθενείς που βρισκόταν σε βιοχημική ύφεση. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των παραπάνω δυο ομάδων παρατηρήθηκαν στα ισοπροσάνια (Διάγραμμα 59B, Πίνακας 63), στη δραστικότητα της αναγωγής της γλουταθειόνης (Διάγραμμα 61A, Πίνακας 63), στη δραστικότητα της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγραμμα 62, Πίνακας 63). Η δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης στους ασθενείς που παρουσίαζαν βιοχημική δραστηριότητα βρέθηκε σημαντικά μειωμένη και σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 62B).

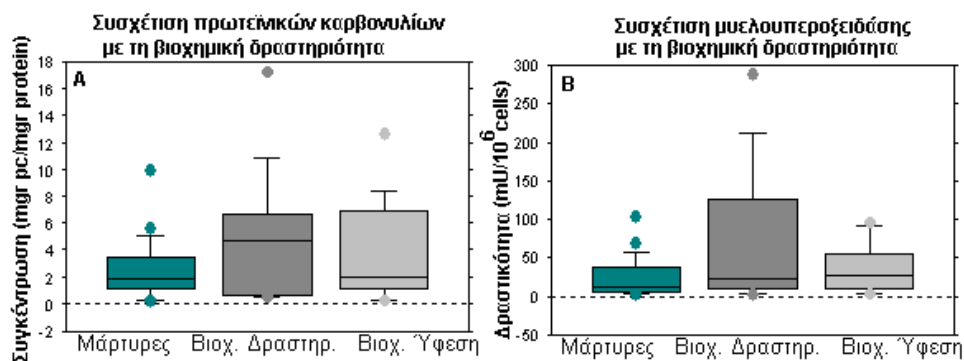
Πίνακας 63: Σύγκριση επιπέδων δεικτών οξειδωτικής βλάβης, ανάλογα με την παρουσία βιοχημικής δραστηριότητας στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες που δεν είχαν λάβει θεραπεία. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες (τιμή p κάτω από τα δεδομένα) και στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων των ασθενών.

	Μάρτυρες (n=75)	Βιοχημική Ύφεση (n=14)	Βιοχημική δραστηριότητα (n=12)	Τιμή p μεταξύ ομάδων ασθενών
Ισοπροστανία	1(0,2-3)	1,3(0,24-2,4)	2,2(0,59-18)***	p=0.05
Αναγωγή της γλουταθειόνης	2(0,08-13)	3,6(0,5-5,6)	6,2(0,5-35)***	p=0.005
Υπεροξειδική δισμουτάση	42(8-68)	54(33-63)	33(12-78)**	p=0.01
Καταλάση	141(21-449)	238(30-1800)**	138(26-833)*	p=0.005

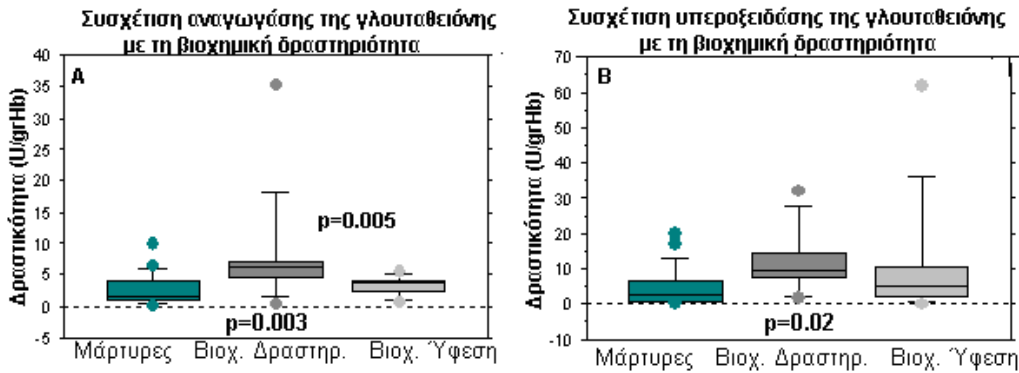
*0.1>p>0.05, **p≤0.05, ***p≤0.01, ****p≤0.001.



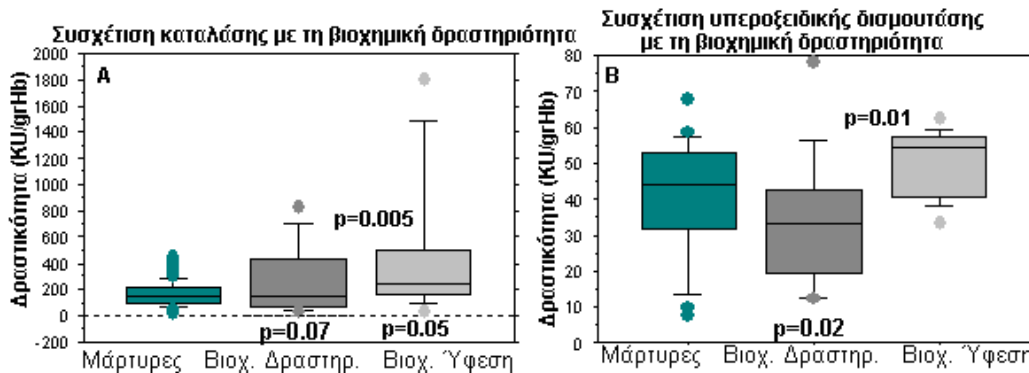
Διάγραμμα 59: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα προϊόντων λιπδικής υπεροξειδωσης στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες που δεν είχαν λάβει θεραπεία σε σχέση με τους δείκτες ηπατικής βλάβης. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεϋδες και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τα ισοπροστανία και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες (τιμή p στη βάση του box) και στις δυο ομάδες των ασθενών μεταξύ τους (τιμή p ανάμεσα στα box).



Διάγραμμα 60: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Διάγρ. 60A) και δραστηριότητας MPO (Διάγρ.60B) στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες, που δεν είχαν λάβει θεραπεία σε σχέση με τους δείκτες ηπατικής βλάβης.



Διάγραμμα 61: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστικότητας υπεροξειδάσης (Διάγρ. 61A) και αναγωγής της γλουταθειόνης (Διάγρ. 61B), στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες, που δεν είχαν λάβει θεραπεία σε σχέση με τους δείκτες ηπατικής βλάβης. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες (τιμή p στη βάση του box) και στις δυο ομάδες των ασθενών μεταξύ τους (τιμή p ανάμεσα στα box).



Διάγραμμα 62: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστικότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγρ. 62A) και της καταλάσης (Διάγρ. 62B) στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες, που δεν είχαν λάβει θεραπεία σε σχέση με τους δείκτες ηπατικής βλάβης. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες (τιμή p στη βάση του box) και στις δυο ομάδες των ασθενών μεταξύ τους (τιμή p ανάμεσα στα box).

4.3. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με την κίρρωση στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες.

Επιλέχθηκαν για μελέτη 16 ασθενείς με κίρρωση (8 ασθενείς με ηπατίτιδα C και 8 ασθενείς με ηπατίτιδα B), εκ των οποίων 12 είχαν φυσιολογική ηπατική βιοχημεία και 4 είχαν βιοχημική δραστηριότητα. Η στατιστική ανάλυση έγινε μόνο στους ασθενείς που είχαν φυσιολογικές τρανσαμινάσες. Τα ισοπροστάνια και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια παρουσίαζαν τάση αύξησης και η δραστικότητα της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης παρουσίαζαν τάση μείωσης,

στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς. Στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στα πρωτεϊνικά καρβονύλια, που ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς [3,8(0,4-21) vs 3,3(0,07-24), $p=0.05$]. Η σύγκριση των ασθενών χωρίς κίρρωση ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με μάρτυρες, στη δραστικότητα της καταλάσης και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (Πίνακας 64). Στους κίρρωτικούς, δεν παρατηρήθηκαν όμως οι παραπάνω διαφορές. Οι αλδεΐδες, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και η ανηγμένη γλουταθειόνη διέφεραν σημαντικά σε σχέση με μάρτυρες, τόσο στους κίρρωτικούς, όσο και στους μη κίρρωτικούς (Πίνακας 64).

Πίνακας 64: Επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες σε σχέση με την κίρρωση στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες που ήταν σε βιοχημική ύφεση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεΐδες και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τους υπόλοιπους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

	Κίρρωτικοί ($n=12$)	Μη κίρρωτικοί ($n=51$)	Μάρτυρες ($n=75$)
Αλδεΐδες	1(0,24-1,8)****	0,7(0,2-5,1)****	0,3(0,05-4,9)
Πρωτεϊνικά καρβονύλια	3,8(0,4-21)***	3,3(0,07-24,3)**	1,6(0,1-10)
Ανηγμένη γλουταθειόνη	567(94-1084)***	491(20-3286)****	1101(91-5409)
Καταλάση	204(20-1455)	227(6,7-1800)****	141(21-449)
Υπεροξειδική δισμουτάση	39,4(18-58)	47(2-85)	42(8-68)
Αναγωγάση της γλουταθειόνης	3,3(0,3-32)	1,56 (0,16-12,4)**	2,3(0,08-12)
Οξειδωμένη γλουταθειόνη	5,14(0,09-47)	10(0,1-56)*	4,9(0,1-49)

* $0.1 > p > 0.05$, ** $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.001$.

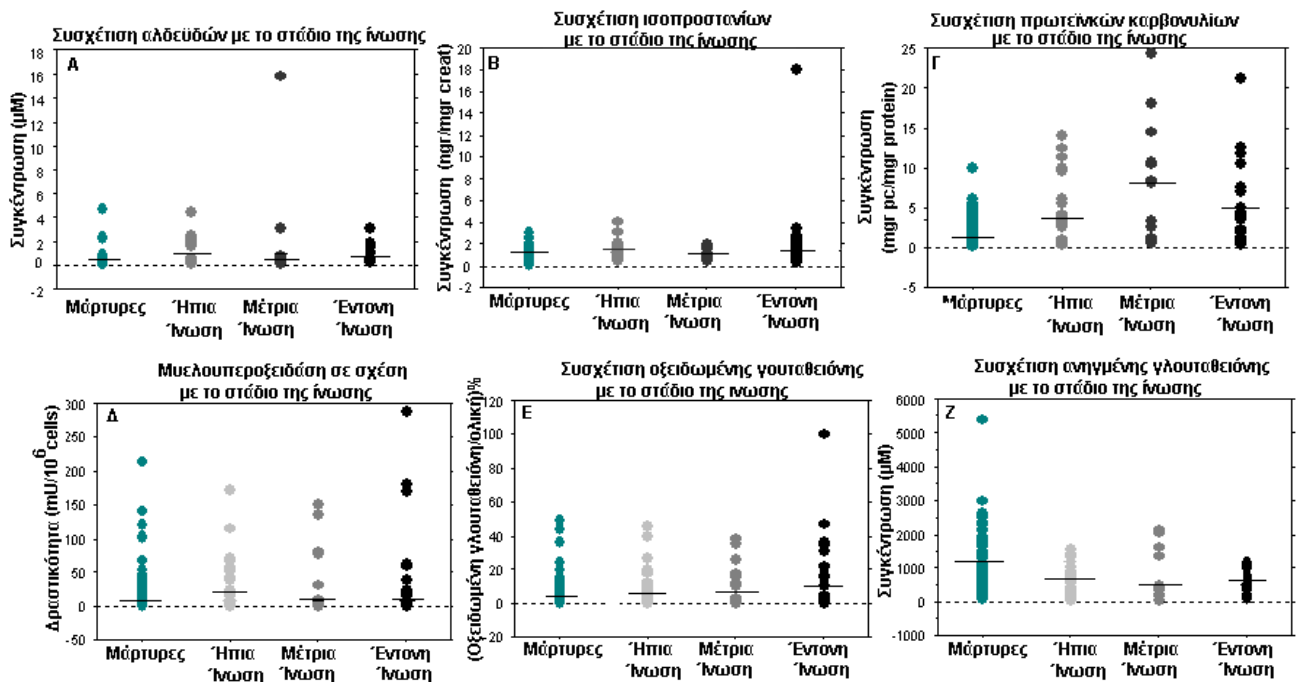
Δεν ανευρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ασθενών με αντιρροπούμενη και μη αντιρροπούμενη κίρρωση.

4.4. Σύγκριση δεικτών οξειδωτικού στρες με τα ιστοπαθολογοανατομικά ευρήματα σε ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες.

Καταγράφηκαν τα αποτελέσματα από 54 βιοψίες: 22 ασθενείς είχαν ήπια ίνωση (15 ασθενείς με ηπατίτιδα C, 7 ασθενείς με ηπατίτιδα B), 14 ασθενείς μέτρια ίνωση (8 ασθενείς με ηπατίτιδα C, 6 ασθενείς με ηπατίτιδα B) και 16 ασθενείς είχαν έντονη ίνωση (8 ασθενείς με ηπατίτιδα C, 8 ασθενείς με ηπατίτιδα B). Το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε από τη διενέργεια της τελευταίας βιοψίας μέχρι τη συλλογή των δειγμάτων ήταν κατά μέσο όρο 27 μήνες με εύρος 1-65 μήνες.

4.4.1. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με το στάδιο της ίνωσης στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες.

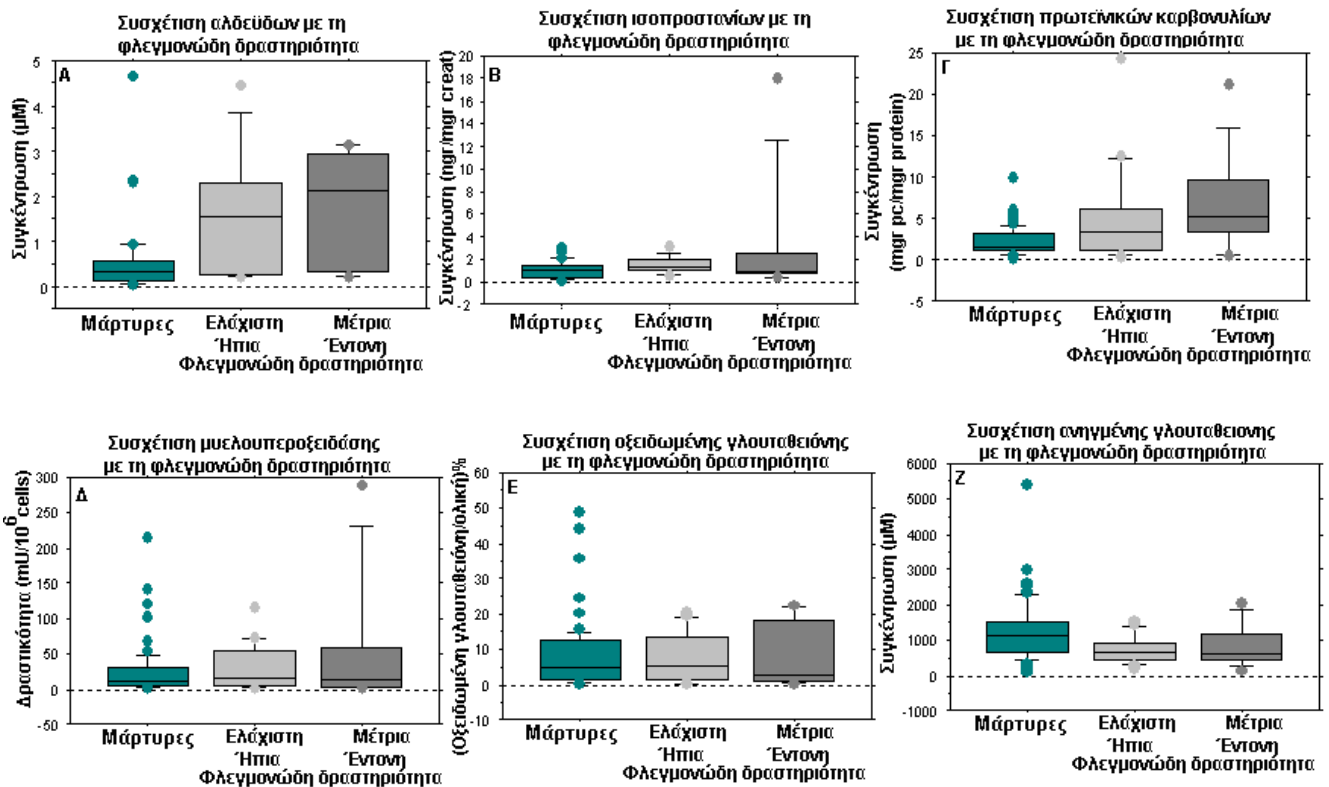
Ως προς την ίνωση παρατηρήθηκε αύξηση των προϊόντων οξειδωτικής βλάβης και μείωση της γλουταθειόνης με την αύξηση του βαθμού ίνωσης (Διάγραμμα 63). Στις δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων δεν παρατηρήθηκαν αξιόλογες διαφορές. Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των βαθμών ίνωσης παρατηρήθηκε μόνο στα ιστοπροσπάνια που ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς που είχαν έντονη ίνωση σε σχέση με αυτούς που είχαν ήπια [1,5(0,13-18) vs 1,3(0,55-4), $p=0.04$]. Συγκριτικά με τους μάρτυρες δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές.



Διάγραμμα 63: Διάγραμμα διασποράς: Απεικονίζεται η διάμεσος (οριζόντια γραμμή). Επίπεδα προϊόντων οξειδωτικής βλάβης (Διάγρ. 63 Α, Β, Γ), δραστηριότητα MPO (Διάγρ. 63Δ), οξειδωμένης (Διάγρ. 63Ε) και ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγρ. 63Ζ) στα διάφορα στάδια της ίνωσης στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες.

4.4.2. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη φλεγμονώδη δραστηριότητα στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες.

Για τη σύγκριση της φλεγμονώδους δραστηριότητας κρατήθηκαν τα στοιχεία από τις βιοψίες, στις οποίες από την ημερομηνία συλλογής της βιοψίας μέχρι και την ημερομηνία συλλογής του δείγματος δεν μεσολάβησε κάποια αλλαγή στην κλινική κατάσταση τους ασθενούς. Συγκρίθηκαν 16 ασθενείς με ελάχιστη/ήπια φλεγμονώδη δραστηριότητα (εκ των οποίων 7 ασθενείς με ηπατίτιδα C και 9 ασθενείς με ηπατίτιδα B) και 10 ασθενείς με μέτρια/έντονη φλεγμονώδη δραστηριότητα (εκ των οποίων 7 ασθενείς με ηπατίτιδα C και 3 ασθενείς με ηπατίτιδα B). Τα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης και οι δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων παρουσίαζαν τάση αύξησης στους ασθενείς που είχαν μέτρια/έντονη φλεγμονώδη δραστηριότητα σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν ελάχιστη/ήπια φλεγμονώδη δραστηριότητα και σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 64), χωρίς στατιστικώς σημαντικές διαφορές.



Διάγραμμα 64: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα προϊόντων οξειδωτικής βλάβης (Διάγρ. 64 Α,Β,Γ), δραστηριότητα MPO (Διάγρ. 64Δ), οξειδωμένης (Διάγρ. 64Ε) και ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγρ. 64Ζ) σε σχέση με τη φλεγμονώδη δραστηριότητα στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες.

5. Επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με ηπατίτιδα C.

Μελετήθηκαν συνολικά 47 ασθενείς με ηπατίτιδα C. Στους περισσότερους από αυτούς, στους οποίους έγινε προσδιορισμός του HCV-RNA, έγινε παράλληλα και ταυτοποίηση του γονότυπου του ιού. Αναλυτικά, από τους 36 ασθενείς που έγινε ταυτοποίηση του γονότυπου, 20 είχαν γονότυπο 1b, 9 γονότυπο 3a, 2 γονότυπο 1a, 1b, 2 γονότυπο 4, 2 γονότυπο 3 και 1 γονότυπο 1a. Οι δείκτες οξειδωτικού στρες εκτιμήθηκαν σύμφωνα με τα παρακάτω χαρακτηριστικά των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C (Πίνακας 65). Ως προς τη φλεγμονώδη δραστηριότητα μελετήθηκαν μόνο οι ασθενείς που η πρόσφατη βιοψία τους δεν απείχε αρκετό χρονικό διάστημα από την ημερομηνία συλλογής του δείγματος και δεν σημειώθηκε αλλαγή στην κλινικοεργαστηριακή κατάσταση του ασθενούς.

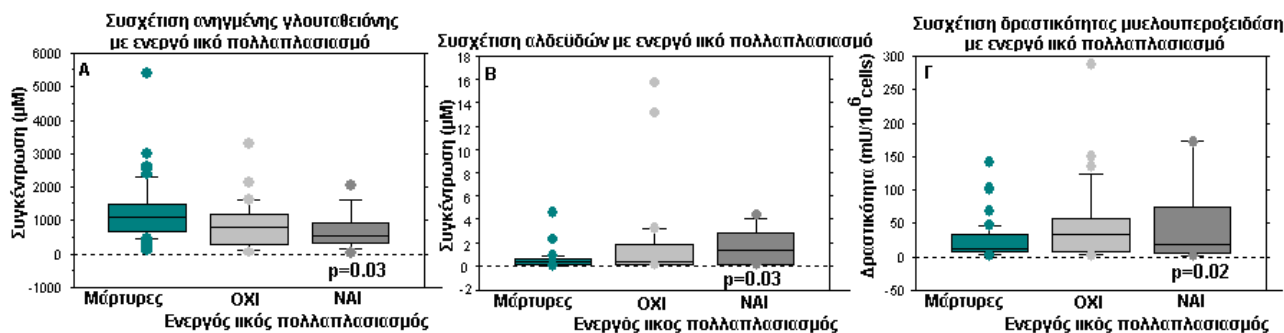
Πίνακας 65: Κλινικοεργαστηριακά και ιστοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ηπατίτιδα C.

Κατηγορίες	Αριθμός ατόμων (n=47)
Θεραπεία και έκβαση της	
Θεραπεία (ναι/όχι)	13/21
Μετά από θεραπεία	13
Ανταπόκριση στη θεραπεία (υπό θεραπεία) (ναι/όχι)	10/3
Ανταπόκριση στη θεραπεία (μετά από θεραπεία) (ναι/όχι)	10/3
Εργαστηριακά ευρήματα	
HCV-RNA (+) (ναι/όχι)	12/31
Φυσιολογικές τρανσαμινάσες (ναι/όχι)	29/18
Ιολογική και βιοχημική ύφεση (ναι/όχι)	23/9
Ιστοπαθολογοανατομικά ευρήματα	
Κίρρωση (ναι/όχι)	8/39
Φλεγμονώδη δραστηριότητα	
Ελάχιστη/ήπια	7
Μέτρια/έντονη	7
Βαθμός ίνωσης	
Ήπια ίνωση	15
Μέτρια ίνωση	8
Έντονη ίνωση	8

Από τους 47 ασθενείς με ηπατίτιδα C, 43 είχαν πρόσφατο έλεγχο για HCV-RNA. Από τους ασθενείς που δεν είχαν λάβει θεραπεία 6 είχαν HCV-RNA (+) και 11 είχαν HCV-RNA (-). Από τους ασθενείς που ελάμβαναν θεραπεία, 3 είχαν HCV-RNA (+) και 10 είχαν HCV-RNA (-). Από τους ασθενείς που λήφθηκε το δείγμα μετά το τέλος της θεραπείας, 3 είχαν HCV-RNA (+) και 10 είχαν HCV-RNA (-).

5.1. Επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες σε σχέση με εργαστηριακά ευρήματα σε ασθενείς με ηπατίτιδα C.

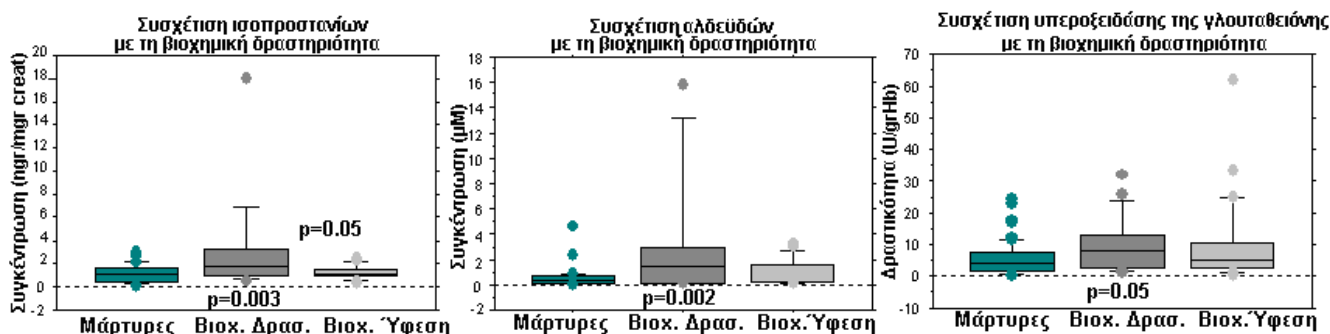
Οι ασθενείς που είχαν ενεργό ιικό πολλαπλασιασμό τη στιγμή της συλλογής του δείγματος είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα γλουταθειόνης [549(35-2076) vs 1101(91-5409), $p=0.03$], υψηλότερα επίπεδα αλδευδών [1,4(0,2-4,5) vs 0,3(0,05-4,7), $p=0.03$] και υψηλότερη δραστηριότητα MPO [18(0,8-175) vs 11(1-142), $p=0.02$] σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 65). Οι ίδιες παράμετροι δεν διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες στους ασθενείς που είχαν HCV-RNA (-) τη στιγμή της συλλογής του δείγματος.



Διάγραμμα 65: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγρ. 65A), αλδευδών (Διάγρ. 65B) και δραστικότητας MPO (Διάγρ. 65Γ) σε σχέση με την παρουσία ή όχι ενεργού ικού πολλαπλασιασμού στους ασθενείς με ηπατίτιδα C. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεύδες και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τους υπόλοιπους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

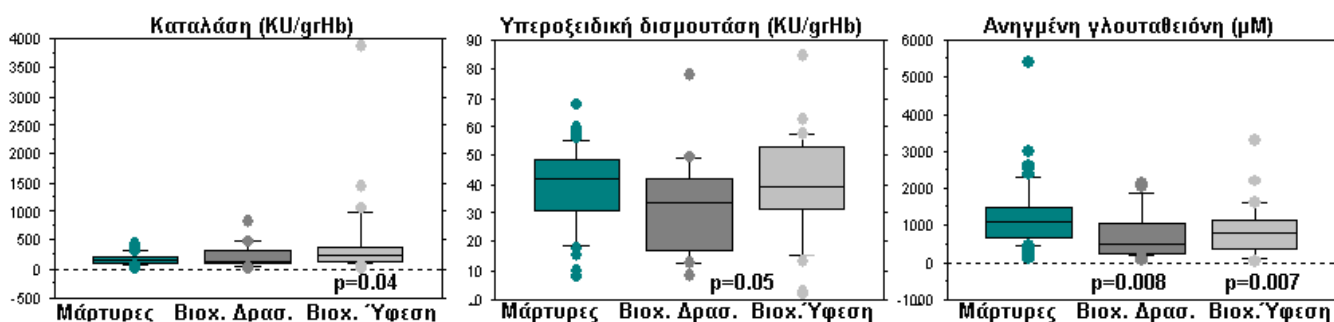
Οι ασθενείς που είχαν βιοχημική δραστηριότητα τη στιγμή της συλλογής του δείγματος είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερες τιμές ισοπροστανίων σε σχέση με τους ασθενείς που παρουσίασαν βιοχημική ύφεση [1,9(0,6-18) vs 1(0,24-2,4), p=0.05] και σε σχέση με τους μάρτυρες [1,9(0,6-18) vs 1(0,02-3), p=0.003]. Τα επίπεδα της MPO [54(0,83-289) vs 43(1,8-175), p=0.02] και των αλδευδών [1,3(0,15-15,8) vs 0,3(0,05-4,9), p=0.002] στους ασθενείς που είχαν βιοχημική δραστηριότητα διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες, ενώ στους ασθενείς που ήταν σε ύφεση δεν διέφεραν σε σχέση με τους μάρτυρες. Τα υπόλοιπα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης ήταν υψηλότερα στους ασθενείς που είχαν βιοχημική δραστηριότητα σε σχέση με αυτούς που είχαν βιοχημική ύφεση, χωρίς όμως στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Διάγραμμα 66).

Όσον αφορά στα αντιοξειδωτικά ένζυμα, η υπεροξειδάση και η αναγωγή της γλουταθειόνης παρουσίαζαν υψηλότερη δραστικότητα στην ομάδα των ασθενών με αυξημένες τρανσαμινάσες. Συγκριτικά με τους μάρτυρες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση μόνο στη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στους ασθενείς με αυξημένες τρανσαμινάσες [7(0,3-31) vs 4,5(0,3-25), p=0.05] (Διάγραμμα 66).



Διάγραμμα 66: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα ισοπρωτεϊνών, αλδεϋδών και δραστικότητα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης σε σχέση με τους δείκτες ηπατικής βλάβης, στους ασθενείς με ηπατίτιδα C. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεϋδες και με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” για τους άλλους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες (τιμή p στη βάση του box) και στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων (τιμή p ανάμεσα στα box).

Τα επίπεδα της γλουταθειόνης και η δραστικότητα της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης παρουσίαζαν τάση πτώσης στους ασθενείς με παθολογικές τρανσαμινάσες σε σχέση με τους ασθενείς με φυσιολογικές τρανσαμινάσες (Διάγραμμα 67). Συγκριτικά με τους μάρτυρες η δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης ήταν σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς με αυξημένες τρανσαμινάσες [42(8-68) vs 33(8-76), p=0.05], η δραστικότητα της καταλάσης ήταν σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς με φυσιολογικές τρανσαμινάσες [141(21-449) vs 217(11-3886), p=0.04], τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης ήταν σημαντικά μειωμένα τόσο στους ασθενείς με αυξημένες [1101(91-5409) vs 500(49-2137), p=0.008] όσο και στους ασθενείς με φυσιολογικές τρανσαμινάσες [1101(91-5409) vs 801(35-3286), p=0.007].



Διάγραμμα 67: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων και της ανηγμένης γλουταθειόνης σε σχέση με τους δείκτες ηπατικής βλάβης, στους ασθενείς με ηπατίτιδα C. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.

Οι ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα και ενεργό μικρό πολλαπλασιασμό ($n=9$) είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα 3-νιτροτυροσίνης [11(3,2-72) vs 6,4(1-92), $p=0.02$], δραστικότητα αναγωγάσης [6(0,51-35) vs 3,2(0,6-32), $p=0.01$] και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης [8,7(1,7-26) vs 5,3(0,2-62), $p=0.04$] σε σχέση με τους ασθενείς που βρισκόταν σε ιολογική και βιοχημική ύφεση ($n=23$).

5.2. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη θεραπεία και την έκβαση της σε ασθενείς με ηπατίτιδα C.

Οι ασθενείς που δεν είχαν λάβει θεραπεία είχαν γενικά υψηλότερα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης και αυξημένη δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης), σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν λάβει ή που ελάμβαναν θεραπεία, με κάποιες εξαιρέσεις. Οι μόνες στατιστικώς σημαντικές διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν στα επίπεδα της καταλάσης όπου οι ασθενείς που δεν είχαν λάβει θεραπεία είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη δραστικότητα σε σχέση με τους ασθενείς που μελετήθηκαν κατά τη χορήγηση θεραπείας [336(85-593) vs 134(11-201), $p=0.02$].

5.2.1. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη βιοχημική δραστηριότητα στους ασθενείς με ηπατίτιδα C που ελέγχθηκαν πριν λάβουν θεραπεία.

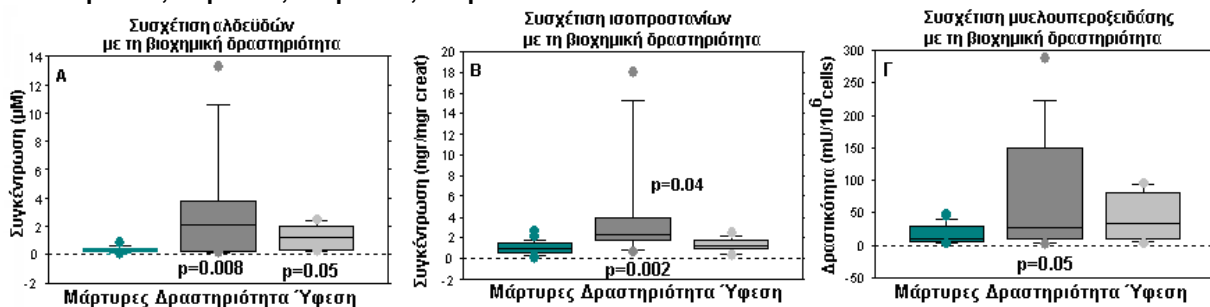
Στους ασθενείς που δεν είχαν λάβει θεραπεία, τα επίπεδα των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, της MPO, της οξειδωμένης γλουταθειόνης, της υπεροξειδάσης και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τους μάρτυρες (Πίνακας 66). Αντίθετα, τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης ήταν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τους μάρτυρες (Πίνακας 66). Οι παραπάνω διαφορές εστιάστηκαν κυρίως στους ασθενείς που είχαν αυξημένες τρανσαμινάσες (Διαγράμματα 68, 69, 70). Συγκριτικά με τους ασθενείς που είχαν φυσιολογικές τρανσαμινάσες, οι ασθενείς που είχαν αυξημένες τρανσαμινάσες παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ισοπροστανίων [1,2(0,24-2,4) vs 2,2(0,6-18), $p=0.04$] και σημαντικά υψηλότερα επίπεδα δραστικότητα αναγωγάσης της γλουταθειόνης [3,8(1,7-5,6) vs 5,9(0,5-35), $p=0.02$]. Οι ασθενείς που είχαν

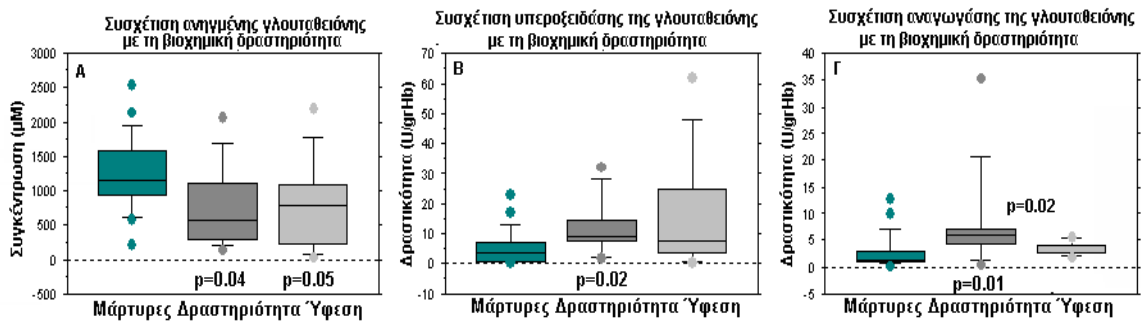
φυσιολογικές τρανσαμινάσες είχαν σημαντικά υψηλότερες δραστικότητες καταλάσης [260(99-3886) vs 131(27-833), $p=0.02$] και υπεροξειδικής δισμουτάσης [53(33-62) vs 32(12-78), $p=0.04$] συγκριτικά με τους ασθενείς που είχαν αυξημένες τρανσαμινάσες καθώς επίσης και με τους μάρτυρες (Πίνακας 66, Διάγραμμα 70).

Πίνακας 66: Σύγκριση επιπέδων δεικτών οξειδωτικού στρες, ανάλογα με την παρουσία βιοχημικής δραστηριότητας στους ασθενείς με ηπατίτιδα C που δεν είχαν λάβει ακόμη θεραπεία. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεΐδες, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τους υπόλοιπους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

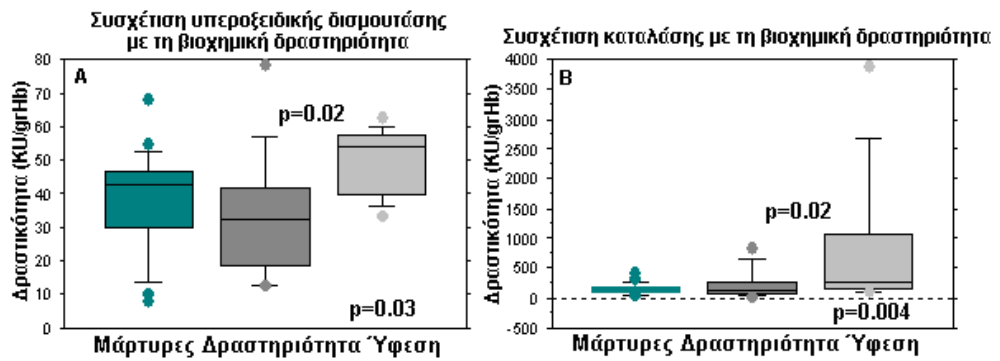
	Πριν τη θεραπεία (n=21)	Αυξημένες τρανσαμινάσες (n=11)	Φυσιολογικές τρανσαμινάσες (n=10)	Μάρτυρες (n=23)
Ισοπροστανία	1,7(0,2-18)***	2,2(0,6-18)***	1,2(0,24-2,4)	1(0,04-3)
Αλδεΐδες	1,6(0,2-13,2)**	2(0,18-13)***	1,2(0,24-2,4)**	0,35(0,05-0,82)
Πρωτεϊνικά καρβονύλια	4,6(0,34-17)**	5(0,5-17,2)	2,7(0,3-12,6)	1,8(0,1-10)
Μυελουπεροξειδάση	27(0,1-290)**	27(0,8-289)**	33(2,2-96)	11(2-48)
Οξειδωμένη γλουταθειόνη	10(0,1-47)***	9,3(0,6-43)*	10,4(0,1-47)**	4(0,1-25)
Ανηγμένη γλουταθειόνη	773(35-2205)***	580(132-2076)**	773(35-2205)**	1148(208-2544)
Αναγωγή της γλουταθειόνης	4,3(0,5-35)***	5,2(0,5-35)***	3,8(1,7-5,6)	1,4(0,08-13)
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	8(0,24-62)***	8,7(1,7-32)**	7,5(0,24-62)	3,6(0,4-23)
Καταλάση	219(26-3886)	131(27-833)	260(99-3886)***	132(40-422)
Υπεροξειδική δισμουτάση	40(13-78)	32(12-78)	53(33-62)**	42(8-68)

* $0.1 > p > 0.05$, ** $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.001$.





Διάγραμμα 69: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγρ. 69A) και δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων (Διάγρ. 69 B, Γ) στους ασθενείς με ηπατίτιδα C, που δεν είχαν λάβει ακόμη θεραπεία σε σχέση με τους δείκτες ηπατικής βλάβης. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες (τιμή p στη βάση του box) και στις δυο ομάδες των ασθενών μεταξύ τους (τιμή p ανάμεσα στα box).



Διάγραμμα 70: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστικότητας υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγρ. 70A) και καταλάσης (Διάγρ. 70 B) στους ασθενείς με ηπατίτιδα C, που δεν είχαν λάβει ακόμη θεραπεία σε σχέση με τους δείκτες ηπατικής βλάβης. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες (τιμή p στη βάση του box) και στις δυο ομάδες των ασθενών μεταξύ τους (τιμή p ανάμεσα στα box).

5.2.2. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη θεραπεία και την έκβαση της στους ασθενείς με ηπατίτιδα C που ελέγχθηκαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας.

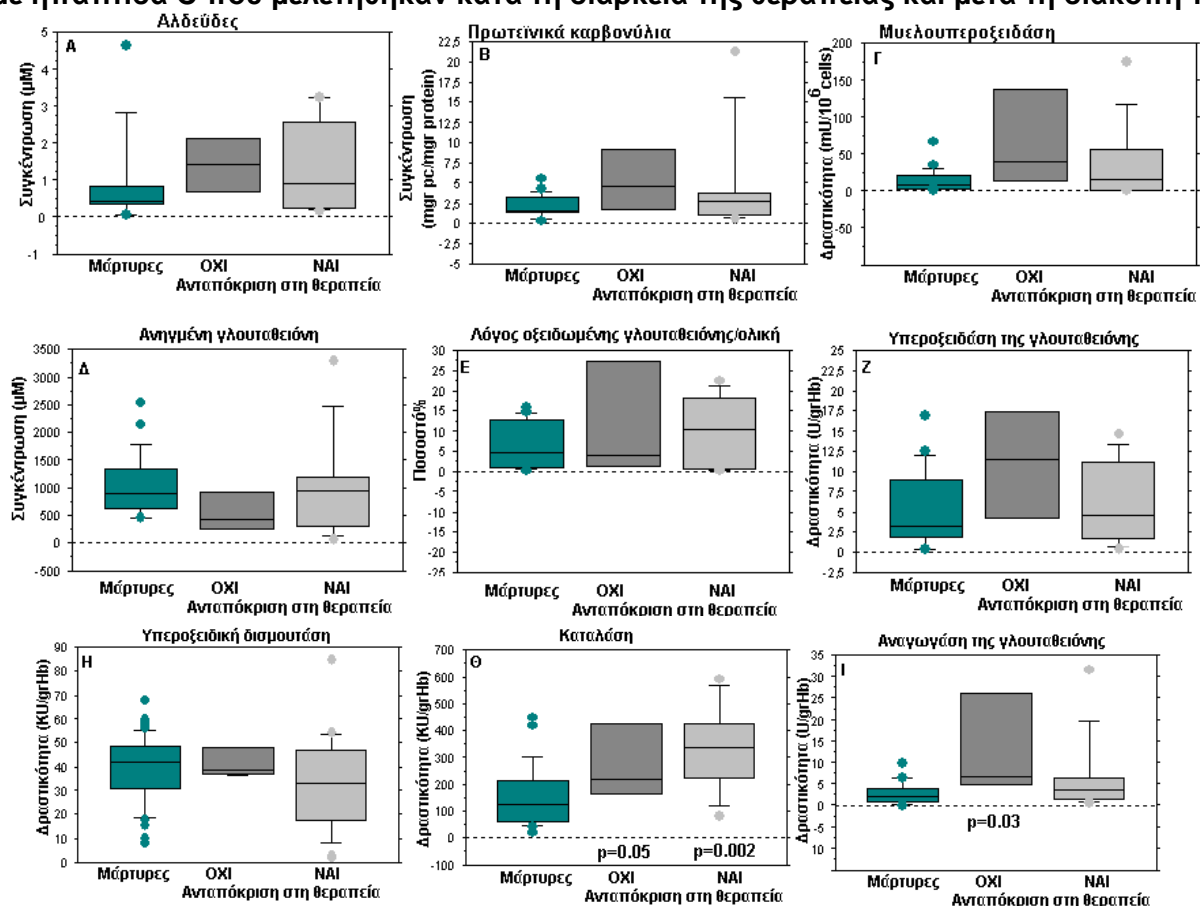
Μελετήθηκαν 13 ασθενείς κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Οι ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία ήταν μόνο 3 και οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν ήταν 10. Παρατηρήθηκε τάση αύξησης σε όλους τους δείκτες οξειδωτικής βλάβης και στη δραστικότητα όλων των αντιοξειδωτικών ενζύμων στους ασθενείς που ήταν σε θεραπεία σε σχέση με τους μάρτυρες, χωρίς όμως στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Εξαιρέση αποτέλεσε η δραστικότητα της MPO [43(1,7-150) vs 10,9(2-48), p=0.02] και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια [3,4(0,24-18) vs 1,8(0,14-9,9), p=0.03] που ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τους

μάρτυρες, καθώς επίσης και η υπεροξειδική δισμουτάση που ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τους μάρτυρες [33(2-50) vs 42(8-68), $p=0.03$]. Αν στη σύγκριση δεν συμπεριληφθούν ασθενείς που δεν είχαν ανταποκριθεί στη θεραπεία δεν παρατηρούνται οι παραπάνω σημαντικές διαφορές.

5.2.3. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη θεραπεία και την έκβαση της στους ασθενείς με ηπατίτιδα C που ελέγχθηκαν μετά το πέρας της θεραπείας.

Επιλέχθηκαν για μελέτη 13 ασθενείς που είχαν σταματήσει τη θεραπεία. Όλοι οι ασθενείς, είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερες τιμές αλδευδών [1,1(0,2-3,3) vs 0,3(0,05-0,8), $p=0.01$], πρωτεϊνικών καρβονυλίων [3,4(0,6-21) vs 2(0,14-9,9), $p=0.03$], δραστικότητα καταλάσης [355(85-593) vs 141(21-449), $p=0.003$] και αναγωγάσης της γλουταθειόνης [4,3(0,6-33) vs 2(0,08-13), $p=0.05$] σε σχέση με τους μάρτυρες. Οι ασθενείς που υποτροπίασαν παρά την αρχική ανταπόκριση στη θεραπεία ήταν μόνο 3 ενώ οι ασθενείς που εμφάνισαν παρατεταμένη ιολογική και βιοχημική ανταπόκριση μετά το τέλος της θεραπείας ήταν 10. Αν στη σύγκριση δεν συμπεριληφθούν ασθενείς που δεν είχαν ανταποκριθεί στη θεραπεία δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες, πλην της τιμής της καταλάσης [355(85-593) vs 141(21-449), $p=0.002$]. Στους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία ($n=6$), ανεξάρτητα από το αν η ανταπόκριση εκτιμήθηκε ή όχι κατά τη διάρκεια της θεραπείας, παρατηρήθηκε τάση αύξησης στα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης και στη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (με εξαίρεση την καταλάση) σε σχέση με τους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν ($n=20$) (Διάγραμμα 71).

Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με την ανταπόκριση στη θεραπεία στους ασθενείς με ηπατίτιδα C που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας και μετά τη διακοπή της



Διάγραμμα 71: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα προϊόντων οξειδωτικής βλάβης (Διάγρ. 71 Α, Β), οξειδωτικών παραγόντων (Διάγρ. 71 Γ, Ε), αντιοξειδωτικών παραγόντων (Διάγρ. 71 Δ) και δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (Διάγρ. 71 Ζ, Η, Θ, Ι) σε σχέση με την έκβαση στη θεραπεία στους ασθενείς με ηπατίτιδα C που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια και μετά το πέρας της θεραπείας. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση των επιμέρους ομάδων σε σχέση με τους μάρτυρες.

5.3. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικών στρες με τα ιστοπαθολογοανατομικά ευρήματα στους ασθενείς με ηπατίτιδα C.

5.3.1. Δείκτες οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με χρόνια HCV λοίμωξη και κίρρωση.

Από τους ασθενείς που μελετήθηκαν 8 είχαν κίρρωση και 39 δεν είχαν. Κανένας από τους 8 κίρρωτικούς δεν είχε ενεργό ιικό πολλαπλασιασμό, ενώ 3/8 είχαν βιοχημική δραστηριότητα. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ήταν σημαντικά υψηλότερα στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς [7(2,4-21) vs 3(0,1-18), $p=0.03$] και σε σχέση με τους μάρτυρες [7(2,4-21) vs 1,8(0,1-10), $p=0.003$]. Αντίθετα, οι αλδεϋδες δεν διέφεραν σε σχέση με τους μάρτυρες στους κίρρωτικούς, ενώ στους μη κίρρωτικούς παρουσίαζαν σημαντική αύξηση σε σχέση με τους μάρτυρες [1(0,16-16) vs 0,35(0,05-0,8), $p=0.02$]. Στα υπόλοιπα δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές. Η σύγκριση των ασθενών με αντιρροπούμενη ($n=6$) και μη αντιρροπούμενη κίρρωση ($n=2$) δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές.

5.3.2. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με το βαθμό ίνωσης σε ασθενείς με χρόνια HCV λοίμωξη.

Παρατηρήθηκε τάση αύξησης στα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης, παράλληλα με το βαθμό ίνωσης. Στατιστικώς σημαντική διαφορά διαπιστώθηκε στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων που ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς που είχαν έντονη ίνωση σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν ήπια ίνωση [6(2-21) vs 3,5(0,1-14), $p=0.01$] και σε σχέση με τους μάρτυρες [6(2-21) vs 1,8(0,1-10), $p=0.002$]. Επίσης, οι ασθενείς που είχαν μέτρια ίνωση, είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με τους μάρτυρες [1,7(0,13-18) vs 1,7(0,1-9,9), $p=0.002$]. Ως προς τα ιστοπροστάνια παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων τους στους ασθενείς που είχαν έντονη ίνωση σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν μέτρια [1(0,36-18) vs 1(0,59-1,7), $p=0.02$] και ήπια ίνωση [1(0,36-18) vs 1,3(0,55-3,5), $p=0.02$].

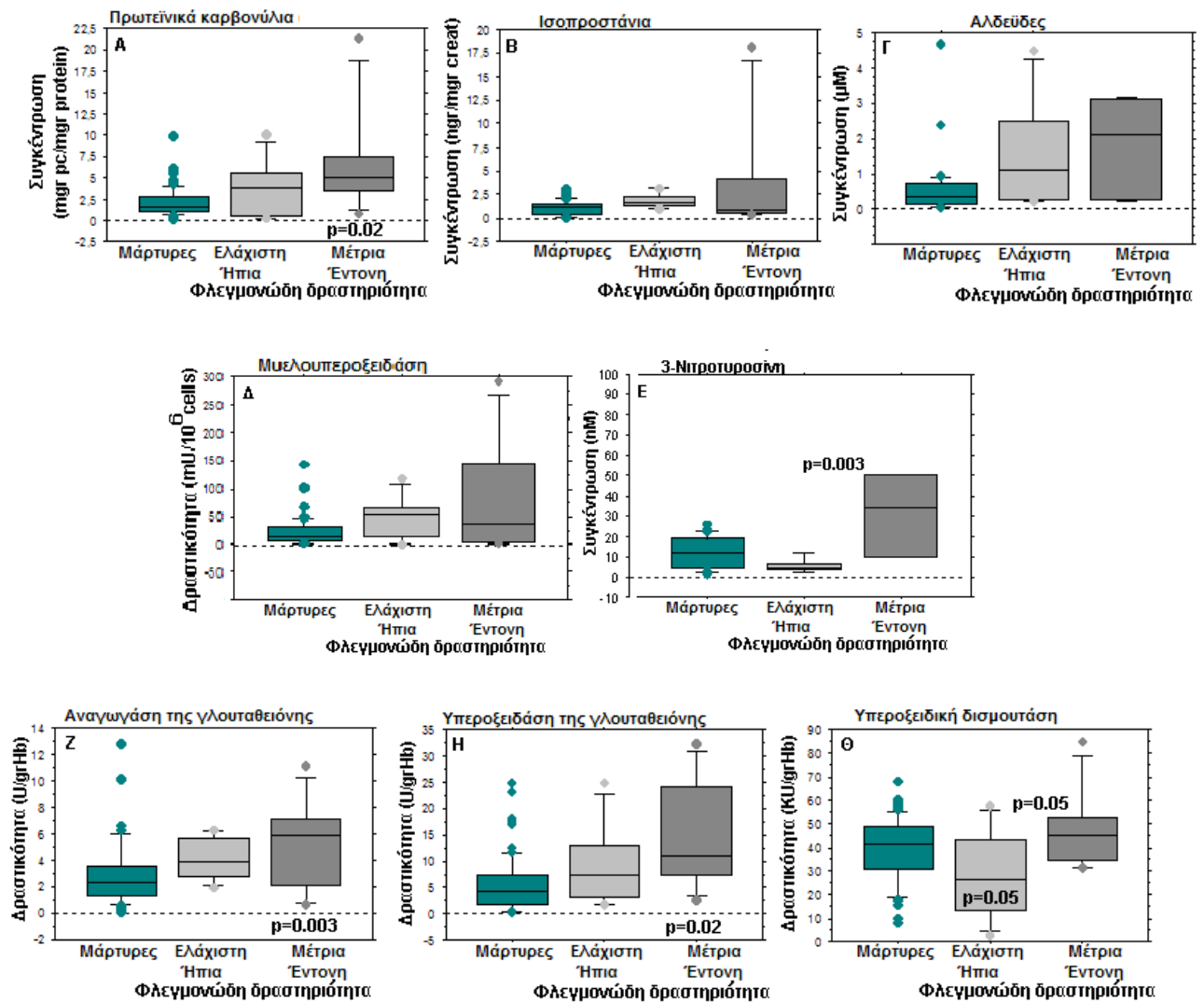
Οι δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων παρουσίαζαν προοδευτική αύξηση στους ασθενείς με μέτρια ίνωση σε σχέση με τους ασθενείς με ήπια ίνωση και στη συνέχεια παρατηρήθηκε τάση πτώσης της δραστηριότητας στους ασθενείς που είχαν έντονη ίνωση.

5.3.3. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με την παρουσία φλεγμονώδους δραστηριότητας σε ασθενείς με χρόνια HCV λοίμωξη.

Οι δραστηριότητες όλων των αντιοξειδωτικών ενζύμων (με εξαίρεση την υπεροξειδική δισμουτάση) και όλα τα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης ήταν υψηλότερα στην ομάδα των ασθενών που είχε μέτρια/έντονη φλεγμονώδη δραστηριότητα σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν ελάχιστη/ήπια φλεγμονώδη δραστηριότητα (Διάγραμμα 72). Στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τους μάρτυρες παρατηρήθηκε στους ασθενείς με μέτρια/έντονη φλεγμονώδη δραστηριότητα στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων [5(0,1-22) vs 1,8(0,1-10), $p=0.02$], της αναγωγάσης της γλουταθειόνης [6(0,5-11) vs 2,2(0,1-13), $p=0.003$] και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης [12(2,5-32) vs 4(0,1-25), $p=0.02$]. Ασθενείς με ελάχιστη/ήπια φλεγμονώδη δραστηριότητα δεν παρουσίαζαν διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες στις παραμέτρους αυτούς. Η υπεροξειδική δισμουτάση βρέθηκε σημαντικά χαμηλότερη στην ομάδα των ασθενών που είχε ελάχιστη/ήπια φλεγμονώδη δραστηριότητα σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν μέτρια/έντονη φλεγμονώδη δραστηριότητα [26(2-58) vs 45(30-90), $p=0.05$] και σε σχέση με τους μάρτυρες [26(2-58) vs 41(6-68), $p=0.05$].

Η στατιστική ανάλυση στον πληθυσμό των ανδρών ανέδειξε σημαντική διαφορά στα επίπεδα της 3-νιτροτυροσίνης μεταξύ ασθενών με ελάχιστη/ήπια φλεγμονώδη δραστηριότητα και ασθενών με μέτρια/έντονη φλεγμονώδη δραστηριότητα [33(10-50) vs 4,5(2,6-12), $p=0.003$] (Διάγραμμα 72 Ε).

Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη φλεγμονώδη δραστηριότητα στους ασθενείς με ηπατίτιδα C



Διάγραμμα 72: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα προϊόντων οξειδωτικής βλάβης (Διάγρ. 72 Α, Β, Γ, Ε), οξειδωτικών παραγόντων (Διάγρ. 72 Δ) και δραστικότητες αντιοξειδωτικών ενζύμων (Διάγρ. 72 Ζ, Η, Θ) στους ασθενείς με ηπατίτιδα C σε σχέση με τη φλεγμονώδη δραστηριότητα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση των επιμέρους ομάδων σε σχέση με τους μάρτυρες (τιμή p στη βάση του box) και στις δυο ομάδες των ασθενών μεταξύ τους (τιμή p ανάμεσα στα box).

6. Επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β.

Συνολικά μελετήθηκαν 49 ασθενείς με ηπατίτιδα Β. Οι δείκτες οξειδωτικού στρες εκτιμήθηκαν σύμφωνα με τα παρακάτω χαρακτηριστικά των ασθενών (Πίνακας 67). Οι ασθενείς που κατατάχθηκαν στη κατηγορία «ανενεργός ηπατίτιδα Β» ήταν ασθενείς που εμφάνισαν στο παρελθόν ευρήματα ενεργότητας του ιού (αυξημένα επίπεδα HBV DNA, τρανσανισαιμία) και πήραν θεραπεία. Τη στιγμή συλλογής του δείγματος είχαν φυσιολογική ηπατική βιοχημεία και αρνητικό HBV DNA. Οι ασθενείς που κατατάχθηκαν στη κατηγορία «χρόνιος ανενεργός φορέας ηπατίτιδας Β» δεν εμφάνισαν ευρήματα ενεργότητας του ιού (αυξημένο HBV DNA, παθολογικές τρανσαμινάσες) μέχρι και την ημερομηνία συλλογής του δείγματος.

Πίνακας 67: Κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών με ηπατίτιδα Β.

Κατηγορίες ασθενών με HBV	Αριθμός Ασθενών (n=49)
Ενεργός ηπατίτιδα Β (ναι/όχι)	11/13
Χρόνιος ανενεργός φορέας ηπατίτιδας Β	25
Θεραπεία και έκβαση της	
Θεραπεία (ναι/όχι)	11/5
Μετά από θεραπεία	8
Ανταπόκριση στη θεραπεία (μετά από θεραπεία) (ναι/όχι)	3/5
Ανταπόκριση στη θεραπεία (υπό θεραπεία) (ναι/όχι)	6/5
Ιστοπαθολογοανατομικά ευρήματα	
Κίρρωση (ναι/όχι)	8/41
Ελάχιστη/ήπια φλεγμονώδη δραστηριότητα	9
Μέτρια/έντονη φλεγμονώδη δραστηριότητα	3
Ήπια ίνωση	7
Μέτρια ίνωση	6
Έντονη ίνωση	8

Από τις συγκρίσεις που έγιναν μεταξύ των ομάδων με ανενεργό ηπατίτιδα και ενεργό ηπατίτιδα Β δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στους δείκτες οξειδωτικού στρες. Εξαίρεση ήταν η οξειδωμένη γλουταθειόνη που ήταν σημαντικά υψηλότερη στην ενεργό ηπατίτιδα Β σε σχέση με την ανενεργό ηπατίτιδα Β [1(0,1-100) vs 10(0,1-30), $p=0.001$]. Από τις συγκρίσεις που έγιναν στις ομάδες ανενεργός ηπατίτιδα Β και χρόνιος ανενεργός φορέας της ηπατίτιδας Β δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές με εξαίρεση τη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης που βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη στους χρόνιους

ανενεργούς φορείς της ηπατίτιδας Β σε σχέση με τους ανενεργούς φορείς της ηπατίτιδας Β [4(0,1-34) vs 1,8(0,1-6), p=0.03].

Τα αποτελέσματα από τη σύγκριση της κάθε ομάδας με τους μάρτυρες, παρουσιάζονται στον Πίνακα 68. Οι ασθενείς με ενεργό ηπατίτιδα Β είχαν σε σχέση με τους μάρτυρες σημαντικά υψηλότερα επίπεδα οξειδωμένης γλουταθειόνης και δραστικότητα καταλάσης. Αντίθετα η ανηγμένη γλουταθειόνη ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τους μάρτυρες.

Οι ασθενείς με ανενεργό ηπατίτιδα Β είχαν σε σχέση με τους μάρτυρες στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων και αλδεϋδών. Αντίθετα τα επίπεδα της δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης ήταν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τους μάρτυρες.

Οι χρόνιοι ανενεργοί φορείς της ηπατίτιδας Β είχαν σε σχέση με τους μάρτυρες στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, αλδεϋδών και στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη δραστικότητα καταλάσης. Τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης ήταν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τους μάρτυρες.

Πίνακας 68: Δείκτες οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεϋδες, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και την 3-νιτροτυροσίνη και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τους υπόλοιπους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

	Μάρτυρες (n=75)	Ενεργός (n=11)	Χρόνιος ανενεργός φορέας (n=25)	Ανενεργός (n=13)
Ισοπροσάνια	1(0,2-3)	0,8(0,4-2,5)	0,9(0,5-5,8)	1,8(0,7-3,5)
Αλδεϋδες	0,4(0,1-2,5)	1,3(0,3-2,4)	2(0,2-5,1)****	0,8(0,3-2,1)***
3-Νιτροτυροσίνη	11(1,5-20)	5,7(3,5-15)	5,5(2,4-17)	4,3(3,4-38)
Πρωτεϊνικά καρβονύλια	2(0,14-10)	2,4(0,5-12)	3,2(0,07-13,5)**	3(0,4-24)**
Μυελουπεροξειδάση	11,4(1-214)	9(2,1-58)	14,3(1-222)	20(2-77)
Οξειδωμένη γλουταθειόνη	5(0,1-49)	2(0,9-100)**	10,4(1,1-56,7)	11(0,7-31)
Ανηγμένη γλουταθειόνη	1101 (81-5409)	450 (130-991)**	436 (21-954)***	499 (140-894)****
Υπεροξειδική δισμουτάση	42(8-68)	45(7-60)	49(3-61)	46(31-58)
Καταλάση	141(21-449)	210(105-528)**	235(7-477)***	211(30-285)**
Αναγωγή της γλουταθειόνης	2(0,08-13)	3,6(0,7-8,9)	3,1(0,17-12,4)	2,3(0,3-4,7)
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	4(0,3-31)	4(0,6-25)	4,1(0,2-33)	1,3(0,2-5,9)**

*0.1>p>0.05, **p≤0.05, ***p≤0.01, ****p≤0.001.

6.1. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη θεραπεία και την έκβαση της στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β.

Η σύγκριση ασθενών με βιοχημική ύφεση και βιοχημική δραστηριότητα, όπως επίσης και μεταξύ ασθενών που ανταποκρίθηκαν και δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία ανέδειξε παραπλήσιες διαφορές με τη σύγκριση των ασθενών που είχαν ενεργό και ανενεργό ηπατίτιδα Β. Οι ασθενείς που δεν είχαν λάβει ακόμη θεραπεία ήταν 5, εκ των οποίων μόνο ένας είχε αυξημένες τρανσαμινάσες τη στιγμή συλλογής του δείγματος. Η σύγκριση των ασθενών που δεν είχαν λάβει θεραπεία με τους μάρτυρες δεν ανέδειξε κάποια σημαντική διαφορά στους δείκτες οξειδωτικής βλάβης.

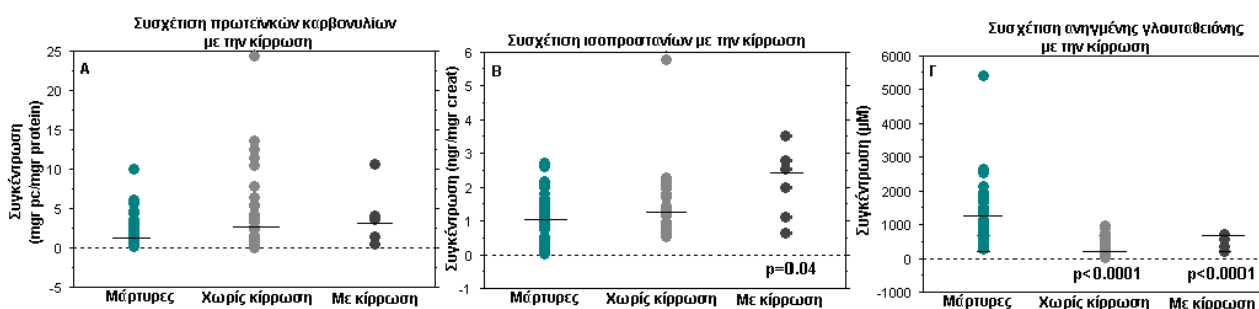
Οι ασθενείς που λήφθηκε το δείγμα κατά τη διάρκεια της θεραπείας δεν διέφεραν σε σχέση με τους ασθενείς που μελετήθηκαν μετά το πέρας της θεραπείας. Συγκριτικά με τους μάρτυρες, οι ασθενείς με ηπατίτιδα Β που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας ($n=11$) (6 ανταποκρίθηκαν και 5 δεν ανταποκρίθηκαν) παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα οξειδωμένης γλουταθειόνης [5(0,1-49) vs 12(1,2-32), $p=0.05$] και σημαντικά μειωμένα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης [1101(81-5409) vs 390(130-585), $p<0.0001$]. Οι ασθενείς με ηπατίτιδα Β ($n=8$) που μελετήθηκαν μετά τη διακοπή τη θεραπείας (3 ανταποκρίθηκαν και 5 δεν ανταποκρίθηκαν) είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων [2(0,14-10) vs 10(0,7-24), $p=0.02$] και σημαντικά μειωμένα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης [1101(81-5409) vs 431(140-991), $p=0.001$] σε σχέση με τους μάρτυρες.

6.2. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τα ιστοπαθολογοανατομικά ευρήματα στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β.

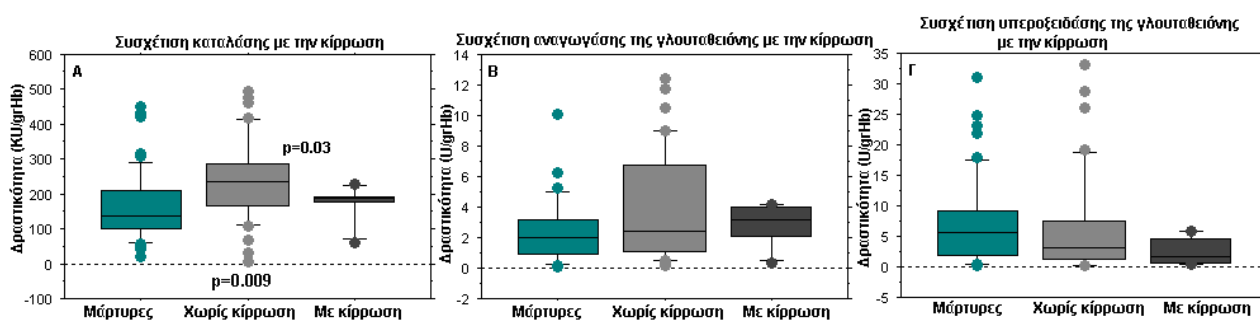
6.2.1. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με την κίρρωση στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β.

Οι κίρρωτικοί ($n=8$) ήταν πολύ λιγότεροι σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς ($n=41$). Οι μισοί των κίρρωτικών και το 15% των μη κίρρωτικών είχαν ενεργό ήκκό πολλαπλασιασμό. Οι ασθενείς που είχαν κίρρωση είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ισοπροστανίων σε σχέση με

τους μάρτυρες [2,4(0,5-3,4) vs 1(0,2-3), $p=0.04$], ενώ οι μη κίρρωτικοί δεν διέφεραν σημαντικά από τους μάρτυρες. Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια δεν παρατηρήθηκαν διαφορές (Διάγραμμα 73). Παρατηρήθηκε τάση πτώσης στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς (Διάγραμμα 74) ως προς τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο στην καταλάση, όπου η δραστικότητα της ήταν σημαντικά υψηλότερη στους μη κίρρωτικούς σε σχέση με τους κίρρωτικούς [240(2-500) vs 195(50-245), $p=0.03$] και σε σχέση με τους μάρτυρες [240(2-500) vs 141(21-449), $p=0.009$]. Τα επίπεδα της δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης παρουσίασαν τάση πτώσης (Διάγραμμα 74Γ) στους κίρρωτικούς και στους μη κίρρωτικούς σε σχέση με τους μάρτυρες.



Διάγραμμα 73: Διάγραμμα διασποράς. Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Διάγρ. 73A), ισοπροστανίων (Διάγρ. 73B) και ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγρ. 73Γ) σε σχέση με την κίρρωση, στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β. Στο διάγραμμα αναπαρίσταται η διάμεσος (οριζόντια γραμμή). Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τους υπόλοιπους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.



Διάγραμμα 74: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων σε σχέση με την κίρρωση, στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες (τιμή p στη βάση του box) και στις δυο ομάδες των ασθενών μεταξύ τους (τιμή p ανάμεσα στα box).

Όσον αφορά στη φλεγμονώδη δραστηριότητα, οι ασθενείς με μέτρια-έντονη φλεγμονώδη δραστηριότητα ήταν πολύ λίγοι στον αριθμό (n=3). Τα περισσότερα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης και οι περισσότερες δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων παρουσίαζαν τάση αύξησης στους ασθενείς που είχαν μέτρια/έντονη φλεγμονώδη δραστηριότητα σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν ελάχιστη/ήπια φλεγμονώδη δραστηριότητα. Δεν παρατηρήθηκαν όμως στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

7.Επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια.

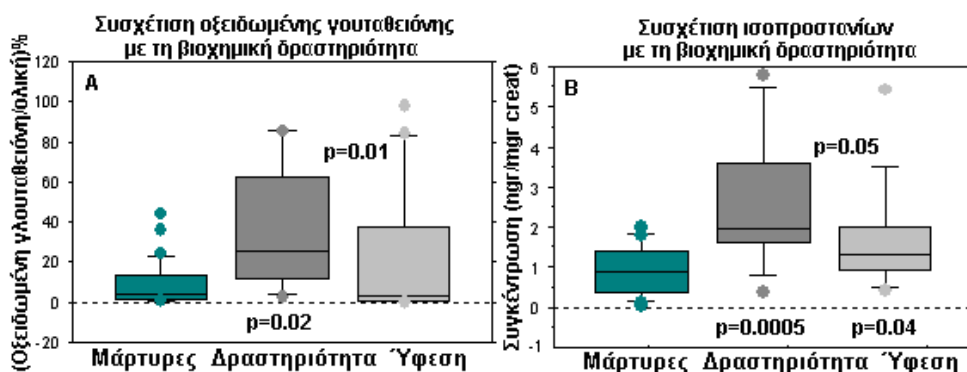
Μελετήθηκαν 29 ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια, 2 εκ των οποίων είχαν υποβληθεί σε βιοψία ήπατος. Κανένας από τους ασθενείς αυτούς δεν ελάμβανε ειδική θεραπεία για το νόσημα, πάρα μόνο συμπτωματική θεραπεία για την αντιμετώπιση των επιπλοκών της πυλαίας υπέρτασης (π.χ. διουρητικά για την αντιμετώπιση του ασκίτη). Τρεις από τους 29 ασθενείς είχαν παράλληλα και άλλα νοσήματα που σχετίζονται με το ήπαρ (2 είχαν ηπατίτιδα Β και 1 είχε ΠΧΚ). Οι δείκτες οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια συσχετίστηκαν με τα χαρακτηριστικά του Πίνακα 69.

Πίνακας 69: Κλινικοεργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με αλκοολική ηπατοπάθεια.

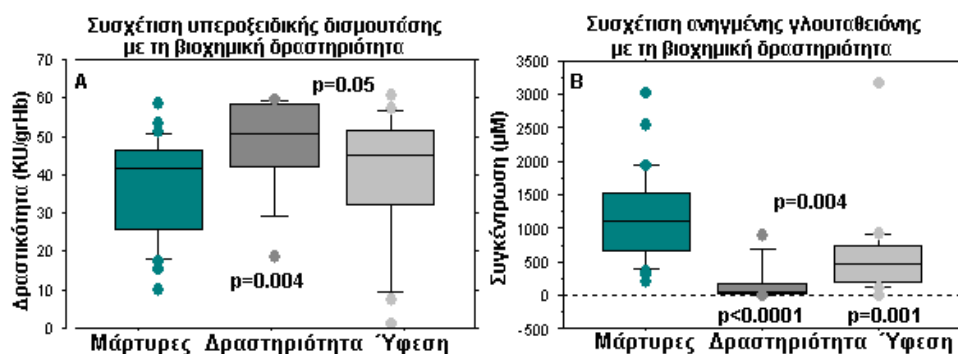
Κατηγορίες ασθενών	Αριθμός ασθενών (n=29)
Βιοχημική δραστηριότητα (ναι/όχι)	12/17
Κίρρωση (ναι/όχι)	24/5
Κίρρωση και βιοχημική δραστηριότητα (ναι/όχι)	9/15
Αντιρροπούμενη κίρρωση (ναι/όχι)	11/18

Οι ασθενείς που παρουσίαζαν βιοχημική δραστηριότητα τη στιγμή της αιμοληψίας είχαν σημαντικά υψηλότερη οξειδωμένη γλουταθειόνη, υψηλότερα επίπεδα ισοπροστανίων (Διάγραμμα 75) υψηλότερη δραστηριότητα υπεροξειδικής δισμουτάσης και χαμηλότερα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης σε σχέση με τους ασθενείς που ήταν σε βιοχημική ύφεση και σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 76, Πίνακας 70). Οι ασθενείς που παρουσίαζαν βιοχημική ύφεση είχαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης και σημαντικά αυξημένα επίπεδα

ισοπροστανίων σε σχέση με τους μάρτυρες. Στους υπόλοιπους δείκτες δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές.



Διάγραμμα 75: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα οξειδωμένης γλουταθειόνης (Διάγρ 75A) και ισοπροστανίων (Διάγρ 75B) σε ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια ανάλογα με την ύπαρξη βιοχημικής δραστηριότητας ή όχι. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες (τιμή p στη βάση του διαγράμματος) και στη σύγκριση μεταξύ των υποομάδων των ασθενών (τιμή p ανάμεσα στα box).



Διάγραμμα 76: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγρ.76A) και δραστηριότητας υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγρ. 76B) σε ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια ανάλογα με την ύπαρξη βιοχημικής δραστηριότητας ή όχι. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες (τιμή p στη βάση του διαγράμματος) και στη σύγκριση μεταξύ των υποομάδων των ασθενών (τιμή p ανάμεσα στα box).

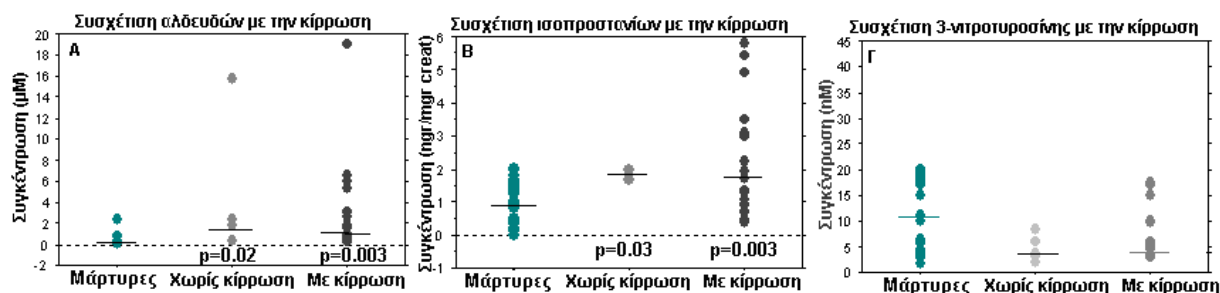
Δείκτες	Μάρτυρες (v=29)	Βιοχημική ύφεση (v=17)	Βιοχημική Δραστηριότητα (v=12)	Τιμή p μεταξύ ομάδων
---------	-----------------	------------------------	--------------------------------	------------------------

Οξειδωμένη γλουταθειόνη	5(0,1-49)	2(0,1-98)	25(0,1-88)**	p=0.01
Ισοπροστανία	0,8(0,2-2)	1,3(0,4-5,5)**	2(0,4-5,8)****	p=0.05
Ανηγμένη γλουταθειόνη	1101 (81-3000)	450(0,1-3200)****	200(1-990)****	p=0.004
Υπεροξειδική δισμουτάση	42(8-59)	45(0,1-62)	51(18-60)***	p=0.05

Πίνακας 70: Δείκτες οξειδωτικής βλάβης ανάλογα με την ύπαρξη βιοχημικής δραστηριότητας στους ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες (τιμή p δίπλα στα δεδομένα) και στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων των ασθενών (τιμή p στην τελευταία στήλη).

*0.1>p>0.05, **p≤0.05, ***p≤0.01, ****p≤0.001.

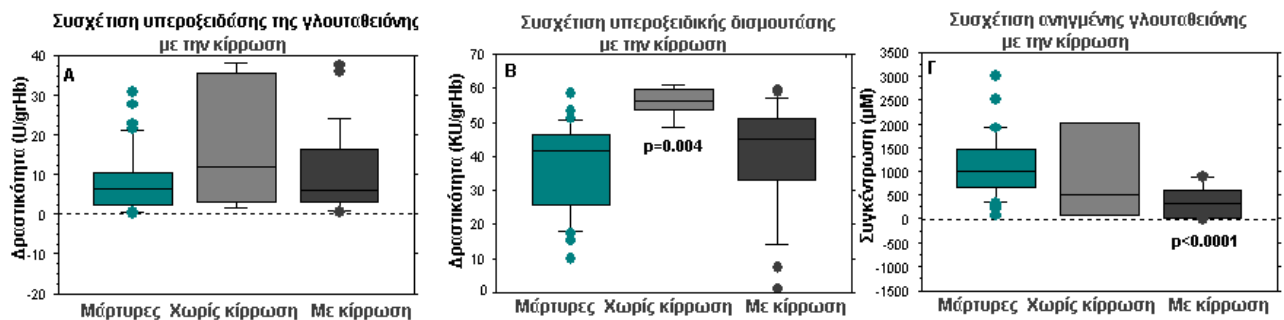
Οι κίρρωτικοί ασθενείς (n=5) ήταν λίγοι στον αριθμό συγκριτικά με τους μη κίρρωτικούς (n=24). Οι κίρρωτικοί παρουσίαζαν τάση αύξησης στα επίπεδα των αλδευδών (Διάγραμμα 77Α), των ισοπροστανίων (Διάγραμμα 77Β) και της 3-νιτροτυροσίνης (Διάγραμμα 77Γ) σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς κίρρωση. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες παρατηρήθηκαν στα ισοπροστανία (ΙΣΟ) και στις αλδεύδες (ΑΛΔ), τόσο στους ασθενείς με κίρρωση [ΙΣΟ:0,8(0,2-2) vs 1,7(0,4-5,9), p=0.003. ΑΛΔ: 0,3(0,1-2,5) vs 1,8(0,1-19), p=0.003] όσο και στους ασθενείς χωρίς κίρρωση [ΙΣΟ: 0,8(0,2-2) vs 1,9(1,8-2), p=0.03. ΑΛΔ: 0,3(0,1-2,5) vs 1,8(0,1-16), p=0.02] (Διάγραμμα 77).



Διάγραμμα 77: Διαγράμματα διασποράς: Επίπεδα προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης (Διάγρ. 77 Α ,Β) και 3-νιτροτυροσίνης (Διάγρ. 77Γ) σε σχέση με την κίρρωση στους ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια. Οι οριζόντιες γραμμές αναφέρονται στη διάμεσο. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεύδες και τη 3-νιτροτυροσίνη και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τα ισοπροστανία και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Οι κίρρωτικοί ασθενείς είχαν σημαντικά χαμηλότερη γλουταθειόνη [322(3-914) vs 1100(81-3000), p<0.0001] σε σχέση με τους μάρτυρες, ενώ οι μη κίρρωτικοί δεν διέφεραν σε σχέση με

τους μάρτυρες στην ίδια παράμετρο (Διάγραμμα 78Γ). Η υπεροξειδική δισμουτάση ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη στους μη κίρρωτικούς σε σχέση με τους μάρτυρες [56(48-61) vs 42(8-59), $p=0.004$]. Στους κίρρωτικούς υπήρχε τάση πτώσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς (Διάγραμμα 78B). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Διάγραμμα 78A).



Διάγραμμα 78: Διαγράμματα Whisker ή Box plot: Επίπεδα δραστικότητας υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Διάγρ. 78A), υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγρ. 78B) και ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγρ. 78Γ) σε σχέση με την κίρρωση στους ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Οι ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση ($n=18$) είχαν υψηλότερα επίπεδα αλδεϋδών, πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ισοπροστανίων και χαμηλότερα επίπεδα γλουταθειόνης σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν αντιρροπούμενη κίρρωση ($n=11$). Δεν παρατηρήθηκαν όμως, στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

8. Επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα

Επιλέχθηκαν για μελέτη συνολικά 35 ασθενείς: 18 ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, 10 ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα συνυπάρχουσα με πρωτοπαθής χολική κίρρωση πιθανή ή αρχικού σταδίου νόσημα και 7 ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδης διήθηση, στους οποίους δεν είχε γίνει βιοψία για να εκτιμηθεί ο βαθμός ίνωσης και η φλεγμονώδης δραστηριότητα. Οι ασθενείς με λιπώδης διήθηση είχαν φυσιολογικές τρανσαμινάσες.

Από τους 35 ασθενείς, 10 ασθενείς ελάμβαναν ουρσοδεοξυλικό οξύ και 29 είχαν υποβληθεί σε πρόσφατη βιοψία. Οι δείκτες οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα συσχετίστηκαν με τα χαρακτηριστικά του Πίνακα 70. Οι ασθενείς με ΜΑΣΗ και ΠΧΚ συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη γιατί οι ασθενείς με ΠΧΚ είχαν αρχικού σταδίου νόσημα.

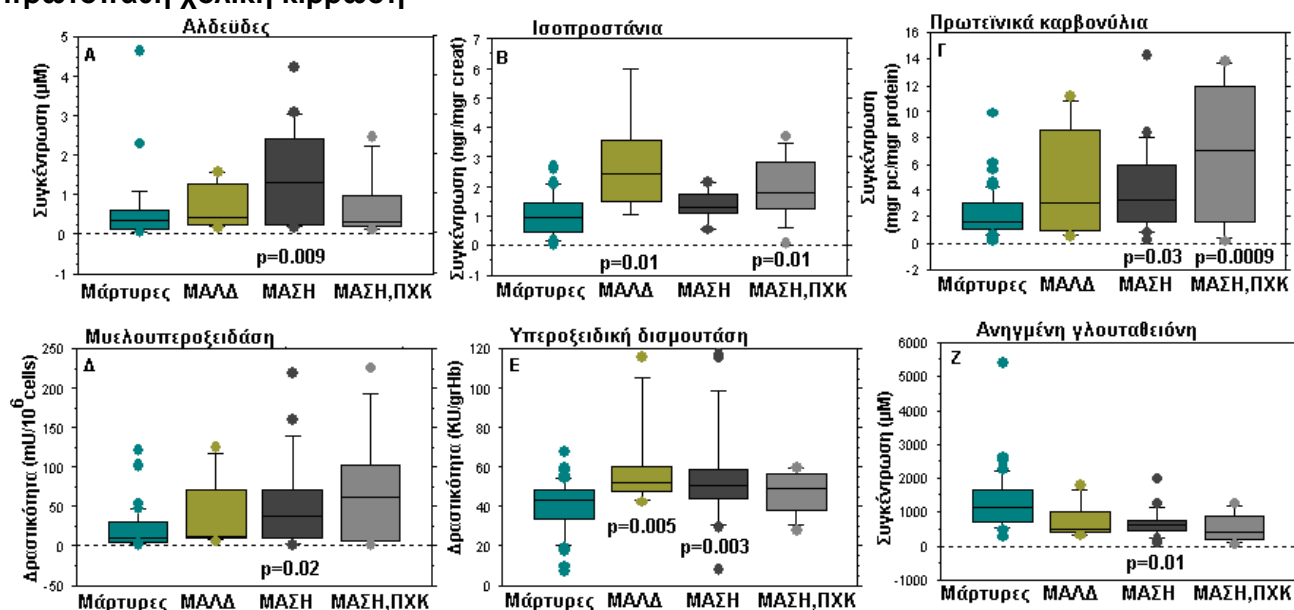
Πίνακας 70: Κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα.

Κατηγορίες	Αριθμός ασθενών (n=35)
Εργαστηριακά ευρήματα	
Βιοχημική δραστηριότητα (ναι/όχι)	13/22
Ιστοπαθολογοανατομικά ευρήματα	
Ελάχιστη ίνωση	7
Ήπια ίνωση	14
Μέτρια ίνωση	5
Έντονη ίνωση	2
Ελάχιστη/ήπια φλεγμονώδη δραστηριότητα	21
Μέτρια/έντονη φλεγμονώδη δραστηριότητα	1

Οι ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδης διήθηση (ΜΑΛΔ) είχαν υψηλότερα επίπεδα ισοπροστανίων (Διάγραμμα 79B) και υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγραμμα 79E) σε σχέση με τους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (ΜΑΣΗ) και σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ισοπροστανίων [2,5(1,1-6) vs 1(0,17-2,8), p=0.01] και υπεροξειδικής δισμουτάσης [52(42-116) vs 42(8-68), p=0.005] (Διάγραμμα 79E) συγκριτικά με μάρτυρες. Οι ασθενείς με ΜΑΣΗ είχαν υψηλότερη τιμή στις αλδεΐδες σε σχέση με τους ασθενείς με ΜΑΛΔ και διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες [1,3(1,1-4) vs 0,4(0,2-4,6), p=0.009] (Διάγραμμα 79A). Οι ασθενείς με ΜΑΣΗ παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με μάρτυρες στα πρωτεϊνικά καρβονύλια [3(0,2-14) vs 1,8(0,14-10), p=0.03] (Διάγραμμα 79Γ), στη δραστικότητα της

υπεροξειδικής δισμουτάσης [50(8-118) vs 42(8-68), $p=0.003$] (Διάγραμμα 79Ε), της ΜΡΟ [37(1,6-221) vs 11,4(1-125), $p=0.02$] (Διάγραμμα 79Δ) και στην ανηγμένη γλουταθειόνη [610(77-1992) vs 1101(91-5409), $p=0.01$] (Διάγραμμα 79Ζ). Οι ασθενείς με ΜΑΣΗ και ΠΧΚ παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με μάρτυρες στα πρωτεϊνικά καρβονύλια [7,1(0,16-13,8) vs 1,8(0,14-10), $p=0.0009$] (Διάγραμμα 79Γ) και στα ισοπροστάνια [1,7(0,08-3,7) vs 1(0,17-2,8), $p=0.01$] (Διάγραμμα 79Β).

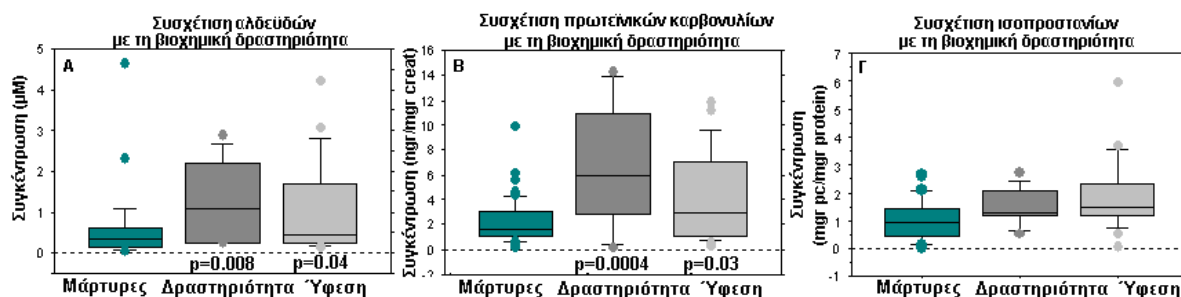
Επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, μη αλκοολική λιπώδης διήθηση και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα συνυπάρχουσα με πρωτοπαθή χολική κίρρωση



Διάγραμμα 79: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα προϊόντων οξειδωτικής βλάβης (A: αλδεύδες, B: ισοπροστάνια, Γ: πρωτεϊνικά καρβονύλια), οξειδωτικοί παράγοντες (Δ: Μυελοπεροξειδάση) και αντιοξειδωτικοί παράγοντες (E: Υπεροξειδική δισμουτάση και Z: Ανηγμένη γλουταθειόνη) σε ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, μη αλκοολική λιπώδης διήθηση και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα συνυπάρχουσα με πρωτοπαθή χολική κίρρωση. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεύδες και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τους υπόλοιπους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

8.1. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με δείκτες ηπατικής βλάβης σε ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα.

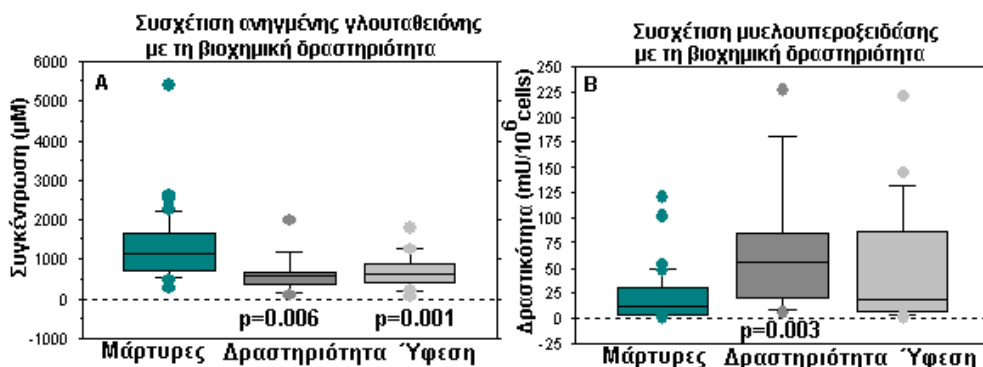
Στη συσχέτιση των δεικτών οξειδωτικού στρες με τη βιοχημική δραστηριότητα αφαιρέθηκαν οι ασθενείς που είχαν μη αλκοολική λιπώδης διήθηση. Οι ασθενείς που παρουσίαζαν βιοχημική δραστηριότητα (v=13) παρουσίασαν τάση αύξησης των επιπέδων των αλδευδών, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, των ισοπροστανίων (Διάγραμμα 80), της δραστικότητας της MPO (Διάγραμμα 81B) της υπεροξειδικής δισμουτάσης, της καταλάσης και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (Διάγραμμα 82) και τάση μείωσης των επιπέδων της γλουταθειόνης (Διάγραμμα 81A) σε σχέση με τους ασθενείς που βρισκόταν σε βιοχημική ύφεση (v=15). Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ήταν σημαντικά υψηλότερα συγκριτικά με μάρτυρες, τόσο στους ασθενείς με βιοχημική ύφεση [3(0,2-12) vs 1,8(0,14-10), p=0.03], όσο και στους ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα [5(0,5-14,3) vs 1,8(0,14-10), p=0.0004]. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στα επίπεδα των αλδευδών στη σύγκριση με τους μάρτυρες στους ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα [1(0,1-2,8) vs 0,4(0,2-4,8), p=0.008] και στους ασθενείς με βιοχημική ύφεση [0,4(0,1-4,2) vs 0,4(0,2-4,8), p=0.04].



Διάγραμμα 80: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα προϊόντων οξειδωτικής βλάβης (Διάγρ. 80A: αλδεϋδες, Διάγρ. 80B: ισοπροστανία, Διάγρ. 80Γ: πρωτεϊνικά καρβονύλια) σε σχέση με τα εργαστηριακά ευρήματα στους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεϋδες και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τα ισοπροστανία και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

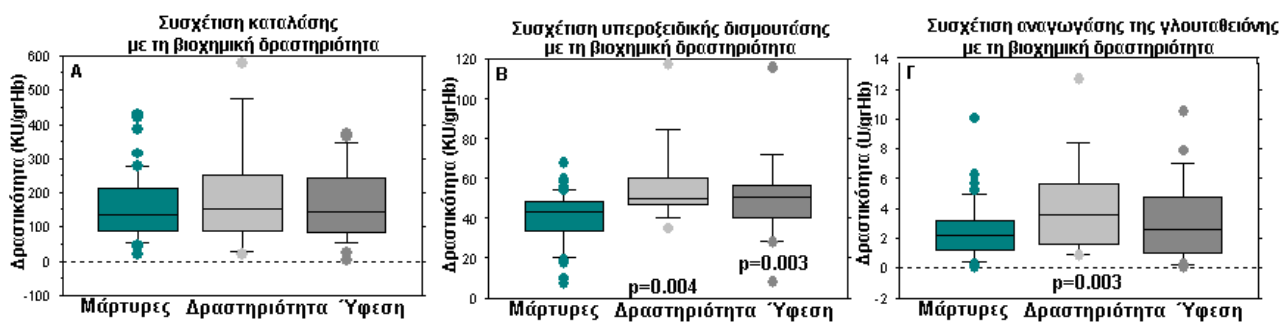
Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης σε σχέση με τους μάρτυρες, τόσο στους ασθενείς που παρουσίαζαν βιοχημική ύφεση [587(191-1815) vs 1101(91-5409), p=0.001], όσο και στους ασθενείς που παρουσίαζαν βιοχημική δραστηριότητα [602(77-1992) vs 1101(91-5409), p=0.006] (Διάγραμμα 81A). Στη MPO παρατηρήθηκε σημαντική

αύξηση σε σχέση με μάρτυρες μόνο στους ασθενείς που βρισκόταν σε βιοχημική δραστηριότητα [51(4,5-225) vs 11(1-125), $p=0.003$] (Διάγραμμα 81B).



Διάγραμμα 81: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστικότητας MPO (Διάγρ. 84A) και ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγρ. 84B) σε σχέση με τα εργαστηριακά ευρήματα σε ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

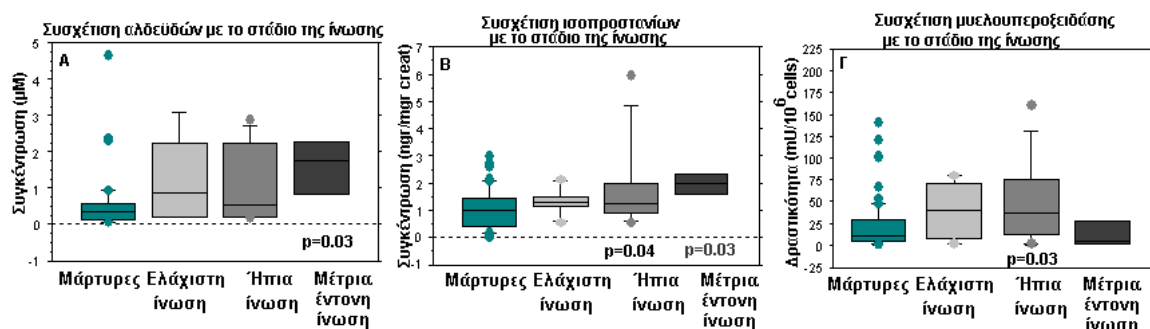
Η δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τους μάρτυρες τόσο στους ασθενείς με βιοχημική ύφεση [52(8-116) vs 42(8-68), $p=0.003$], όσο και στους ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα [51(37-118) vs 42(8-68), $p=0.004$] (Διάγραμμα 82B). Η δραστικότητα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με μάρτυρες μόνο στους ασθενείς που βρισκόταν σε βιοχημική δραστηριότητα [3,8(0,94-13) vs 2(0,08-10), $p=0.003$] (Διάγραμμα 82Γ).



Διάγραμμα 82: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστικότητας καταλάσης (Διάγρ. 82A), υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγρ. 82B) και αναγωγάσης της γλουταθειόνης (Διάγρ. 82Γ) σε σχέση με τα εργαστηριακά ευρήματα, σε ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

8.2. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με το στάδιο της ίνωσης στους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα.

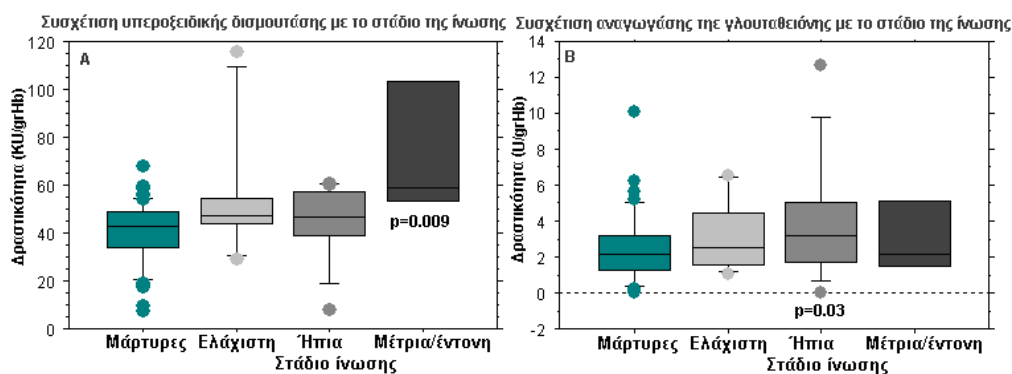
Οι ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδης διήθηση (v=7) δεν είχαν υποβληθεί σε βιοψία. Από τους υπόλοιπους ασθενείς μόνο δυο από τους 28 που υποβλήθηκαν σε βιοψία είχαν έντονη ίνωση. Όταν ελέγχθηκε το στάδιο της ίνωσης στο σύνολο των ασθενών παρατηρήθηκαν τα εξής. Τα ισοπροστανία, οι αλδεΐδες και η MPO παρουσίαζαν τάση αύξησης παράλληλα με το βαθμό της ίνωσης (Διάγραμμα 83). Συγκριτικά με μάρτυρες, οι ασθενείς με μέτρια/έντονη ίνωση είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα αλδεϋδών [1,8(0,9-2,2) vs 0,3(0,01-4,7), p=0.03] και ισοπροστανίων [2(1,5-2,3) vs 1(0,2-3), p=0.03]. Οι ασθενείς με ήπια ίνωση παρουσίαζαν επίσης σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους μάρτυρες στα ισοπροστανία [1,25(0,5-6) vs 1(0,2-3), p=0.04] και στη MPO [38(1-165) vs 11(1-130), p=0.03] αλλά όχι στις αλδεΐδες.



Διάγραμμα 83: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα προϊόντων οξειδωτικής βλάβης (Διάγρ. 83A: Ισοπροστανία, Διάγρ. 83B: αλδεΐδες) και οξειδωτικών παραγόντων (Διάγρ. 83Γ: Μυελοϋπεροξειδάση) στους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεΐδες και με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” για τους άλλους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Ως προς τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών, η γλουταθειόνη ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους ασθενείς με ήπιο στάδιο ίνωσης σε σχέση με τους μάρτυρες [510(125-1000) vs 1101(91-5409), p=0.03]. Παρατηρήθηκε τάση αύξησης στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης, ενώ η δραστικότητα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης αυξάνεται στο ήπιο στάδιο της ίνωσης και μειώνεται στο στάδιο με μέτρια/έντονη ίνωση (Διάγραμμα 84B). Στην υπεροξειδική δισμουτάση, η υψηλότερη δραστικότητα παρατηρήθηκε στους ασθενείς που είχαν μέτρια-έντονη ίνωση που διέφερε σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες [59(53-105) vs 42(8-68), p=0.009]. Ως προς την αναγωγάση της γλουταθειόνης, η

δραστηκότητα της ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τους μάρτυρες, μόνο στο ήπιο στάδιο της ίνωσης [3(0,1-13) vs 2(0,08-10), $p=0.03$].

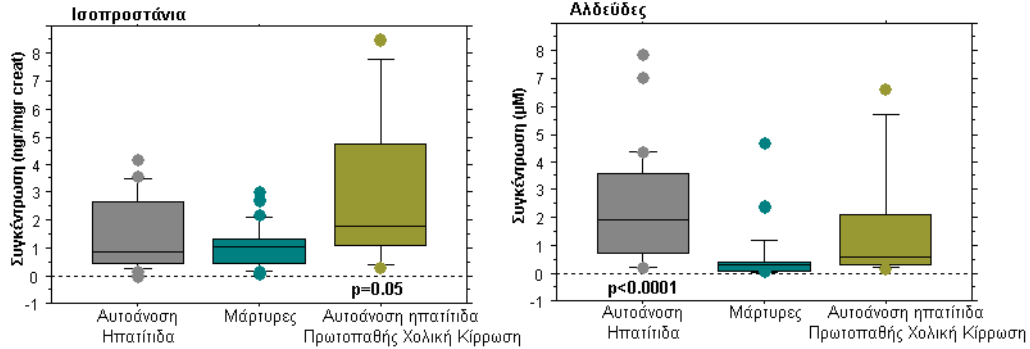


Διάγραμμα 84: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστηκότητας υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγρ. 84A) και αναγωγάσης της γλουταθειόνης (Διάγρ. 84B) στους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

9. Επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα

Επιλέχθηκαν για μελέτη 36 ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα, εκ των οποίων 7 ασθενείς είχαν και πρωτοπαθή χολική κίρρωση σταδίου 1-2. Αρχικά οι δείκτες οξειδωτικού στρες αναλύθηκαν μεταξύ των ομάδων ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα και ασθενών με σύνδρομο επικάλυψης αυτοάνοσης ηπατίτιδας με πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΑΙΗ+ΠΧΚ). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των 2 ομάδων με εξαίρεση τα επίπεδα των ισοπροστανίων και των αλδευδών. Τα ισοπροστανία ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τους μάρτυρες μόνο στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και πρωτοπαθή χολική κίρρωση [1,8(0,3-8,5) vs 1(0,02-3), $p=0.05$], ενώ τα επίπεδα των αλδευδών ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τους μάρτυρες μόνο στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα [1,7(0,2-7,9) vs 0,3(0,05-4,7), $p<0.0001$] (Διάγραμμα 85).

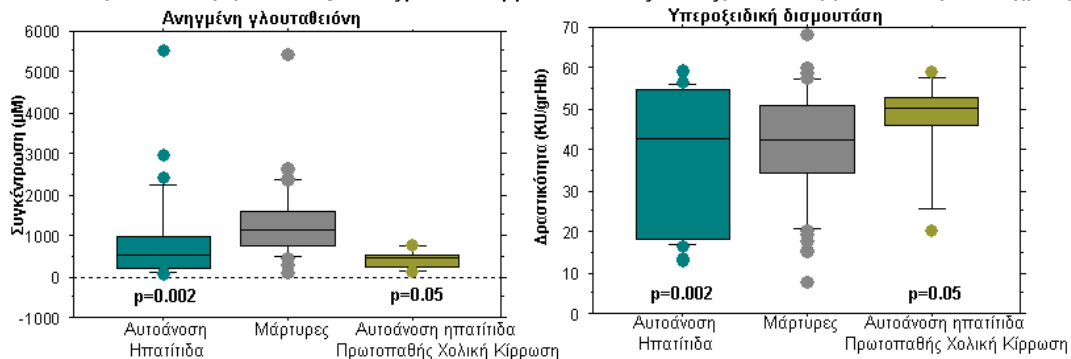
Επίπεδα προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και πρωτοπαθή χολική κίρρωση



Διάγραμμα 85: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και πρωτοπαθή χολική κίρρωση. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεϋδες και με τη μέθοδο “Mann Whitney” για τα ισοπροστανάκια και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Στατιστικώς σημαντικά διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες και στις δυο ομάδες, παρατηρήθηκαν στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης και στη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Διάγραμμα 86).

Επίπεδα αντιοξειδωτικών παραγόντων στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και πρωτοπαθή χολική κίρρωση



Διάγραμμα 86: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα αντιοξειδωτικών παραγόντων στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και πρωτοπαθή χολική κίρρωση. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Οι ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με τα παρακάτω χαρακτηριστικά (Πίνακας 71). Ως προς τη φλεγμονώδη δραστηριότητα δεν συλλέχθηκαν πληροφορίες από τις βιοψίες γιατί στο διάστημα από την πιο πρόσφατη βιοψία σημειώθηκε αλλαγή στην κλινικοεργαστηριακή κατάσταση των ασθενών (ορισμένοι μπήκαν σε θεραπεία και ορισμένοι υποτροπίασαν).

Πίνακας 71: Εργαστηριακά, κλινικά και ιστοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα.

Κατηγορίες	Αριθμός ατόμων (n=36)
Θεραπεία	
Θεραπεία (ναι/όχι)	34/2
Ανταπόκριση στη θεραπεία (ναι/όχι)	23/11
Εργαστηριακά ευρήματα	
Βιοχημική δραστηριότητα (ναι/όχι)	17/19
Ιστοπαθολογοανατομικά ευρήματα	
Κίρρωση (ναι/όχι)	10/26
Αντιρροπούμενη κίρρωση (ναι/όχι)	2/8
Ήπια ίνωση	14
Μέτρια ίνωση	6
Έντονη ίνωση	10

9.1. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη θεραπεία και την έκβαση της στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα.

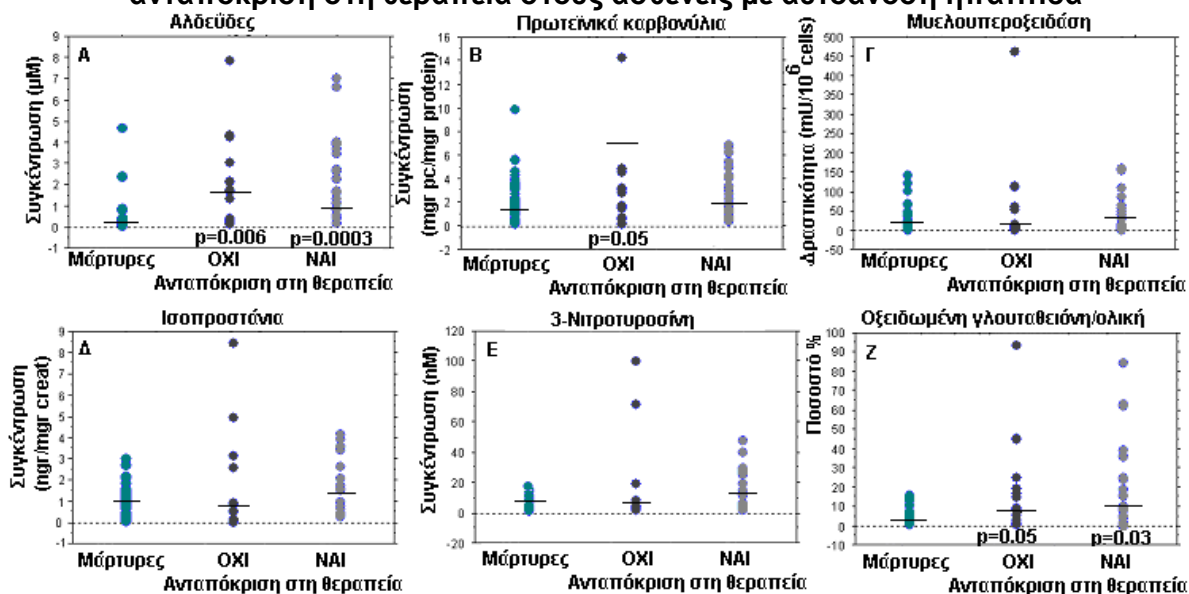
Οι ασθενείς που δεν έπαιρναν θεραπεία ήταν δυο. Οι ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία (n=11) παρουσίαζαν τάση αύξησης στα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης και στη δραστηριότητα της MPO σε σχέση με τους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία (n=23) και σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 87, Πίνακας 72).

Πίνακας 72: Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικής βλάβης σε σχέση με τη θεραπεία και την έκβαση της, στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Παράμετροι	Μη ανταπόκριση (n=11)	Ανταπόκριση (n=23)	Μάρτυρες (n=41)
Ισοπροστάνια	0,9(0,01-8,5)	1,2(0,4-4,2)	1(0,02-3)
Αλδεϋδες	1,7(0,2-7,9)***	0,8(0,17-7)****	0,3(0,05-4,7)
3-νιτροτυροσίνη	6,5(2-100)	12(1,6-48)	9(1,5-20)
Πρωτεϊνικά καρβονύλια	6,7(0,14-14)**	1,9(0,46-6,3)	1,8(0,1-9,9)
Μυελουπεροξειδάση	9,7(1,2-463)	12(1,5-160)	12(1-141)
Οξειδωμένη γλουταθειόνη/ολική	6,7(0,3-93)**	7,9(0,1-85)**	4,3(0,2-15)

*0.1>p>0.05, **p<0.05, ***p<0.01, ****p<0.001.

Συσχέτιση προϊόντων οξειδωτικής βλάβης και οξειδωτικών παραγόντων με την ανταπόκριση στη θεραπεία στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα



Διάγραμμα 87: Διάγραμμα διασποράς. Επίπεδα προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης (Διάγρ. 87A, Δ), οξειδωσης πρωτεϊνών (Διάγρ. 87B, E), MPO (Διάγρ. 87Γ) και οξειδωμένης γλουταθειόνης (Διάγρ. 87Z) σε σχέση με τη θεραπεία και την έκβαση της στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα. Απεικονίζεται η διάμεσος (οριζόντια γραμμή). Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεΐδες, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και τη 3-νιτροτυροσίνη και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τους υπόλοιπους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες

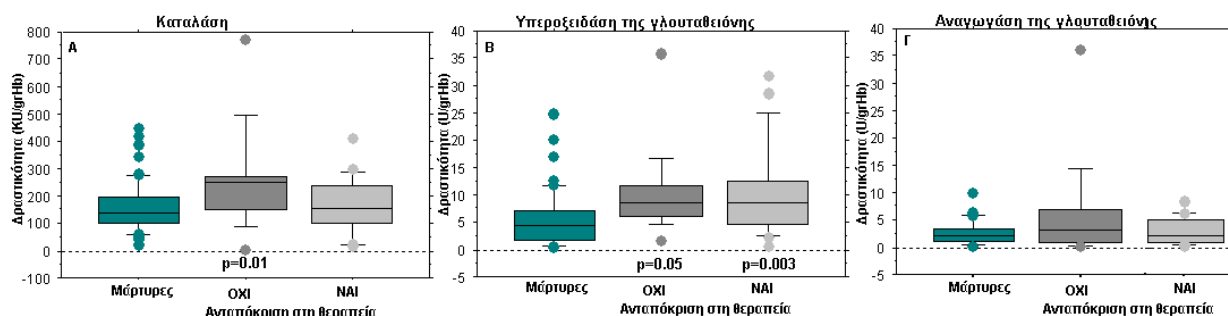
Ως προς τα επίπεδα της δραστικότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων παρατηρήθηκαν τα παρακάτω: Η δραστικότητα της καταλάσης ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τους μάρτυρες στους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία, ενώ στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία δεν διέφερε σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 88A, Πίνακας 73). Η δραστικότητα της υπεροξειδάσης και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης παρουσίαζε τάση αύξησης στους ασθενείς που δεν είχαν ανταποκριθεί στη θεραπεία σε σχέση με τους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν και σε σχέση με τους μάρτυρες. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τους μάρτυρες, τόσο στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν, όσο και στους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία (Διάγραμμα 88B, Πίνακας 73).

Πίνακας 73: Συσχέτιση δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων σε σχέση με τη θεραπεία και την έκβαση της, στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Παράμετροι	Μη ανταπόκριση (v=11)	Ανταπόκριση (v=23)	Μάρτυρες (v=41)
Καταλάση	236(5-772)***	148(17-409)	146(40-449)
Υπεροξειδική δισμουτάση	24(13-59)	45(13-59)	44(8-68)
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	8,9(1,6-36)**	8,9(0,6-33)***	3,6(0,3-25)
Αναγωγή της γλουταθειόνης	2,6(0,1-36)	2,3(0,24-8)	2,4(0,1-10)
Γλουταθειόνη	519(88-5541)****	800(51-1033)**	1135(293-5409)

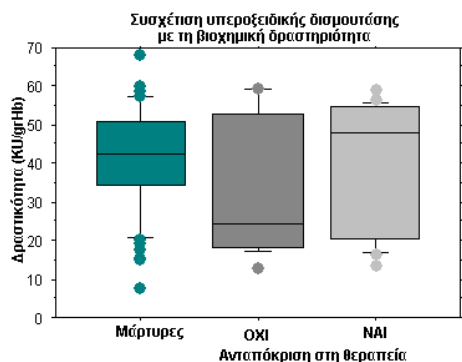
*0.1>p>0.05, **p≤0.05, ***p≤0.01, ****p≤0.001.

Συσχέτιση δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων με τη θεραπεία και την έκβαση της στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα.



Διάγραμμα 88: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων (Διάγρ. 88A:καταλάση, Διάγρ.88B:Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, Διάγρ. 88Γ: Αναγωγή της γλουταθειόνης) στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα, σε σχέση με τη θεραπεία και την έκβαση της. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Η διάμεσος τιμή της υπεροξειδικής δισμουτάσης παρουσίαζε τάση μείωσης στους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντίθετα, η διάμεσος τιμή στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία παρουσίαζε τάση αύξησης σε σχέση με τους μάρτυρες. Το εύρος όμως δεν παρουσίαζε κάποιες διαφορές στις συγκεκριμένες ομάδες (Διάγραμμα 89).



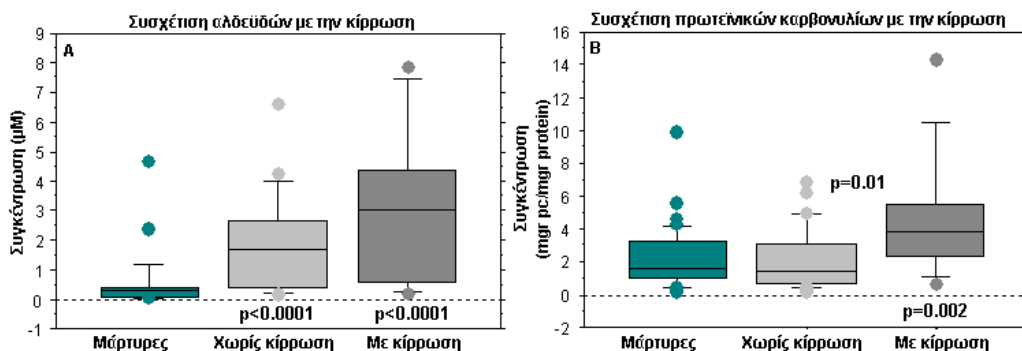
Διάγραμμα 89: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστηριότητας υπεροξειδικής δισμουτάσης στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα σε σχέση με τη θεραπεία και την έκβαση της.

9.2.Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με την παρουσία βιοχημικής δραστηριότητας στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα.

Οι ασθενείς που είχαν αυξημένες τρανσαμινάσες ($n=17$) συνέχισαν να έχουν σε δραστηριότητα το νόσημα και θεωρείται ότι δεν παρουσίασαν ανταπόκριση στη θεραπεία, ενώ οι ασθενείς που είχαν φυσιολογικές τρανσαμινάσες ($n=19$) θεωρείται ότι ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία. Η σύγκριση αυτών των δυο ομάδων παρουσίασε τις ίδιες διαφορές που παρατηρήθηκαν στη σύγκριση ασθενών με μη ανταπόκριση στη θεραπεία με τους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία (Παράγραφος 9.1).

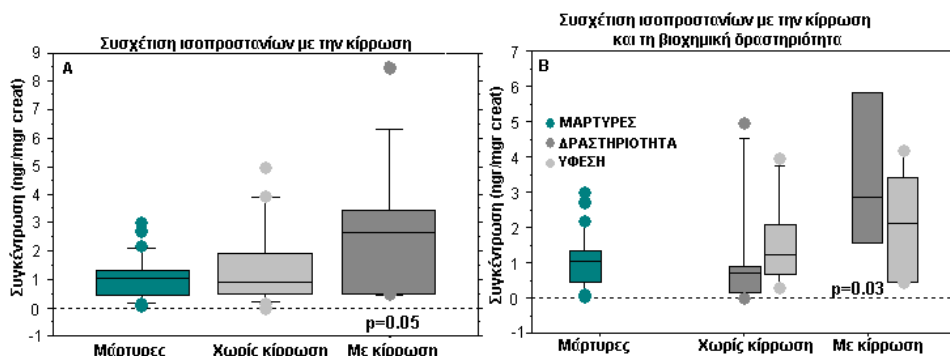
9.3.Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με την παρουσία κίρρωσης στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα.

Οι ασθενείς που είχαν κίρρωση ($n=10$) είχαν υψηλότερα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης (πρωτεϊνικά καρβονύλια, ισοπροσάνια, αλδεΐδες) σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς ($n=26$). Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ κίρρωτικών και μη κίρρωτικών παρατηρήθηκε στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων [$3,8(0,1-14,5)$ vs $1,5(0,2-6,8)$, $p=0.01$] (Διάγραμμα 90).



Διάγραμμα 90: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα αλδευδών (Διάγρ. 90A) και πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Διάγρ. 90B) σε σχέση με την κίρρωση στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες (τιμή p στη βάση του διαγράμματος) και στη σύγκριση των ομάδων των ασθενών μεταξύ τους (τιμή p ανάμεσα στα box).

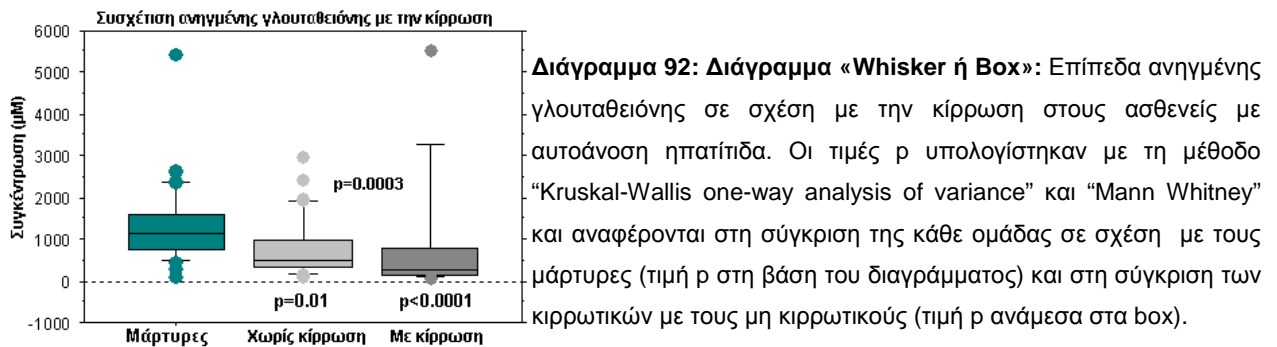
Τα ισοπροστάνια παρουσίαζαν τάση αύξησης στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς. Οι κίρρωτικοί είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους μάρτυρες [2,6(0,44-8,5) vs 1(0,02-3), p=0.05], ενώ οι μη κίρρωτικοί δεν διέφεραν με τους μάρτυρες. Στους κίρρωτικούς, η σημαντική διαφορά σε σχέση με τους μάρτυρες εστιάστηκε στους ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα [2,8(1,5-5,8) vs 1(0,02-3), p=0.03]. Οι ασθενείς που παρουσίαζαν βιοχημική ύφεση και είχαν κίρρωση δεν διέφεραν σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 91).



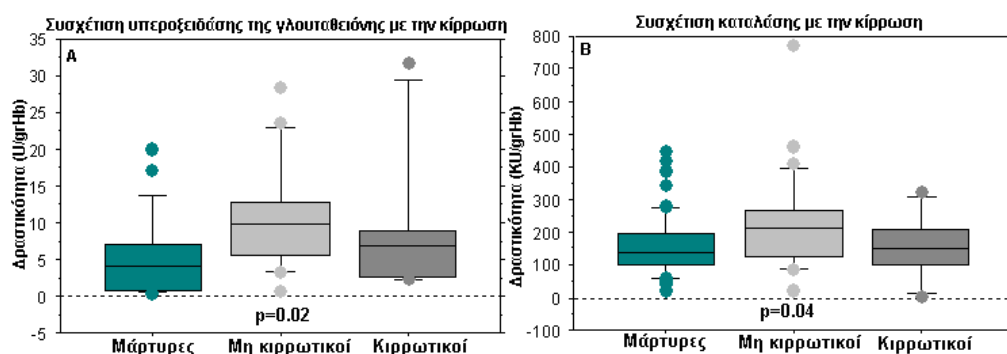
Διάγραμμα 91: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα ισοπροστανίων σε σχέση με την κίρρωση (Διάγρ. 91A) και σε σχέση με την κίρρωση και τη βιοχημική δραστηριότητα (Διάγρ. 91B) στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Στα υπόλοιπους δείκτες οξειδωτικής βλάβης (3-νιτροτυροσίνη, μυελουπεροξειδάση, 8-υδρόξυ-δεοξυγουανασίνη και οξειδωμένη γλουταθειόνη) δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές.

Συγκριτικά με τους μάρτυρες, τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τους μάρτυρες στους κίρρωτικούς [293(51-5541) vs 1135(293-5409), $p < 0.0001$] και στους μη κίρρωτικούς [511(88-2977) vs 1135(293-5409), $p = 0.01$]. Οι κίρρωτικοί είχαν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα γλουταθειόνης σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς [293(51-5541) vs 511(88-2977), $p = 0.0003$] (Διάγραμμα 92).



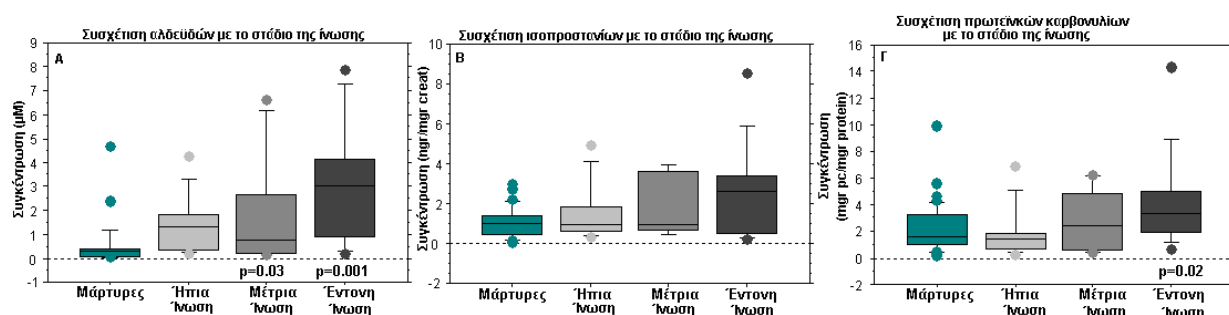
Τα επίπεδα της δραστικότητας της καταλάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, παρουσίαζαν τάση μείωσης στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς. Συγκριτικά με τους μάρτυρες, οι μη κίρρωτικοί είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα δραστικότητας υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης [7(0,6-29) vs 3,6(0,3-20), $p = 0.02$] και καταλάσης [215(22-772) vs 146(40-449), $p = 0.04$] ενώ οι κίρρωτικοί δεν διέφεραν σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 93).



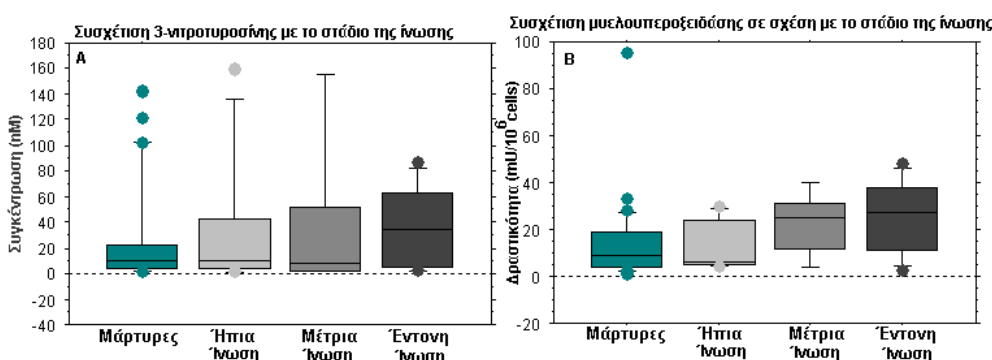
Διάγραμμα 93: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Διάγρ. 93A) και της καταλάσης (Διαγρ. 93B) σε σχέση με την κίρρωση στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

9.3. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα.

Ο βαθμός της ίνωσης ελέγχθηκε στους ασθενείς που παρουσίαζαν βιοχημική ύφεση (n=19). Οκτώ ασθενείς είχαν ελάχιστη ίνωση, 5 ασθενείς είχαν μέτρια ίνωση και 6 ασθενείς είχαν έντονη ίνωση. Παρατηρήθηκε τάση αύξησης στα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης (αλδεΐδες, ισοπροστανίνα, πρωτεϊνικά καρβονύλια, 3-νιτροτυροσίνη, δραστικότητα της μυελουπεροξειδάσης) παράλληλα με την αύξηση του βαθμού της ίνωσης (Διάγραμμα 94 και 95). Στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο σε σχέση με τους μάρτυρες στους ασθενείς με μέτρια ίνωση, στα επίπεδα των αλδεϋδών [0,9(0,17-6,6) vs 0,3(0,05-4,7), $p=0.03$] και στους ασθενείς με έντονη ίνωση στα επίπεδα των αλδεϋδών [3(0,2-7,8) vs 0,3(0,05-4,7), $p=0.001$] και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων [3,8(0,6-14) vs 1,8(0,1-9,9), $p=0.02$].

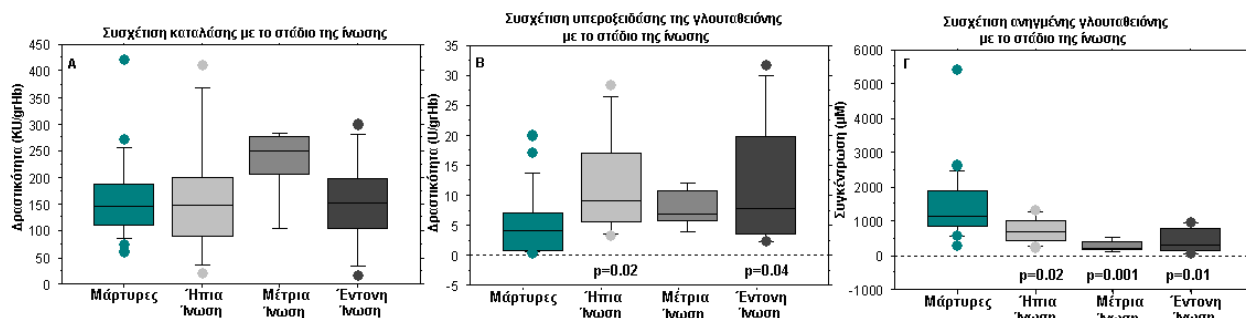


Διάγραμμα 94: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα αλδεϋδών (Διάγρ. 94A) ισοπροστανίων (Διάγρ. 94B) και πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Διάγρ. 94Γ) σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” για τα ισοπροστανίνα και με τη μέθοδο ANOVA για τους λοιπούς δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.



Διάγραμμα 95: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα 3-νιτροτυροσίνης (Διάγρ. 95A) και MPO (Διάγρ. 95B) σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και τους μάρτυρες.

Ως προς τη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Διάγραμμα 96) παρατηρήθηκε τάση αύξησης στη δραστικότητα της καταλάσης με την αύξηση του βαθμού της ίνωσης μέχρι το μέτριο στάδιο της ίνωσης και μείωση από το μέτριο μέχρι το έντονο στάδιο της ίνωσης (Διάγραμμα 96Α). Στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των διαφόρων σταδίων της ίνωσης (Διάγραμμα 96Β). Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση σε σχέση με τους μάρτυρες τόσο στο ήπιο στάδιο της ίνωσης [9(3-29) vs 4,9(0,3-20), $p=0.02$] όσο και στο έντονο στάδιο της ίνωσης [7,5(2,2-32) vs 4,9(0,3-20), $p=0.04$]. Στην ανηγμένη γλουταθειόνη παρατηρήθηκε προοδευτική σημαντική μείωση των επιπέδων συγκριτικά με τους μάρτυρες, με την αύξηση του βαθμού της ίνωσης (Διάγραμμα 96Γ).



Διάγραμμα 96: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστικότητας καταλάσης (Διάγρ. 96Α) υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Διάγρ. 96Β) και ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγρ. 96Γ) σε σχέση με το στάδιο της ίνωσης στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

10. Επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα του ήπατος.

Επιλέχθηκαν για μελέτη 41 ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ), 8 ασθενείς με πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ) και 10 ασθενείς με ΠΧΚ συνυπάρχουσα με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (ΜΑΣΗ). Τα κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά τους αναγράφονται στον Πίνακα 74. Οι ασθενείς με ΠΧΚ δεν διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΚ και ΜΑΣΗ και σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΣΧ στους υπό μελέτη δείκτες οξειδωτικού στρες. Συγκριτικά με τους μάρτυρες, οι ασθενείς με ΠΣΧ παρουσίαζαν σημαντική αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων [7(2-16) vs 1,6(0,1-9,9), $p=0.002$]. Αντίθετα, οι ασθενείς με ΠΧΚ παρουσίαζαν σημαντική μείωση στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης [475(4-2743) vs 1101(276-5409), $p<0.0001$] και σημαντική αύξηση σε σχέση με τους μάρτυρες, στη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης [51(14-78) vs 43(8-68), $p=0.006$], των επιπέδων των ισοπροστανίων [1,8(0,18-3,7) vs 1(0,01-2,7), $p<0.0001$], των αλδευδών [1,2(0,1-3,8) vs 0,3(0,05-4,7), $p=0.0002$], της 3-νιτροτυροσίνης [13,5(1,3-70) vs 10,5(1,5-20), $p=0.05$] και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων [4,1(0,01-21) vs 1,6(0,1-9,9), $p=0.0008$]. Οι ασθενείς με ΠΧΚ συνυπάρχουσα με ΜΑΣΗ απορρίφθηκαν από την ανάλυση των υπολοίπων παραμέτρων γιατί οι περισσότεροι (8 στους 10) είχαν ΠΧΚ (πιθανή ή αρχικού σταδίου).

Στους υπόλοιπους ασθενείς ελέγχθηκε η επίδραση του οξειδωτικού στρες στις παραμέτρους του Πίνακα 74. Ως προς τη φλεγμονώδη δραστηριότητα δεν συλλέχθηκαν πληροφορίες από τις βιοψίες, γιατί στο διάστημα από την πιο πρόσφατη βιοψία σημειώθηκε αλλαγή στην κλινικοεργαστηριακή κατάσταση των ασθενών (ορισμένοι μπήκαν σε θεραπεία και ορισμένοι υποτροπίασαν).

Πίνακας 74: Εργαστηριακά, κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα.

Κατηγορίες	Αριθμός ασθενών
Στάδιο νόσου (ΠΧΚ)	
Αρχικό στάδιο	1
Στάδιο 1-2	32
Στάδιο 3-4	8
Θεραπεία	
Θεραπεία (ναι/όχι)	40/9
Ανταπόκριση στη θεραπεία (όχι/ναι)	14/26
Εργαστηριακά ευρήματα	
Βιοχημική δραστηριότητα (ναι/όχι)	21/28
Κίρρωση	
Κίρρωση (ναι/όχι)	6/43
Βιοχημική δραστηριότητα (ναι/όχι) και κίρρωση	4/2
Βιοχημική δραστηριότητα (ναι/όχι) χωρίς κίρρωση	14/29
Φλεγμονώδης δραστηριότητα	
Ελάχιστη/ήπια	6
Μέτρια/έντονη	1
Στάδιο ίνωσης	
Ελάχιστη	2
Ήπια	26
Μέτρια	2
Έντονη	6

10.1.Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με το στάδιο της νόσου, στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα.

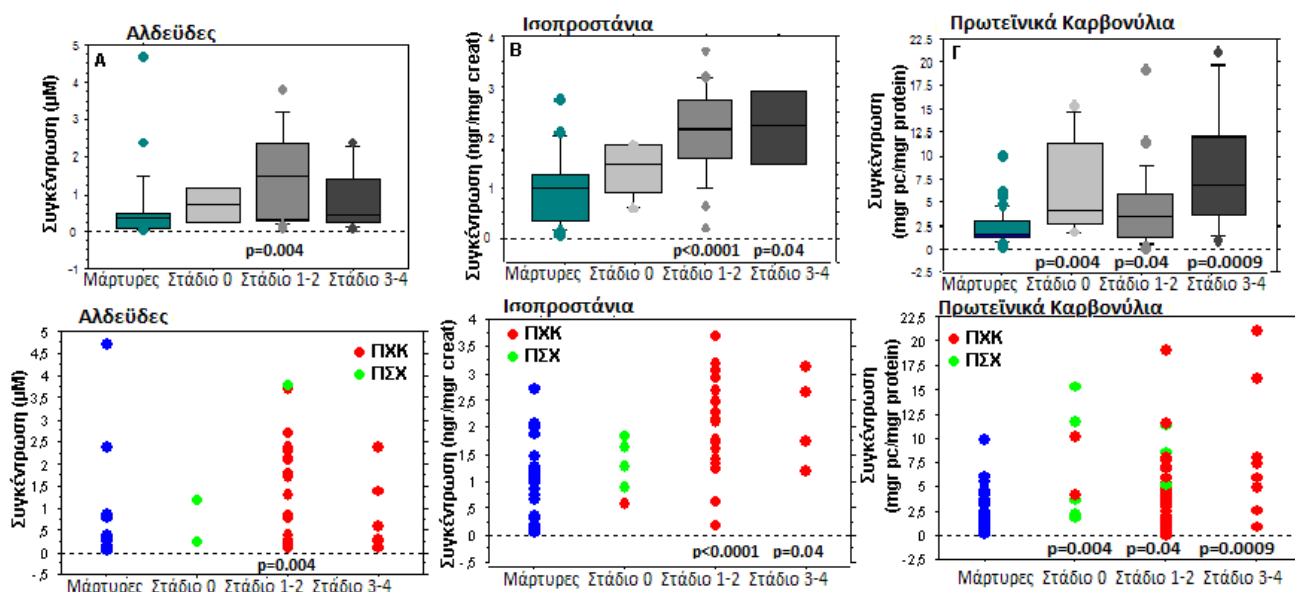
Ασθενείς με αρχικού σταδίου νόσημα (n=7) είναι κυρίως ασθενείς με ΠΣΧ (n=6). Στους ασθενείς με ίνωση σταδίου 1-2 (n=34) περιλαμβάνονταν μόνο 2 ασθενείς με ΠΣΧ και οι ασθενείς με στάδιο ίνωσης 3-4 (n=8) ήταν όλοι ασθενείς με ΠΧΚ. Οπότε, οι διαφορές μεταξύ σταδίου 1-2 και 3-4 αναφέρονται κυρίως στους ασθενείς με ΠΧΚ. Οι ασθενείς που είχαν ίνωση σταδίου 3-4 παρουσίαζαν τάση αύξησης στα πρωτεϊνικά καρβονύλια και στα ισοπροστανία. Η δραστηριότητα της μυελουπεροξειδάσης, της υπεροξειδικής δισμουτάσης και τα επίπεδα των αλδεϋδών, παρουσίαζαν τάση αύξησης στο στάδιο 1-2 και μείωση στο στάδιο 3-4.

Οι ασθενείς που είχαν ίνωση σταδίου 1-2 και 3-4 διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες στα επίπεδα των ισοπροστανίων [2,1(0,2-3,8) vs 1(0,01-2,7), p<0.0001], [2,1(1,5-3) vs 1(0,01-2,7), p=0.04], ενώ οι ασθενείς με αρχικού σταδίου νόσο δεν διέφεραν σε σχέση με τους

μάρτυρες (Διάγραμμα 97B). Οι ασθενείς με ίνωση σταδίου 1-2 διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες στις αλδεΐδες [1,7(0,1-4) vs 0,3(0,05-4,7), $p=0.004$] (Διάγραμμα 97A).

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα σε όλα τα στάδια ίνωσης σε σχέση με τους μάρτυρες, αλλά παρατηρήθηκε υψηλότερη αύξηση στο στάδιο 3-4 (Διάγραμμα 97Γ). Συγκεκριμένα οι ασθενείς του σταδίου αυτού είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν ίνωση σταδίου 1-2 [6(0,1-21) vs 3(0,1-19), $p=0.004$].

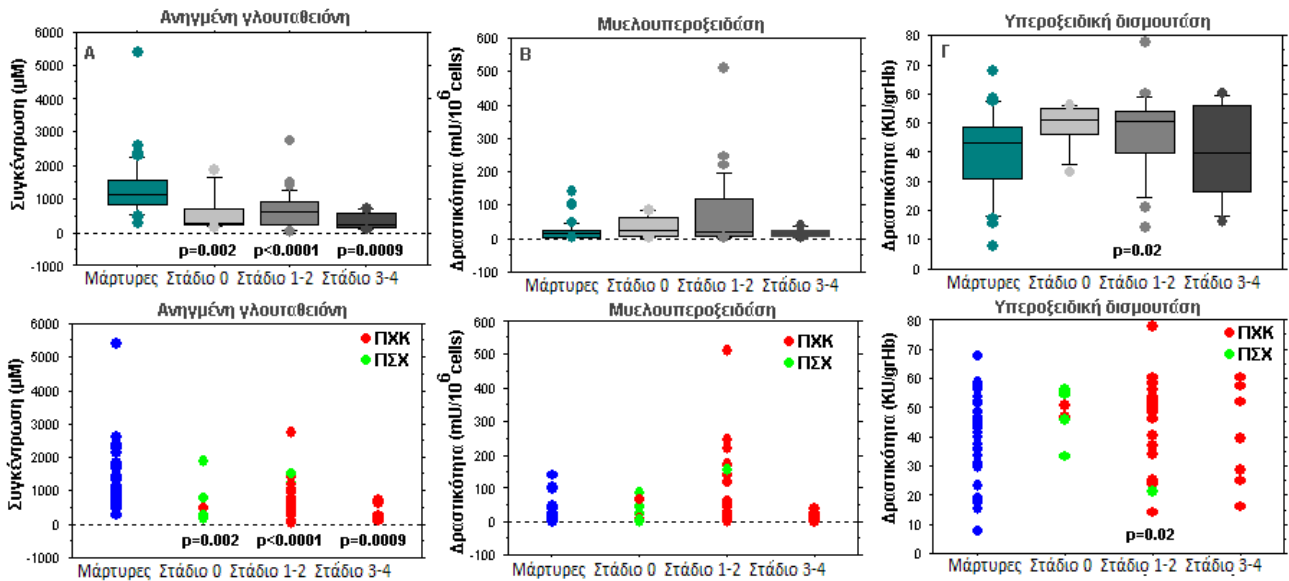
Συσχέτιση προϊόντων οξειδωτικής βλάβης με το στάδιο της νόσου στους ασθενείς με ΠΧΚ και ΠΣΧ



Διάγραμμα 97: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα αλδεϋδών (Διάγρ. 97A), ισοπροστανίων (Διάγρ. 97B) και πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Διάγρ. 97Γ) σε σχέση με το στάδιο της νόσου στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα (πάνω σειρά) και στους ασθενείς με ΠΧΚ και ΠΣΧ (κάτω σειρά). Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεΐδες και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τα ισοπροστανία και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Η ανηγμένη γλουταθειόνη διέφερε σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες σε όλα τα στάδια της νόσου. Η δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τους μάρτυρες στο στάδιο 1-2 [50(15-80) vs 43(8-68), $p=0.02$], ενώ στο στάδιο 3-4 ήταν μειωμένη και δεν διέφερε σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 98Γ).

Συσχέτιση οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων με το στάδιο της νόσου στους ασθενείς με ΠΧΚ και ΠΣΧ



Διάγραμμα 98: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγρ. 98Α), ΜΡΟ (Διάγρ.98Β) και υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγρ. 98Γ) σε σχέση με το στάδιο της νόσου στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα (πάνω σειρά) και στους ασθενείς με ΠΧΚ και ΠΣΧ χωριστά (κάτω σειρά). Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

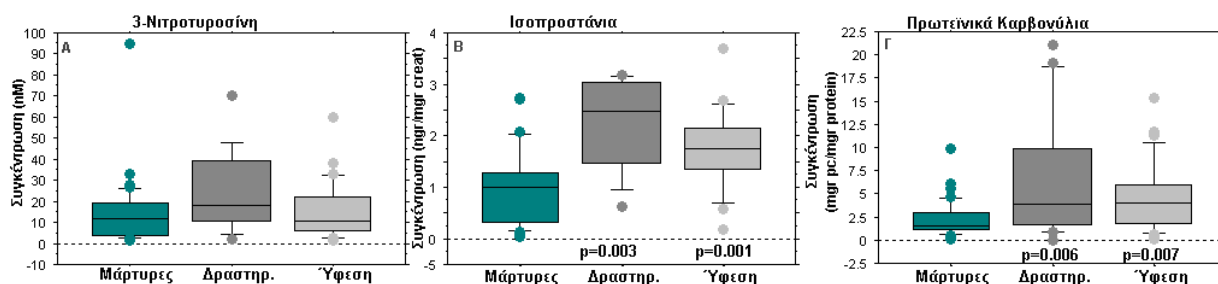
10.2. Συσχέτιση εργαστηριακών ευρημάτων και δεικτών οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα.

Οι ασθενείς που παρουσίαζαν βιοχημική δραστηριότητα (n=21) εμφάνιζαν τάση αύξησης στα περισσότερα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης (με εξαίρεση τα επίπεδα των αλδευδών) σε σχέση με τους ασθενείς με βιοχημική ύφεση (n=28) (Διάγραμμα 99). Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των παραπάνω ομάδων παρατηρήθηκε στα πρωτεϊνικά καρβονύλια [3,6(0,02-21) vs 4,2(0,1-15)], p=0.04]. Συγκριτικά με τους μάρτυρες, οι ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ισοπροστανίων [2,5(0,6-3,2) vs 1(0,01-2,7), p=0.003] και πρωτεϊνικών καρβονυλίων [3,6(0,02-21) vs 1,6(0,1-9,9), p=0.006]. Οι παραπάνω δείκτες μαζί με τα επίπεδα των αλδευδών ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τους μάρτυρες, ακόμη και όταν το νόσημα βρισκόταν σε ύφεση (Πίνακας 75).

Πίνακας 75: Σύγκριση προϊόντων οξειδωτικής βλάβης μεταξύ ασθενών με βιοχημική ύφεση και μαρτύρων, στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney.

Παράμετροι	Βιοχημική ύφεση (n=28)	Μάρτυρες (n=39)	Τιμή p
Ισοπροστάνια	1,8(0,18-3,7)	1(0,01-2,7)	p=0.001
Αλδεΐδες	1,7(0,24-3,8)	0,3(0,05-4,7)	p=0.005
Πρωτεϊνικά καρβονύλια	4,2(0,1-15)	1,6(0,1-9,9)	p=0.007

*0.1>p>0.05, **p≤0.05, ***p≤0.01, ****p≤0.001.



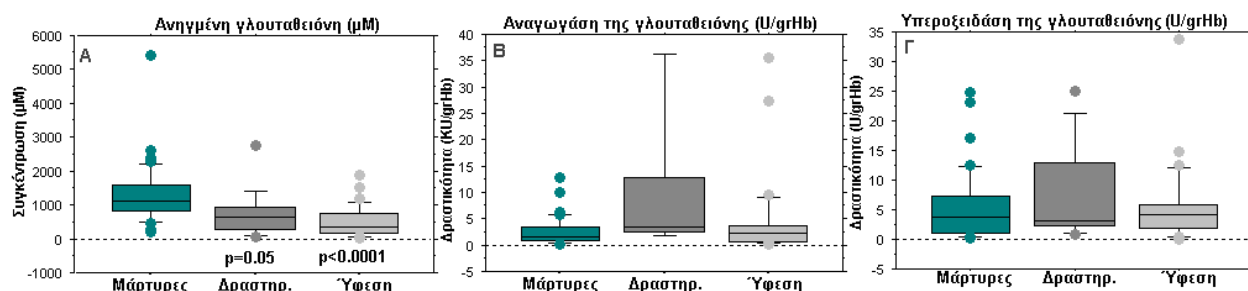
Διάγραμμα 99: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα 3-νιτροτυροσίνης (Διάγρ. 99Α), ισοπροστανίων (Διάγρ. 99Β) και πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Διάγρ. 99Γ) σε σχέση με τη βιοχημική δραστηριότητα στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεΐδες και τη 3-νιτροτυροσίνη και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τα ισοπροστάνια και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Ως προς την αντιοξειδωτική άμυνα, οι ασθενείς που είχαν ενεργό νόσημα παρουσίαζαν τάση αύξησης στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης, της υπεροξειδάσης και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης και τάση μείωσης στη δραστικότητα της καταλάσης σε σχέση με τους ασθενείς που ήταν σε βιοχημική ύφεση (Διάγραμμα 100 και 101). Συγκριτικά με τους μάρτυρες, η δραστικότητα της καταλάσης παρουσίαζε σημαντική μείωση στους ασθενείς που είχαν ενεργό νόσημα [100(14-275) vs 162(59-450), p=0.03], η ανηγμένη γλουταθειόνη εμφάνιζε σημαντική μείωση και η δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης σημαντική αύξηση και στις δυο ομάδες των ασθενών (Διάγραμμα 100, 101, Πίνακας 76).

Πίνακας 76: Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης και υπεροξειδικής δισμουτάσης στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα σε σχέση με τη βιοχημική δραστηριότητα. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος τιμή και εύρος. Οι τιμές p που αναγράφονται, αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε υποομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες και υπολογίστηκαν με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney.

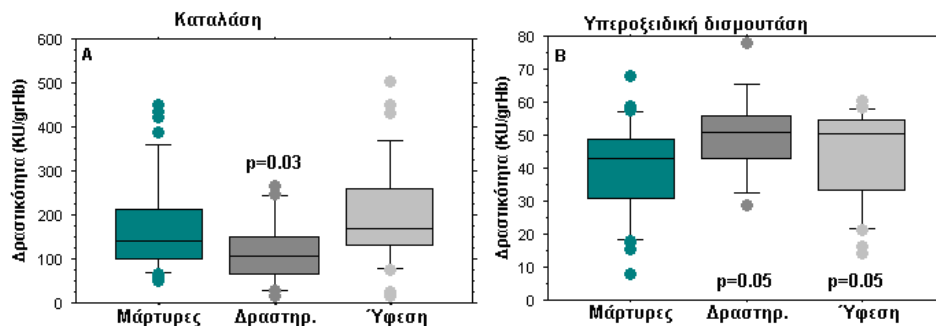
Παράμετροι	Βιοχημική ύφεση (v=28)	Βιοχημική δραστηριότητα (v=21)	Μάρτυρες (v=39)
Ανηγμένη γλουταθειόνη	494(18-1872)****	526(4-2743)**	1101(276-5409)
Υπεροξειδική δισμουτάση	50(14-60)**	52(29-78)**	43(8-68)

Συσχέτιση αντιοξειδωτικών παραγόντων με τη βιοχημική δραστηριότητα στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα



Διάγραμμα 100: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγρ. 100Α), αναγωγής της γλουταθειόνης (Διάγρ. 100Β) και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Διάγρ. 100Γ) σε σχέση με τη βιοχημική δραστηριότητα στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Συσχέτιση αντιοξειδωτικών παραγόντων με τη βιοχημική δραστηριότητα στους ασθενείς με αυτοάνοσο χολοστατικό νόσημα.



Διάγραμμα 101: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα δραστηριότητας καταλάσης (Διάγρ. 101Α) και υπεροξειδικής δισμουτάσης (Διάγρ. 101Β) σε σχέση με τη βιοχημική δραστηριότητα στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

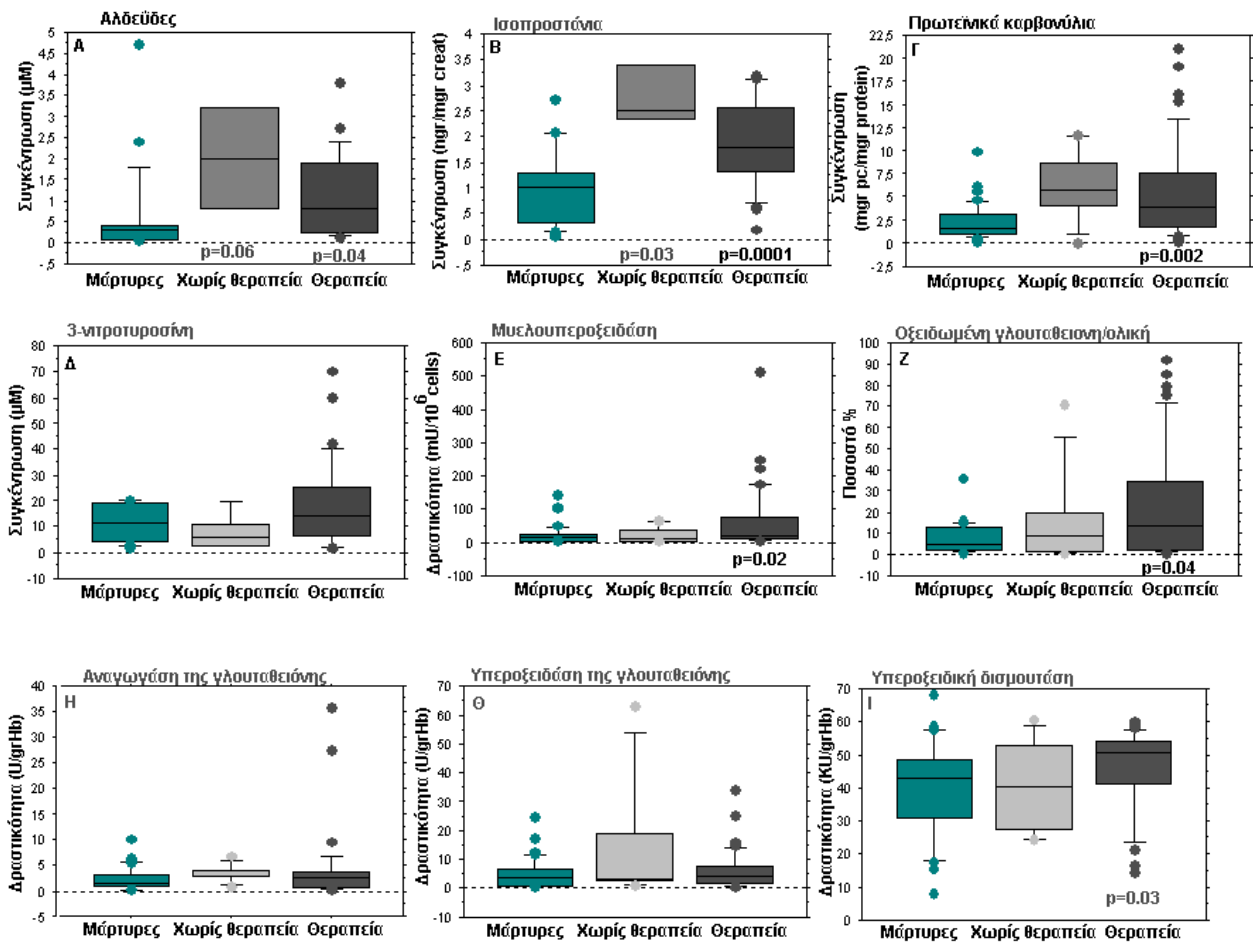
10.3. Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη θεραπεία και την έκβαση της σε ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα.

Οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία είχαν υψηλότερα επίπεδα γλουταθειόνης, μικρότερες δραστηκότητες αντιοξειδωτικών ενζύμων και μικρότερες ποσότητες προϊόντων οξειδωτικής βλάβης σε σχέση με τους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία. Παρατηρήθηκαν τα ίδια αποτελέσματα με παραπάνω [Παράγραφος 10.2 (εργαστηριακά ευρήματα)].

Η σύγκριση ασθενών που ελάμβαναν θεραπεία με ουρσοδεοξυλικό οξύ ($n=41$) τη στιγμή της μελέτης σε σχέση με τους ασθενείς που δεν είχαν λάβει θεραπεία ($n=9$) δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές στους δείκτες οξειδωτικού στρες. Οι περισσότεροι ασθενείς που δεν είχαν λάβει θεραπεία είχαν ενεργό το νόσημα (7/9), ενώ από τους ασθενείς που ελάμβαναν θεραπεία 14 στους 40 εμφάνιζαν βιοχημική δραστηριότητα. Παρατηρήθηκε τάση αύξησης στα επίπεδα των αλδευδών, των ισοπροστανίων, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, της 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνης, της δραστηκότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων και τάση μείωσης των επιπέδων της 3-νιτροτυροσίνης και της δραστηκότητας της MPO στους ασθενείς που δεν είχαν λάβει ακόμη θεραπεία σε σχέση με τους ασθενείς που λήφθηκε το δείγμα κατά τη διάρκεια της θεραπείας (Διάγραμμα 102). Στους υπόλοιπους δείκτες δεν παρατηρήθηκαν διαφορές.

Συγκριτικά με τους μάρτυρες, οι ασθενείς που δεν είχαν λάβει ακόμη θεραπεία παρουσίασαν σημαντική αύξηση των ισοπροστανίων [2,5(2,2-3,4) vs 1(0,01-2,7), $p=0.03$] και σημαντική μείωση της ανηγμένης γλουταθειόνης [258(18-2743) vs 1101(276-5409), $p=0.03$]. Στους ασθενείς που λήφθηκε το δείγμα κατά τη διάρκεια της θεραπείας παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της γλουταθειόνης [500(18-1800) vs 1101(276-5409), $p<0.0001$] και σημαντική αύξηση στα επίπεδα των ισοπροστανίων [1,8(0,2-3,2) vs 1(0,01-2,7), $p=0.0001$], των αλδευδών [0,9(0,1-3,8) vs 0,3(0,05-4,7), $p=0.04$], των πρωτεϊνικών καρβονυλίων [4(0,01-21) vs 1,6(0,1-9,9), $p=0.002$], του λόγου της οξειδωμένης γλουταθειόνης/ολική [10(0,2-92) vs 5,1(0,1-36), $p=0.04$], της δραστηκότητας της MPO [25(1-500) vs 12(1-142), $p=0.02$] και της υπεροξειδικής δισμουτάσης [51(14-60) vs 43(8-68), $p=0.03$] σε σχέση με τους μάρτυρες.

Επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες σε σχέση με τη θεραπεία στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα.

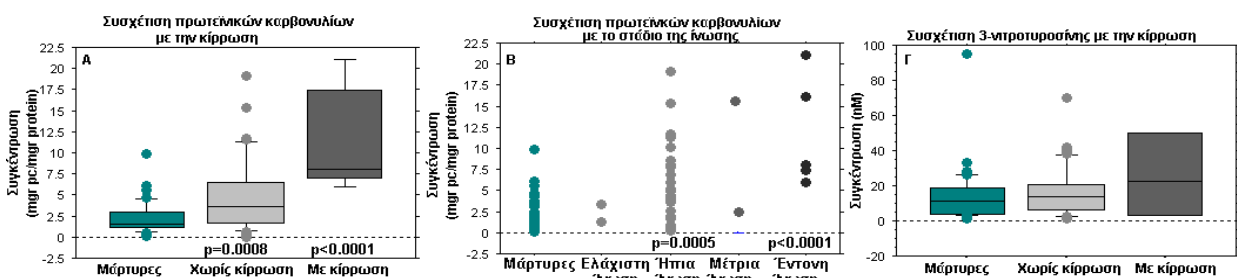


Διάγραμμα 102: Διάγραμματα «Whisker ή Box»: Επίπεδα προϊόντων οξειδωτικής βλάβης λιπιδίων (Διάγρ. 102A, B) και πρωτεϊνών (Διάγρ. 102Γ,Δ), δραστικότητας MPO (Διάγρ. 102E), οξειδωμένης γλουταθειονης (Διάγρ. 102Z) και αντιοξειδωτικών ενζύμων (Διάγρ. 102 H,Θ,I) σε σχέση με τη θεραπεία στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεΐδες, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και τη 3-νιτροτυροσίνη και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τους υπόλοιπους δείκτες και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

10.4. Σύγκριση δεικτών οξειδωτικού στρες με τα ιστοπαθολογοανατομικά ευρήματα σε ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα.

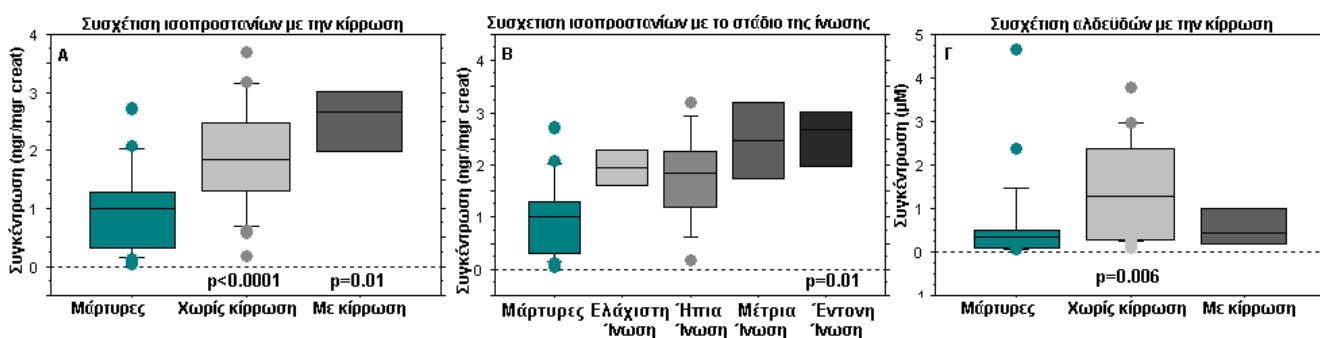
Από τις βιοψίες συλλέχθηκαν μόνο πληροφορίες όσον αφορά το στάδιο της ίνωσης. Όσον αφορά τη φλεγμονώδη δραστηριότητα δεν συλλέχθηκε κάποια πληροφορία γιατί στο διάστημα μεταξύ της ημερομηνίας συλλογής του βιοπτικού υλικού και της ημερομηνίας συλλογής του δείγματος υπήρχαν αλλαγές στην κλινική πορεία της νόσου, κυρίως λόγω της λαμβανόμενης θεραπείας.

Όσον αφορά στο στάδιο της ίνωσης, 2 ασθενείς είχαν ελάχιστη ίνωση, 26 είχαν ήπια, 2 μέτρια και 6 είχαν έντονη ίνωση, οπότε η σύγκριση μεταξύ μη κίρρωτικών και κίρρωτικών αντιστοιχεί κυρίως στη σύγκριση μεταξύ ασθενών με ήπια και έντονη ίνωση. Γενικά παρατηρήθηκε τάση αύξησης στα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς και παράλληλα με την αύξηση του σταδίου της ίνωσης. Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ κίρρωτικών και μη κίρρωτικών παρατηρήθηκε στα πρωτεϊνικά καρβονύλια, όπου οι κίρρωτικοί είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς [7,5(5,9-21) vs 3,7(0,02-19), $p=0.03$]. Συγκριτικά με τους μάρτυρες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων τόσο στους ασθενείς με κίρρωση [7,5(5,9-21) vs 1,6(0,1-9,9), $p<0.0001$], όσο και στους ασθενείς χωρίς κίρρωση [3,7(0,02-19) vs 1,6(0,1-9,9), $p=0.0008$] (Διάγραμμα 103 Α).



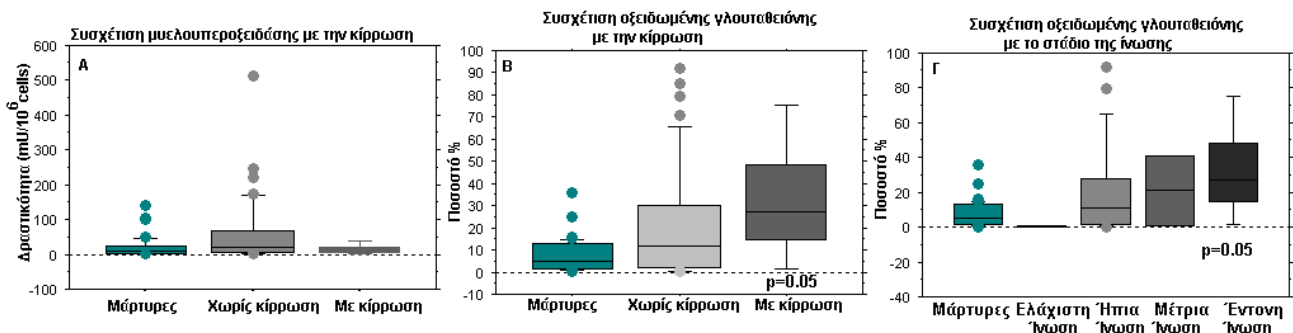
Διάγραμμα 103: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Διάγρ. 103Α, Β) και 3-νιτροτυροσίνης (Διάγρ. 103Γ) σε σχέση με την κίρρωση και το στάδιο της ίνωσης στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Στα ισοπροστανίνα παρατηρήθηκε τάση αύξησης παράλληλα με την αύξηση του σταδίου της ίνωσης (Διάγραμμα 104B). Συγκριτικά με τους μάρτυρες, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στους κίρρωτικούς [2,6(1,7-3,2) vs 1(0,01-2,7), $p=0.01$] και στους μη κίρρωτικούς [1,8(0,2-3,7) vs 1(0,01-2,7), $p<0.0001$]. Αντίθετα στις αλδεύδες παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων τους στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς, σε επίπεδα παρόμοια σε σχέση με μάρτυρες και σημαντική αύξηση των επιπέδων στους μη κίρρωτικούς σε σχέση με τους μάρτυρες [1,3(0,1-3,7) vs 0,3(0,05-4,7), $p=0.006$] (Διάγραμμα 104Γ).



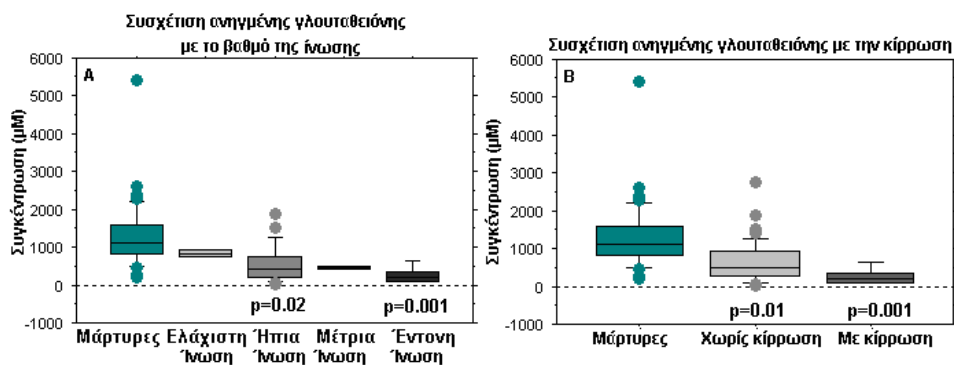
Διάγραμμα 104: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα ισοπροστανίων (Διάγρ. 104A, B) και αλδευδών (Διάγρ. 104 Γ) σε σχέση με την κίρρωση και το στάδιο της ίνωσης στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA για τις αλδεύδες και με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney για τα ισοπροστανίνα και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Η δραστικότητα της MPO παρουσίαζε αξιοσημείωτη μείωση στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς και τους μάρτυρες, χωρίς όμως στατιστικώς σημαντική διαφορά (Διάγραμμα 105A). Ο λόγος [οξειδωμένη γλουταθειόνη/ολική] ήταν σημαντικά αυξημένος μόνο στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μάρτυρες [27(1,5-75) vs 5,1(0,1-36), $p=0.05$] (Διάγραμμα 105B). Η διάμεσος τιμή του λόγου [οξειδωμένη γλουταθειόνη/ολική] παρουσίαζε αύξηση παράλληλα με την αύξηση του βαθμού της ίνωσης (Διάγραμμα 105Γ).



Διάγραμμα 105: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα MPO (Διάγρ. 105A) και οξειδωμένες γλουταθειόνες (Διάγρ. 105B, Γ) σε σχέση με την κίρρωση και το στάδιο της ίνωσης στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

Αντίθετα τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης μειώθηκαν προοδευτικά από τους ασθενείς με ελάχιστη στους ασθενείς με έντονη ίνωση (Διάγραμμα 106). Στη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων δεν παρατηρήθηκαν διαφορές.



Διάγραμμα 106: Διάγραμμα «Whisker ή Box»: Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (A, B) σε σχέση με την κίρρωση και το στάδιο της ίνωσης στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη μέθοδο “Kruskal-Wallis one-way analysis of variance” και “Mann Whitney” και αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας σε σχέση με τους μάρτυρες.

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται όταν διαταραχθεί η ισορροπία προ-οξειδωτικών/αντιοξειδωτικών σε βάρος των αντιοξειδωτικών παραγόντων. Οφείλεται είτε σε μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών, είτε σε αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), που δεν αντιμετωπίζονται επαρκώς από την αντιοξειδωτική άμυνα. Οι υψηλά δραστικές ελεύθερες ρίζες μπορούν να βλάψουν τα κύτταρα με την υπεροξειδωση των φωσφολιπιδικών μεμβρανών και με την οξείδωση των πρωτεϊνών και του DNA, οδηγώντας σε κακοήθεις μετασχηματισμούς (Halliwell 1992). Οι αναφορές από αρκετές μελέτες αποδεικνύουν ότι υπάρχει μια καλή συσχέτιση μεταξύ του τύπου και της σοβαρότητας αρκετών νοσημάτων και των επιπέδων των αντιοξειδωτικών στο αίμα. Αυτή η συσχέτιση έχει βρεθεί σε αρκετά νοσήματα, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών, νευρολογικών, νοσημάτων του πνεύμονα και σε αρκετούς τύπους κακοήθειας (Crosswhite 2010, Dreher 1996, Giustarini 2009, Heistad 2009, Praticò 2008, Tsang 2009, Victor 2009, Visconti 2009).

Όσον αφορά στα νοσήματα του ήπατος, η εμπλοκή του οξειδωτικού στρες στις συγκεκριμένες ασθένειες έχει μεν αναγνωριστεί από πολλές μελέτες, αλλά δεν έχει ξεκαθαρισθεί ο μηχανισμός της εμπλοκής του οξειδωτικού στρες στην πρόοδο της ασθένειας των νοσημάτων αυτών (Albano 2008, Cederbaum 2009, Choi 2006, De Minicis 2008, Mantena 2008, Medina 2005, Mehta 2002, Swietek 1997, Wang 2006). Για την έρευνα ρουτίνας του οξειδωτικού στρες, η μέτρηση των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών δεικτών στο αίμα και στα ούρα αποτελεί τη μοναδική διαθέσιμη προσέγγιση του οξειδωτικού στρες. Οι ηπατικές βιοψίες είναι ακατάλληλες για τη συνηθισμένη μέτρηση των δεικτών οξειδωτικού στρες και οι τεχνικές που είναι μέχρι τώρα διαθέσιμες είναι στην καλύτερη περίπτωση ημιποσοτικές.

Από την παρούσα μελέτη, σκοπός της οποίας ήταν η μέτρηση των δεικτών οξειδωτικού στρες στα χρόνια νοσήματα του ήπατος, προκύπτουν τα ακόλουθα τέσσερα κύρια ευρήματα. Πρώτον, η διαταραχή της λειτουργίας της αντιοξειδωτικής άμυνας εμπλέκεται στην εξέλιξη των νοσημάτων σε κίρρωση. Δεύτερον, η δημιουργία προϊόντων οξειδωτικής βλάβης ξεκινά από τα αρχικά στάδια των χρόνιων ηπατικών νοσημάτων. Τρίτον η θεραπεία μειώνει ως ένα βαθμό τα

προϊόντα οξειδωτικής βλάβης και τέταρτον υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ ποικίλων δεικτών οξειδωτικού στρες και της ιστολογικά εκτιμούμενης ηπατικής βλάβης. Αν και αυτά τα ευρήματα δεν υπαινίσσονται μια σχέση αιτίας και αποτελέσματος, ενισχύουν όμως ισχυρά την υπόθεση ότι υπάρχει ισχυρός συσχετισμός μεταξύ οξειδωτικού στρες και της παθογένειας των ηπατικών νοσημάτων που οδηγεί στη δημιουργία ίνωσης. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από μελέτες άλλων (Muriel 2009, Pemberton 2004, Phung 2009).

Η παρούσα μελέτη πρωτοτυπεί ως προς το ότι αναλύθηκαν ταυτόχρονα οι περισσότεροι δείκτες οξειδωτικής βλάβης και η ενδογενής αντιοξειδωτική άμυνα, με αποτέλεσμα να παρέχεται μια πιο εμπειριστατωμένη εκτίμηση του οξειδωτικού στρες σε όλα τα υπό μελέτη νοσήματα του ήπατος. Επίσης, συσχετίστηκαν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες με το στάδιο της ίνωσης, της φλεγμονώδους δραστηριότητας και την ανταπόκριση ή όχι των ασθενών στη θεραπεία, κάτι που έχει γίνει από ελάχιστες μελέτες. Μέχρι τώρα υπάρχουν ελάχιστες μελέτες που αφορούν στη μέτρηση των εν λόγω παραμέτρων στους χρόνιους ανενεργούς φορείς της ηπατίτιδας Β (Acar 2009, Bolukbas 2005), στους κίρρωτικούς ασθενείς με ηπατίτιδα Β (Dandri 2002, Wu 2008) και στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (Kadokawa 2007, Pemberton 2004, Salunga 2007, Sorrentino 2010). Στην αλκοολική ηπατοπάθεια έχουν διενεργηθεί αρκετές μελέτες σε πειραματόζωα (Bondy 1992, Cederbaum 1991, De Minicis 2008, Gundogan 2010, Ishii 1997, Higuchi 1996, Mantle 1999, Nagata 2007, Nordmann 1992). Αν και έχουν δημοσιευθεί αρκετές μελέτες στη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (Albano 2005, Berson 1998, Chalasani 2004, Oliveira 2002) και στην ηπατίτιδα C (De Maria 1996, Farinaty 1999, Paradis 1997), χρησιμοποιήσαμε τα δεδομένα από την πρώτη ομάδα προκειμένου να τα συγκρίνουμε με αυτά των ασθενών με αλκοολική στεατοηπατίτιδα, καθώς και να συγκρίνουμε τα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες μεταξύ ασθενών με ηπατίτιδα Β και ηπατίτιδα C.

Στη μελέτη μας όλοι οι δείκτες οξειδωτικής βλάβης συσχετίστηκαν θετικά με την ενεργότητα της νόσου, τη μη ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία, την παρουσία κίρρωσης, το στάδιο της ίνωσης και τη φλεγμονώδη δραστηριότητα. Οι δραστηριότητες των περισσότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων συσχετίστηκαν θετικά με την ενεργότητα της νόσου και αρνητικά με την κίρρωση σε όλες τις κατηγορίες ηπατικών νοσημάτων που μελετήθηκαν. Η αύξηση της

δραστικότητας τους δηλώνει προσαρμογή στα αυξανόμενα επίπεδα οξειδωτικού στρες και έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Η μείωση ή η μη μεταβολή της δραστηριότητας τους παρουσία αυξημένων προϊόντων οξειδωτικής βλάβης δηλώνει αναστολή του μηχανισμού επαγωγής ή μείωση της συγκέντρωσης τους (Cerutti 1994, Limaye 2003, Matsunami 2009). Το ήπαρ επίσης είναι η μεγαλύτερη αποθήκη αντιοξειδωτικών (Abd Ellah 2004, DeLeve 1998, Ismail 2010, Sokol 1996) οπότε με την προοδευτική απώλεια των ηπατοκυττάρων στην κίρρωση μειώνονται οι αποθήκες τους στον οργανισμό, άρα και η ποσότητα που εκκρίνεται προς την κυκλοφορία του αίματος. Συνεπώς, η μείωση της ικανότητας της αντιοξειδωτικής άμυνας να αντιμετωπίσει τις ελεύθερες ρίζες πιθανόν να είναι το αποτέλεσμα της κίρρωσης και έχει ως συνέπεια την παραπέρα αύξηση των προϊόντων οξειδωτικής βλάβης στο έντονο στάδιο της ίνωσης, δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο. Μπορεί όμως η μείωση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών ενζύμων να είναι αποτέλεσμα της χρόνιας παραγωγής ελευθέρων ριζών που λαμβάνει χώρα στη χρόνια ηπατική φλεγμονή, οδηγώντας σε αύξηση της ευπάθειας των ηπατοκυττάρων στο οξειδωτικό στρες και τη δημιουργία κίρρωσης.

Η δημιουργία προϊόντων οξειδωτικής βλάβης (ισοπροσάνια, αλδεΐδες, οξειδωμένη γλουταθειόνη) και η επαγωγή της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων (αναγωγή της γλουταθειόνης, υπεροξειδική δισμουτάση και καταλάση) παρατηρήθηκε και στους ασθενείς που είχαν φυσιολογικές αμινοτρανσφεράσες. Αυτό δηλώνει ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να προηγείται της ηπατοκυτταρικής νέκρωσης.

Η αντιική θεραπεία που χορηγήθηκε για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C βελτίωσε σημαντικά τους δείκτες οξειδωτικής βλάβης και αύξησε τα επίπεδα της γλουταθειόνης. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία, όλα τα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης και η δραστηριότητα όλων των αντιοξειδωτικών ενζύμων ήταν παρόμοια σε σχέση με τους μάρτυρες. Στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β και με αυτοάνοσα νοσήματα αν και η θεραπεία μείωσε τη δημιουργία ελευθέρων ριζών, εντούτοις δεν κατέστειλε εντελώς τη δημιουργία τους. Οι πιο ευαίσθητοι δείκτες οξειδωτικής βλάβης (ανηγμένη γλουταθειόνη και ισοπροσάνια) συνέχιζαν να παρουσιάζουν σημαντική διαφορά σε σχέση με τα επίπεδα που βρέθηκαν στους μάρτυρες, ακόμη και στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία. Αυτό δείχνει ότι σε αυτά τα νοσήματα

κάποιοι άλλοι παράγοντες πέρα από τη φλεγμονώδη αντίδραση μπορεί να επάγουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Αναλυτικότερα, θα συζητηθεί ξεχωριστά ο κάθε δείκτης οξειδωτικού στρες στα διάφορα νοσήματα του ήπατος, όπως επίσης και όλοι οι δείκτες μαζί σε κάθε νόσημα ξεχωριστά.

Οι αλδεΐδες και τα ισοπροστάνια είναι οι πιο ευαίσθητοι δείκτες οξειδωτικής βλάβης. Από τις αλδεΐδες η 4-HNE έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής μέσα στο ηπατοκύτταρο και είναι αρκετά τοξική γιατί αντιδρά με τις πυρηνόφιλες ουσίες και τα αμινοξέα (κυστίνη, γλυκίνη, αλανίνη, λυσίνη). Στο ηπατοκύτταρο το 30% συζευγνύεται με τη γλουταθειόνη, το 30% οξειδώνεται σε 4-υδροξυμενανικό οξύ από τη δεϋδρογονάση της αλδεΐδης και το 10% ανάγεται (Petersen 2004, Siems 1997). Τα κυκλοφορούντα ισοπροστάνια είναι κυρίως εστεροποιημένα με φωσφολιπίδια και απελευθερώνονται με τη δράση της φωσφολιπάσης A₂. Ο χρόνος ημίσειας ζωής τους είναι 20 λεπτά, γεγονός που τα καθιστά δείκτη παραγωγής τους σε κοντινό χρονικό διάστημα από τη στιγμή που συλλέχθηκε το δείγμα. Τα ισοπροστάνια μεταβολίζονται και εκκρίνονται στα ούρα, οπότε η μέτρηση τους στα ούρα είναι ένας αξιόπιστος δείκτης της παραγωγής τους σε χρόνια νοσήματα. Πολλές μελέτες μέχρι τώρα έχουν δείξει πως τα κυκλοφορούντα ισοπροστάνια είναι σημαντικά αυξημένα σε καταστάσεις που εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες (Awad 1995, Cracowski 2000, Das 2000, Jain 2002, Morrow 1995, Pratico 1998). Ανάλογα είναι και τα αποτελέσματα στη παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των αλδεϊδών και των ισοπροστανίων βρέθηκαν σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους μάρτυρες σε όλες τις χρόνιες ηπατοπάθειες που μελετήθηκαν (με εξαίρεση τους ασθενείς με ηπατίτιδα Β που δεν διέφεραν σημαντικά με τους μάρτυρες ως προς τα ισοπροστάνια). Αναλυτικότερα, τα υψηλότερα επίπεδα ισοπροστανίων ανιχνεύθηκαν σε ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και αλκοολική ηπατοπάθεια, ενώ οι αλδεΐδες παρουσίαζαν την υψηλότερη τιμή στην αλκοολική ηπατοπάθεια από όλες τις ομάδες που μελετήθηκαν συμπεριλαμβανομένου και των ασθενών με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Τα ευρήματα της παρούσης μελέτης είναι ανάλογα με αυτά προηγούμενων μελετών (Aleynik 1998, Clot 1994, Letteron 1993, Meager 1999).

Οι συγκεκριμένοι δείκτες συσχετίστηκαν επίσης θετικά με τη νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα και με το βαθμό ίνωσης. Οι Poli και Parola παρατήρησαν ότι οι αλδεΐδες που

προέρχονται από τη λιπιδική υπεροξειδωση ενεργοποιούν τα φλεγμονώδη κύτταρα (Poli 1997). Επίσης, είναι γνωστό ότι οι αλδεΐδες ρυθμίζουν θετικά τη σύνθεση ινογενετικών κυτταροκινών, ενώ τα αλδεΐδικά τελικά προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης ενισχύουν τη σύνθεση κολλαγόνου (Albano 2006, Parola 1993, Zamara 2004). Το γεγονός ότι οι ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια είχαν στη πλειοψηφία τους κίρρωση (83%), μπορεί να εξηγήσει τα πολύ υψηλά επίπεδα προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης σε αυτούς. Τα ισοπροστανία επίσης ήταν ο μόνος δείκτης από τους δείκτες οξειδωτικού στρες που βρέθηκε σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς που είχαν αυξημένες τρανσαμινάσες σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν φυσιολογικούς δείκτες ηπατικής λειτουργίας. Επίσης, τα ισοπροστανία ήταν σημαντικά υψηλότερα στους κίρρωτικούς ασθενείς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς και τα αυξημένα επίπεδα συσχετίστηκαν θετικά με το στάδιο της ίνωσης σε όλα τα χρόνια ηπατικά νοσήματα. Συνηγορητικά με τα παραπάνω είναι τα ευρήματα μελετών που δείχνουν ότι εκτός από τις αλδεΐδες και τα ισοπροστανία συμβάλλουν στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του κολλαγόνου (Comporti 2005, Comporti 2008, Comporti 2009, Gardi 2008). Αν και η παραγωγή ισοπροστανίων και αλδεΐδων ήταν πιο ενισχυμένη στην ομάδα των κίρρωτικών σε όλα τα νοσήματα, στα αυτοάνοσα χολοστατικά και στις στεατοηπατίτιδες παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή σε όλες τις ομάδες των μη κίρρωτικών από την ήπια στην έντονη ίνωση.

Επίσης, οι ασθενείς με μέτρια/έντονη φλεγμονώδη δραστηριότητα είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ισοπροστανίων και αλδεΐδων σε σχέση με αυτούς που είχαν ελάχιστη/ήπια φλεγμονώδη δραστηριότητα και σε σχέση με τους μάρτυρες. Οι ασθενείς με ελάχιστη/ήπια φλεγμονώδη δραστηριότητα είχαν μεν υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους μάρτυρες αλλά δεν διέφεραν σημαντικά μαζί τους. Συνεπώς, η μέτρηση των ισοπροστανίων στο αίμα θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει τη φλεγμονώδη δραστηριότητα στο ήπαρ. Αυτό συμπληρώνει μια πρόσφατη μελέτη, στην οποία η μέτρηση ορισμένων δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα, στο ήπαρ, στη καρδιά και στους μύες αρουραίων έδειξε πως η μέτρηση των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης στο αίμα είναι ένας αξιόπιστος δείκτης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του ήπατος, της καρδιάς και των μυών (Veskoukis 2009).

Επίσης, η χορήγηση θεραπείας και η ανταπόκριση των ασθενών σε αυτή μείωσε σημαντικά στα φυσιολογικά επίπεδα την παραγωγή ισοπροστανίων μόνο στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες. Οι ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση που ελάμβαναν θεραπεία είχαν συγκριτικά με τους μάρτυρες σημαντικά αυξημένα επίπεδα ισοπροστανίων, τόσο στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν, όσο και στους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία.

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι λιγότερο ευαίσθητος δείκτης οξειδωτικής βλάβης και έχει μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής σε σχέση με τα προϊόντα λιπιδικής υπεροξειδωσης (Grune 1995, Grune 1996, Siems 1997). Αυξάνεται σε καταστάσεις έντονου οξειδωτικού στρες και σχετίζεται με την επαγωγή αυτοανοσίας (Khan 2006, Wang 2007, Wang 2008). Η τροποποίηση πρωτεϊνών, όπως είναι η νίτρωση (Ohmori 2005) ή η καρβονυλίωση μπορεί να τροποποιήσει την ανοσογονικότητα των αυτοαντιγόνων (μετατρέποντας τα σε νεοαντιγόνα) (Kurien 2008). Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια μπορούν επίσης να κάνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με τα προϊόντα λιπιδικής υπεροξειδωσης, δημιουργώντας πάλι νεοαντιγόνα (Willis 2002).

Στη παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε υψηλότερη αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα. Στα αυτοάνοσα νοσήματα, στην ηπατίτιδα C και στη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα παρατηρήθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα σε σχέση με τους μάρτυρες μόνο στους κίρρωτικούς και στους ασθενείς που είχαν αυξημένους δείκτες ηπατικής βλάβης. Συνεπώς, φαίνεται ότι τα παραπάνω νοσήματα αντικατοπτρίζουν καταστάσεις έντονου οξειδωτικού στρες. Αντίθετα, οι ασθενείς με ηπατίτιδα B είχαν τα χαμηλότερα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες των ασθενών και η ομάδα των κίρρωτικών δεν παρουσίαζε σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες. Η ανταπόκριση στη θεραπεία συσχετίστηκε με μείωση τους σε φυσιολογικά επίπεδα σε όλα τα υπό μελέτη νοσήματα. Παρατηρήθηκε επίσης θετική συσχέτιση μεταξύ της σύγκρισης πρωτεϊνικών καρβονυλίων με το στάδιο της νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας και της ίνωσης.

Η μυελοϋπεροξειδάση (MPO) καταλύει την αντίδραση μεταξύ χλωρίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου για να δημιουργήσει το υποχλωριώδες οξύ και άλλα δραστικά οξειδωτικά (Klebanoff 1999). Η δραστηριότητα της MPO έχει μελετηθεί ελάχιστα στα χρόνια νοσήματα του ήπατος. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία δεδομένα που αφορούν τη

δραστηριότητα της MPO σε ασθενείς με ηπατίτιδα Β, αλκοολική ηπατοπάθεια και με αυτοάνοσα νοσήματα. Ως αναφορά στους ασθενείς με ηπατίτιδα C έχει γίνει μόνο μια μελέτη, στην οποία αναφέρεται μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου στα φυσιολογικά επίπεδα με την αντιική θεραπεία (Reynolds 2002), ευρήματα ανάλογα με αυτά της παρούσης μελέτης. Η υψηλότερη δραστικότητα MPO παρατηρήθηκε στους ασθενείς με ηπατίτιδα C και στους ασθενείς με στεατοηπατίτιδες. Η δραστικότητα της MPO συσχετίστηκε θετικά με τη φλεγμονώδη δραστηριότητα στο ήπαρ, καθώς είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στα μακροφάγα και στα ουδετερόφιλα, που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη αντίδραση του ξενιστή σε όλα τα υπό μελέτη νοσήματα (με εξαίρεση τα αυτοάνοσα νοσήματα). Παρομοίως, συσχετίστηκε θετικά και με την ενεργότητα της νόσου.

Συνεπώς η μέτρηση της δραστικότητας της στον ορό αντικατοπτρίζει τη φλεγμονώδη δραστηριότητα στο ήπαρ. Στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β, αλκοολική στεατοηπατίτιδα και αυτοάνοση ηπατίτιδα, η δραστικότητα της MPO συσχετίστηκε θετικά με την κίρρωση ενώ στους ασθενείς με ηπατίτιδα C και πρωτοπαθή χολική κίρρωση υπήρχε αρνητική συσχέτιση. Στην πρώτη περίπτωση η αυξημένη δραστικότητα της MPO συμβάλλει στη δημιουργία οξειδωτικών προϊόντων (υπεροξειδίου του υδρογόνου, υποχλωριώδες οξύ) που βοηθούν την περαιτέρω καταστροφή των ηπατοκυττάρων. Στη δεύτερη περίπτωση η μειωμένη δραστικότητα της MPO ίσως να είναι αποτέλεσμα της κίρρωσης, καθώς έχει βρεθεί πως οι κίρρωτικοί έχουν μειωμένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα (Fiuza 2000).

Η 3-νιτροτυροσίνη υπάρχει σε μεγαλύτερη ποσότητα ενδοκυτταρικά από ότι εξωκυτταρικά (Beckman 1996). Στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία έχουν γίνει μελέτες που αφορούν τη μέτρηση της 3-νιτροτυροσίνης με ανοσοισοχημικές μεθόδους στο ήπαρ ασθενών με ιογενείς ηπατίτιδες (Garcia-Monzon 2000) και αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα (Sanz-Cameno 2002). Μέχρι τώρα δε έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία μελέτες που να μετράνε την 3-νιτροτυροσίνη στο αίμα ασθενών με ηπατικά νοσήματα. Τα επίπεδα της 3-νιτροτυροσίνης βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα, πρωτοπαθής χολική κίρρωση και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β και στους ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια ήταν σε παρόμοια επίπεδα σε σχέση με τους μάρτυρες ενώ στους ασθενείς με ηπατίτιδα C ήταν

σε υψηλότερα επίπεδα από τους υγιείς, χωρίς όμως σημαντική διαφορά. Σε μια μελέτη βρέθηκε πως η παραγωγή υποχλωριώδους οξέος (ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις) από την MPO προκαλεί μείωση της ελεύθερης και της πρωτεΐνοσυνδεομένης 3-νιτροτυροσίνης (Whiteman 1999), προτείνοντας πως το υποχλωριώδες οξύ συμβάλλει στην απομάκρυνση της 3-νιτροτυροσίνης. Συνεπώς δεν μπορεί να αξιολογηθεί σωστά ή πραγματική αιτία της μη μεταβολής των επιπέδων της 3-νιτροτυροσίνης σε σχέση με τους μάρτυρες. Πιθανόν για αυτό οι ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια και ηπατίτιδα C, που είχαν την υψηλότερη δραστικότητα της MPO από όλες τις ομάδες των ασθενών δεν παρουσίασαν μεταβολή των επιπέδων της 3-νιτροτυροσίνης σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντίθετα, οι κίρρωτικοί ασθενείς με ΠΧΚ που είχαν παρόμοια δραστικότητα MPO σε σχέση με τους μάρτυρες παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα 3-νιτροτυροσίνης σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς. Επίσης, ο συγκεκριμένος δείκτης δεν παρουσίασε αξιοσημείωτες μεταβολές σε σχέση με τα κλινικοεργαστηριακά δεδομένα των ασθενών.

Η οξειδωμένη γλουταθειόνη φυσιολογικά αποτελεί το 5-10% της συνολικής γλουταθειόνης. Η οξειδωμένη γλουταθειόνη του πλάσματος προέρχεται από ηπατικές και από εξωηπατικές πηγές παρέχοντας έναν ευαίσθητο δείκτη του οξειδωτικού στρες ολόκληρου του οργανισμού (Akerboom 1982). Η μέτρηση της οξειδωμένης γλουταθειόνης είναι ένας δείκτης της δημιουργίας ελευθέρων ριζών, που μετατρέπουν την ανηγμένη γλουταθειόνη σε οξειδωμένη. Ο λόγος της οξειδωμένης προς την ολική είναι επίσης ένας σημαντικός δείκτης (Meister 1988). Όταν δεν παρατηρείται αύξηση του λόγου της οξειδωμένης γλουταθειόνης προς την ολική, τότε μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο οξειδοαναγωγικός κύκλος λειτουργεί κανονικά (Anderson 1980). Η αύξηση του λόγου της οξειδωμένης γλουταθειόνης προς την ολική δηλώνει αυξημένη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης λόγω αυξημένων λιπιδικών υδρουπεροξειδίων (Rossi 2002). Η διατήρηση του παραπάνω λόγου σε φυσιολογικά επίπεδα είναι σημαντική για τον έλεγχο της συγκέντρωσης του ελεύθερου συνενζύμου A στους ιστούς. Αύξηση του παραπάνω λόγου συμβάλλει στην αύξηση της συγκέντρωσης του ελεύθερου συνένζυμου A, που επιταχύνει τη λιπογένεση και μειώνει την κετογένεση. Επίσης, η δραστικότητα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης επηρεάζει το λόγο NADPH/NADP⁺ και κατά συνέπεια και τη λιπογένεση. Ο ρυθμός

όμως της δημιουργίας του NADP⁺ από την αναγωγή της γλουταθειόνης εξαρτάται αποκλειστικά από την ύπαρξη της οξειδωμένης γλουταθειόνης (Pinto 1969).

Η ανηγμένη γλουταθειόνη είναι ζωτικής σημασίας για την αντιοξειδωτική άμυνα, καθώς υπάρχει σε υψηλή ποσότητα στο ήπαρ και στα διάφορα όργανα (Hayes 1999, Lu 2009). Λειτουργεί ως υπόστρωμα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, δρα ως δεσμευτής των ελευθέρων ριζών και ως αναγεννητής της α-τοκοφερόλης. Παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των πρωτεϊνικών σουλφυδρυλικών ομάδων και συμβάλλει κατά 40% στην αποτοξίνωση της 4-υδροξυνοενάλης (Comporti 1991, DeLeve 1998, DeLeve 1990, Meister 1988). Η αντίδραση της γλουταθειόνης με τις ελεύθερες ρίζες συμβάλλει στην καταναλωσή της και συνεπώς στη μείωση της ποσότητας της (Hogg 2002, Spitz 1991). Συνεπώς, μειωμένη ποσότητα γλουταθειόνης αντικατοπτρίζει την αυξανόμενη χρόνια παραγωγή ελευθέρων ριζών, που αντιμετωπίζονται μη ενζυμικά από τη γλουταθειόνη, αλλά και ενζυμικά από το σύστημα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης-γλουταθειόνη. Για αυτό και η μείωση της γλουταθειόνης δεν συμβαδίζει πάντα με αύξηση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.

Η συνολική γλουταθειόνη του αίματος (κυττάρων και πλάσματος) αντικατοπτρίζει την ενδοηπατική συγκέντρωση και την ισορροπία μεταξύ της εκροής της από το ήπαρ και της πρόσληψης της από τα νεφρά (Lauterburg 1984, Lu 1990, Ookhtens 1985). Στην παρούσα μελέτη, η συνολική γλουταθειόνη του αίματος βρέθηκε σημαντικά μειωμένη σε όλες τις ομάδες των ασθενών, εκτός από τους ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδης διήθηση υποδεικνύοντας ότι σε όλα τα υπό μελέτη νοσήματα επηρεάζονται οι ενδοκυτταρικές και οι ενδοηπατικές αποθήκες της. Η μείωση αυτή ήταν πιο σημαντική στους ασθενείς που είχαν κίρρωση και στους ασθενείς που είχαν αυξημένους δείκτες ηπατικής βλάβης σε όλα τα νοσήματα. Η ανταπόκριση στη θεραπεία βελτίωσε τα επίπεδα της γλουταθειόνης, ενώ στην αυτοάνοση ηπατίτιδα ήταν πάλι σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με αυτά των μαρτύρων. Τα χαμηλότερα επίπεδα ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια, στους οποίους βρέθηκε μειωμένη κατά 75% σε σχέση με τους μάρτυρες, γεγονός που δείχνει αυξημένη λιπιδική υπεροξειδωση σε αυτούς τους ασθενείς. Τα υψηλότερα επίπεδα ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών μετρήθηκαν στους ασθενείς με ηπατίτιδα C, στους οποίους η γλουταθειόνη βρέθηκε κατά 30% μειωμένη σε σχέση με τους

μάρτυρες. Όλες οι ομάδες των ασθενών παρουσίαζαν μείωση της γλουταθειόνης και αύξηση του λόγου οξειδωμένη/ολική γλουταθειόνη. Η πιο σημαντική μεταβολή παρατηρήθηκε στους ασθενείς με στεατοηπατίτιδα (αλκοολική και μη αλκοολική) και στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα. Η εκτίμηση του μεταβολισμού της γλουταθειόνης γίνεται για πρώτη φορά στα αυτοάνοσα νοσήματα, ενώ έχει ήδη μελετηθεί στην αλκοολική και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (Altomare 1998, Nobili 2005).

Η δεύτερη κύρια γραμμή αντιοξειδωτικής άμυνας είναι τα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Παρουσία ελευθέρων ριζών επάγεται η αύξηση της σύνθεσης τους για προσαρμογή στο οξειδωτικό στρες (Mbellering 1998, Rahman 1991, Uchida 1999, Wong 1988). Αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων σημαίνει πως η αντιοξειδωτική άμυνα λειτουργεί φυσιολογικά και προσπαθεί να εξουδετερώσει τις ελεύθερες ρίζες και επομένως και την οξειδωτική βλάβη (Storz 1992). Μείωση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων σημαίνει μη παραγωγή ελευθέρων ριζών ή αναστολή της δραστηριότητάς τους από την υπέρμετρη δράση τους ή άμεση αναστολή των ενζύμων από τις ελεύθερες ρίζες (Grzelak 2000). Σε όλα τα υπό μελέτη νοσήματα παρουσιάστηκε αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων στις περιπτώσεις που υπήρχε ενεργό νόσημα όπως εκτιμάται κυρίως από την παρουσία βιοχημικής δραστηριότητας.

Ως αναφορά όμως στην υπεροξειδάση και στην αναγωγή της γλουταθειόνης οι αιτίες αναστολής ή επαγωγής τους είναι περισσότερες, γιατί οι δραστηριότητες τους εξαρτώνται και από το ποσό της γλουταθειόνης. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο που διασπά τα οργανικά και τα ανόργανα υπεροξειδία χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη που τη μετατρέπει στο δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (Bao 1997, Flohé 1978, Maiorino 1991). Στην περίπτωση που η γλουταθειόνη είναι σε έλλειψη, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης δεν μπορεί να δράσει στον ίδιο βαθμό που θα δρούσε εάν η συγκέντρωση της γλουταθειόνης ήταν σε φυσιολογικά επίπεδα.

Η οξειδωμένη γλουταθειόνη είναι ιδιαίτερα κυτταροτοξική. Συνεπώς η αναγωγή της γλουταθειόνης που την μετατρέπει στην ανηγμένη γλουταθειόνη αναπαριστά τη μοναδική προστασία απέναντι στην οξειδωμένη γλουταθειόνη. Εάν κορεστεί το ένζυμο, τότε πρωτεΐνες μεταφορείς εξαγάουν την οξειδωμένη γλουταθειόνη από το κύτταρο (Abd Ellah 2008).

Ως προς την αναγωγή της γλουταθειόνης, όλοι οι ασθενείς είχαν υψηλότερη διάμεσο τιμή σε σχέση με τους μάρτυρες. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο στους ασθενείς με ηπατίτιδα C, που είχαν διπλάσια τιμή σε σχέση με τους μάρτυρες. Αυτό σημαίνει ότι στους ασθενείς με ηπατίτιδα C αναγεννάται με γρήγορο ρυθμό η ανηγμένη γλουταθειόνη από την οξειδωμένη. Για το λόγο αυτό οι ασθενείς με ηπατίτιδα C είχαν την υψηλότερη ποσότητα ανηγμένης γλουταθειόνης και τη χαμηλότερη ποσότητα οξειδωμένης γλουταθειόνης σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες των ασθενών. Αύξηση της δραστηριότητας της αναγωγής της γλουταθειόνης παρατηρήθηκε επίσης στους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, αυτοάνοση ηπατίτιδα και αυτοάνοσα χολοστατικά μόνο στην περίπτωση που είχαν ενεργό νόσημα και στα αρχικά στάδια της ίνωσης.

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης παρουσίαζε αυξημένη δραστηριότητα στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και αλκοολική ηπατοπάθεια. Σε αυτούς τους ασθενείς ήταν επίσης σημαντικά αυξημένο το ποσοστό της οξειδωμένης γλουταθειόνης και σημαντικά μειωμένη η ανηγμένη γλουταθειόνη.

Συνεπώς στα παραπάνω νοσήματα υπήρχε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών που αντιμετώπιστηκαν όμως επαρκώς από το σύστημα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης-γλουταθειόνη. Η υπέρμετρη κατανάλωση της γλουταθειόνης όμως συμβάλλει στην μείωση των αποθεμάτων της και στην αύξηση της οξειδωμένης γλουταθειόνης.

Τα επίπεδα της δραστηριότητας της καταλάσης φαίνεται να αυξάνουν σημαντικά μόνο στις ιογενείς ηπατίτιδες σε σχέση με τους μάρτυρες. Στα υπόλοιπα ηπατικά νοσήματα αυξάνουν μεν αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό. Η καταλάση αναστέλλεται από την υπεροξειδική ρίζα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, την υδροξυλική ρίζα και από το μονήρες οξυγόνο. Το ίδιο και η υπεροξειδική δισμουτάση (Bray 1974, Escobar 1996).

Η υπεροξειδική δισμουτάση βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και στο κυτταρόπλασμα. Η υπεροξειδική δισμουτάση των μιτοχονδρίων είναι η υπεροξειδική δισμουτάση μαγγανίου, η σύνθεση της οποίας επάγεται από τις ελεύθερες ρίζες (Suzuki 1993, Wong 1988). Η υπεροξειδική δισμουτάση χαλκού/ψευδαργύρου βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, στο μιτοχόνδριο (στον ενδομεμβρανικό χώρο) και στα λυσοσώματα (Okado-Matsumoto 2001) και η σύνθεση της δεν

επάγεται από τις ελεύθερες ρίζες. Η μέθοδος μέτρησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ανιχνεύει κυρίως την υπεροξειδική δισμουτάση χαλκού/ψευδαργύρου. Το υπεροξειδικό ανιόν εξουδετερώνεται επίσης από την αντίδραση με το NO για να δημιουργήσει το υπεροξινιτρώδες, μια αντίδραση που είναι 2 με 3 φορές γρηγορότερη από την αντίδραση που καταλύει η υπεροξειδική δισμουτάση (Rubbo 1994).

Η υπεροξειδική δισμουτάση βρέθηκε υψηλότερη σε σχέση με τους μάρτυρες στους ασθενείς με μη αλκοολική, αλκοολική στεατοηπατίτιδα και αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα. Η δραστηριότητα του ενζύμου αυξήθηκε μόνο στις ασθένειες που σχετίστηκαν με μιτοχονδριακή βλάβη (αυτοάνοσα χολοστατικά, στεατοηπατίτιδες). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα εμφάνισαν τα υψηλότερα επίπεδα δραστηριότητας αυτού του ενζύμου σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες των ασθενών. Αντίθετα, στις ιογενείς ηπατίτιδες και στην αυτοάνοση ηπατίτιδα παρατηρήθηκε τάση μείωσης της δραστηριότητας του ενζύμου σε φάση βιοχημικής δραστηριότητας, γεγονός που δείχνει ότι στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες υπάρχει τάση μείωσης της δραστηριότητας του ενζύμου, κάτι που όμως δεν παρατηρήθηκε στα άλλα νοσήματα. Ανάλογα ευρήματα παρουσίασε ο Irshad και οι συνεργάτες του, που μελέτησαν τη δραστηριότητα του ενζύμου στις ιογενείς ηπατίτιδες (Irshad 2002) όπως επίσης και ο Moulas (Moulas 2004). Επίσης, ενώ όλες οι δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων μειώνονται στην κίρρωτική ομάδα, η υπεροξειδική δισμουτάση είναι το μόνο ένζυμο που η δραστηριότητα του παρουσίαζε τάση αύξησης στους κίρρωτικούς ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς του ίδιου νοσήματος. Ενδεχομένως, στις ασθένειες αυτές να αλλάζει η διαπερατότητα των μιτοχονδρίων και να απελευθερώνεται το ένζυμο από τα μιτοχόνδρια στη κυκλοφορία του αίματος. Η αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου στις παραπάνω περιπτώσεις ίσως να είναι δείκτης ηπατικής βλάβης και όχι αντιοξειδωτικής προστασίας για τον ηπατικό ιστό. Οι μη κίρρωτικοί ασθενείς με στεατοηπατίτιδα (αλκοολική και μη) και με πρωτοπαθή χολική κίρρωση πιθανόν να εμφανίζουν αυξημένη δραστηριότητα ενζύμων ως αποτέλεσμα της προσαρμογής τους στο οξειδωτικό στρες.

Οι παραπάνω δείκτες αναλύονται παρακάτω στη κάθε ασθένεια ξεχωριστά, ούτως ώστε να εκτιμηθεί ο βαθμός της συνολικής οξειδωτικής βλάβης σε σχέση με τα εργαστηριακά και τα ιστοπαθολογοανατομικά ευρήματα του κάθε νοσήματος.

Αν και υπάρχουν αρκετά στοιχεία από μελέτες που δείχνουν πως η παραμονή του ιού της ηπατίτιδας C, η πρόοδος της ηπατικής βλάβης και η καρκινογένεση στη χρόνια ηπατίτιδα C είναι όλα βήματα στα οποία εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες (Choi 2006, Ko 2005, Madiill 2009, Pal 2010), εντούτοις δεν έχει κατανοηθεί πλήρως ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ο ιός της ηπατίτιδας C οδηγεί ορισμένους ασθενείς στην προοδευτική εξέλιξη της ίνωσης ή στην κίρρωση και άλλους σε ήπια ηπατική βλάβη. Αρκετές μέχρι τώρα μελέτες έχουν ταυτοποιήσει αρκετούς παράγοντες που σχετίζονται με την εξέλιξη της χρόνιας ηπατίτιδας C σε κίρρωση. Μια ευρέως αποδεκτή υπόθεση είναι ότι η απάντηση του ανοσολογικού συστήματος στα ιικά αντιγόνα, είναι υπεύθυνη για την έναρξη και συντήρηση της ηπατικής βλάβης και μετέπειτα για την ανάπτυξη της ίνωσης και της κίρρωσης. Τα στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος που εμπλέκονται στην απάντηση αυτή είναι κυρίως τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα-μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) και τα λεμφοκύτταρα. Τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα περιέχουν MPO (Klebanoff 1999).

Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι η τοπική απελευθέρωση οξειδωτικών σε συνδυασμό με την παραγωγή κυτταροκινών από τα μακροφάγα οδηγεί σε καταστροφή των ηπατοκυττάρων (Milani 1990, Poli 2000, Wu 2000). Ορισμένες κυτταροκίνες όπως είναι ο TNF-α προάγουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Larrea 1998, Levent 2006). Ο De Maria και οι συνεργάτες του έδειξαν πως η MDA` είναι αυξημένη στο αίμα και στο ήπαρ, ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C (De Maria 1996). Ο Romero έδειξε υψηλότερα επίπεδα MDA στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C πριν τη θεραπεία με ιντερφερόνη και σημαντικά χαμηλότερες τιμές κατά τη θεραπεία (Romero 1998). Ανάλογα ευρήματα προέκυψαν και στην παρούσα μελέτη. Σε αρκετές μελέτες αναφέρεται χαμηλή δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης και συσχέτιση της με το βαθμό της φλεγμονώδους δραστηριότητας και της ηπατικής βλάβης σε διάφορα νοσήματα του ήπατος (Irshad 2002, Loginov 1991, Yasuyama 1988).

Η παρουσία ενεργού ιικού πολλαπλασιασμού σε ασθενείς με ηπατίτιδα C φαίνεται να συμβάλλει στη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Αυτό προκύπτει από τη σημαντική μείωση της

γλουταθειόνης, την επαγωγή της δραστηριότητας της μυελοπεροξειδάσης, τη δημιουργία προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσής και την αύξηση της δραστηριότητας της αναγωγάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης σε ασθενείς με ενεργό ιικό πολλαπλασιασμό. Σε έλεγχο του ιικού πολλαπλασιασμού (μετά από επιτυχή θεραπεία) παρατηρήθηκε μεν τάση αύξησης σε σχέση με τους μάρτυρες στους δείκτες οξειδωτικής βλάβης, αλλά αυτή η αύξηση δεν ήταν στατιστικώς σημαντική.

Η ανταπόκριση στη θεραπεία στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, που είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του ιικού φορτίου και των δεικτών ηπατικής βλάβης, συσχετίστηκε με μείωση και των προϊόντων οξειδωτικής βλάβης που ήταν σημαντικά αυξημένα προ θεραπείας και επανέφερε τις δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων σε φυσιολογικά επίπεδα. Από τα παραπάνω προκύπτει πως η μείωση της φλεγμονώδους δραστηριότητας με τη θεραπεία μείωσε με τη σειρά της τη δημιουργία ελευθέρων ριζών και τη δραστηριότητα της αντιοξειδωτικής άμυνας. Συνεπώς στους ασθενείς με ηπατίτιδα C φαίνεται πως το οξειδωτικό στρες είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του ιού και της φλεγμονώδης αντίδρασης που επάγει.

Όμως, οι ασθενείς που δεν είχαν λάβει θεραπεία παρουσίαζαν σημαντική αύξηση στα επίπεδα των αλδευδών, της οξειδωμένης γλουταθειόνης και της δραστηριότητας της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης σε σχέση με τους μάρτυρες, ακόμη και αυτοί με μη ενεργό ιικό πολλαπλασιασμό και φυσιολογικές τρανσαμινάσες. Αυτό δηλώνει ότι η παραγωγή ελευθέρων ριζών προηγείται της ηπατοκυτταρικής νέκρωσης και ίσως να επάγεται από τις δομικές πρωτεΐνες του ιού, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Okuda 2002). Η NS3, μια από τις μη-δομικές πρωτεΐνες του HCV έχει αναφερθεί να προκαλεί απελευθέρωση δραστηκών μορφών οξυγόνου (κυρίως της υπεροξειδικής ρίζας) από τα ουδετερόφιλα μέσω της NADPH οξειδάσης τους. Αυτό συμβαίνει μέσω της αύξησης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, που με τη σειρά του ενεργοποιεί τις κινάσες της τυροσίνης και την p38 κινάση. Τα τελευταία φαινόμενα είναι απαραίτητα για τη δημιουργία ελευθέρων ριζών (Bureau 2001, Betten 2001, Mellqvist 2000). Εκτός από την NS3, η NS5a και η πρωτεΐνη του πυρηνοκαψιδίου έχουν βρεθεί επίσης να επάγουν οξειδωτικό στρες σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και σε εμβρυικά ηπατοκύτταρα πάλι με τους ίδιους μηχανισμούς (Gong 2001, Moriya 2001). Επίσης, η πρωτεΐνη του περιβλήματος

του ιού προκαλεί μιτοχονδριακή βλάβη που με την σειρά της αυξάνει το οξειδωτικό στρες (Okuda 2002). Αξίζει να αναφερθεί ότι και στην περίπτωση που δεν έχουν ακόμη ενεργοποιηθεί οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις, ο ιός μέσω των πρωτεϊνών του, έχει την ικανότητα να δημιουργεί οξειδωτικό στρες με το μηχανισμό που προαναφέρθηκε. Μία αναφορά από τον Vendemiale και τους συνεργάτες του αναφέρει ότι οι φορείς του ιού με φυσιολογικά επίπεδα τρανσαμινασών, έχουν οξειδωτικό στρες χωρίς τη διαμεσολάβηση φλεγμονωδών αντιδράσεων (Vendemiale 2001).

Οι ασθενείς με ηπατίτιδα C είχαν μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης κατά 30% σε σχέση με τους μάρτυρες και το εύρημα αυτό αφορούσε κυρίως ασθενείς με ενεργό ιικό πολλαπλασιασμό. Αν και η μείωση βρέθηκε να είναι σημαντική σε σχέση με τα επίπεδα των μαρτύρων, εντούτοις τα παραγόμενα επίπεδα γλουταθειόνης στους ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα C φαίνεται να επαρκούν για την προστασία του ηπατοκυττάρου. Συνηγορητικό υπέρ των παραπάνω είναι το γεγονός ότι η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης ήταν σημαντικά αυξημένες στους ασθενείς με ενεργό ηπατίτιδα, γεγονός που υποδηλώνει ότι στη κατηγορία αυτή των ασθενών η παραγωγή των ελευθέρων ριζών αντισταθμίζεται από την επαγωγή της αντιοξειδωτικής άμυνας.

Οι δείκτες οξειδωτικής βλάβης συσχετίστηκαν θετικά με την παρουσία κίρρωσης και φλεγμονώδους δραστηριότητας στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C. Όπως προαναφέρθηκε στην κίρρωση μειώνονται τα επίπεδα όλων των αντιοξειδωτικών παραγόντων. Ανάλογα ήταν και τα ευρήματα στους ασθενείς με ηπατίτιδα C, όπου τα επίπεδα τους παρουσίασαν αύξηση από το αρχικό στο μέτριο στάδιο της ίνωσης και μείωση στην προχωρημένη ίνωση.

Τα κύρια ευρήματα στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C είναι η θετική συσχέτιση του οξειδωτικού στρες με την ινογένεση, ενώ η αποτελεσματική αντική θεραπεία έχει συσχετιστεί με σημαντική μείωση στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και την οξειδωτική βλάβη. Αν και οι περισσότεροι δείκτες οξειδωτικού στρες έχουν μελετηθεί σε ασθενείς με ηπατίτιδα C σε προηγούμενες μελέτες, η μελέτη μας είναι περισσότερο εμπειρισταωμένη γιατί βασίζεται στη ταυτόχρονη ανάλυση αρκετών παραμέτρων οξειδωτικών παραγόντων και αντιοξειδωτικής άμυνας. Επίσης, η σύγκριση των επιπέδων όλων των δεικτών οξειδωτικού στρες των ασθενών με ηπατίτιδα B με αυτά των ασθενών με ηπατίτιδα C δείχνει ότι στη δεύτερη ομάδα ανευρέθηκαν

υψηλότερα επίπεδα στους περισσότερους από τους δείκτες οξειδωτικού στρες. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τους Fujita και συνεργάτες που βρήκαν υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικής βλάβης του DNA στους ασθενείς με ηπατίτιδα C σε σχέση με αυτά των ασθενών με ηπατίτιδα B (Fujita 2008).

Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία υπάρχουν λίγα δεδομένα που αφορούν τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με ηπατίτιδα B, με εστιασμό κυρίως στον προσδιορισμό μεμονωμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων και μόνο των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης από τα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης (Acar 2009, Chen 2007, Severi 2006, Yang 2008). Οι περισσότερες μελέτες έχουν διαπραγματευθεί την πιθανή σχέση του οξειδωτικού στρες με την ηπατοκαρκινογένεση (Abel 2009, Tsai 2009, Wu 2008). Στην παρούσα μελέτη για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία προσδιορίζονται τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της δραστηκότητας της MPO σε ασθενείς με ηπατίτιδα B, ενώ για πρώτη φορά πραγματοποιείται η ταυτόχρονη ανάλυση προϊόντων οξειδωτικής βλάβης και παραμέτρων της αντιοξειδωτικής άμυνας.

Στους ασθενείς με κίρρωση έχουν γίνει μόνο δυο μελέτες, όπου μετρήθηκαν τα σύμπλοκα των λιπιδίων με το DNA και συσχετίστηκαν με την κίρρωση και την ήπατοκαρκινογένεση (Grossi 2008, Nair 2010). Στην παρούσα μελέτη οι κίρρωτικοί ασθενείς με ηπατίτιδα B δεν παρουσίαζαν μεταβολή στη δραστηκότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, ενώ οι μη κίρρωτικοί ασθενείς είχαν αύξηση αυτών. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι οι κίρρωτικοί χαρακτηρίζονται από διαταραχή της αντιοξειδωτικής άμυνας, η οποία με τη σειρά της φαίνεται να ενισχύει την περαιτέρω αύξηση των προϊόντων οξειδωτικής βλάβης. Σε αναλογία με τα παραπάνω οι κίρρωτικοί ασθενείς με ηπατίτιδα B είχαν υψηλότερα επίπεδα ισοπροστανίων σε σχέση με τους μάρτυρες, κάτι που δεν παρατηρήθηκε σε μη κίρρωτικούς ασθενείς. Δεδομένου του μικρού αριθμού κίρρωτικών ασθενών σε αυτή την ομάδα, αν και υπήρχε τάση αύξησης όλων των δεικτών οξειδωτικής βλάβης στην κίρρωτική ομάδα σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς, εντούτοις οι διαφορές δεν ήταν σημαντικές.

Η σύγκριση των χρόνιων ανενεργών φορέων της ηπατίτιδας B δεν ανέδειξε διαφορά με τους μάρτυρες ως προς τη δραστηκότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά δυο προηγούμενων μελετών

(Acar 2009, Bolukbas 2005). Αντίθετα οι χρόνιοι ανενεργοί φορείς παρουσίαζαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης και σημαντικά υψηλότερα επίπεδα αλδευδών, πρωτεϊνικών καρβονυλίων και δραστικότητας καταλάσης σε σχέση με τους μάρτυρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι ακόμη και οι ανενεργοί φορείς χαρακτηρίζονται από την παρουσία οξειδωτικού στρες. Ανάλογα ήταν τα ευρήματα σε ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β, με τη διαφορά ότι παρατηρήθηκαν επιπλέον σημαντικά υψηλότερα επίπεδα οξειδωμένης γλουταθειόνης/ολικής σε σχέση με τους μάρτυρες.

Στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων και αλδευδών αν και σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με αυτά που παρατηρήθηκαν σε ασθενείς χωρίς ανταπόκριση στη θεραπεία. Σε αντίθεση με όσα παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με ηπατίτιδα C, η καταστολή του ιικού πολλαπλασιασμού και της φλεγμονώδους δραστηριότητας στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β δεν συσχετίστηκε με μείωση των δεικτών οξειδωτικού στρες σε φυσιολογικά επίπεδα, γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει ότι στην παραγωγή του οξειδωτικού στρες πιθανόν να εμπλέκονται και άλλοι παράμετροι. Παρόλο όμως που η δημιουργία ελευθέρων ριζών παρατηρήθηκε σε όλους τους ασθενείς με ηπατίτιδα Β (ανενεργούς και μη), τα συνολικά επίπεδα αυτών ήταν χαμηλότερα σε σχέση με τους ασθενείς με ηπατίτιδα C και των ασθενών με τα λοιπά ηπατικά νοσήματα (αυτοάνοσα νοσήματα, αλκοολική και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα).

Αρκετά μέχρι στιγμής δεδομένα από την υπάρχουσα βιβλιογραφία έχουν δείξει ότι η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ επιδρά στο ήπαρ, τόσο μέσω οξειδωτικού στρες, όσο και μέσω διαταραχών στο μεταβολισμό της μεθειονίνης, ενδοπλασματικού στρες και ανισορροπίας αδιποκινών (Bondy 1992, Cederbaum 1991, Mantle 1999). Επίσης, αρκετά πειράματα σε πειραματόζωα και διάφορες μελέτες όπου χορηγούσαν αντιοξειδωτικές ουσίες έχουν βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων το οξειδωτικό στρες συμβάλλει στην παθογένεια της αλκοολικής βλάβης. Αναλυτικά, η εμπλοκή της οξειδωτικής βλάβης στην τοξικότητα της αιθανόλης έχει δειχθεί σε αρκετές μελέτες, στις οποίες φάνηκε ότι τόσο ζώα που τρέφονται με αιθανόλη, όσο και ασθενείς με στεατοηπατίτιδα είχαν αυξημένα προϊόντα λιπιδικής υπεροξειδωσης (Albano 2006, Albano 2008, Cederbaum 2009, Gundogan 2010). Τα πιο

αξιόπιστα δεδομένα που αφορούν στο ρόλο της οξειδωτικής βλάβης στην παθογένεια της αλκοολικής ηπατικής βλάβης προέρχονται από πειραματικά μοντέλα, στα οποία τα υπό μελέτη ζώα τρεφόταν με αιθανόλη. Τα πειράματα αυτά έδειξαν πως η μείωση των ακόρεστων λιπαρών από την τροφή ή η χορήγηση στα ζώα αντιοξειδωτικών ή αναστολέων της δημιουργίας των ελευθέρων ριζών έχει σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της ηπατικής νέκρωσης, της φλεγμονής και σε ορισμένες περιπτώσεις της στεάτωσης (Albano 2006, Arteel 2003, Dey 2006, Nanji 2003). Η εξέταση του ήπατος ποντικών που τρέφονταν με αλκοόλ ανέδειξε την ύπαρξη πρωτεϊνών συνδεδεμένων με προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης (συζευγμένα διένια, MDA, 4-HNE, F2-ισοπροστάνια και μείγματα ακεταλδεΐδης-MDA). Ανάλογα στον ορό κίρρωτικών ασθενών με ενεργό νόσο καθώς και στους αλκοολικούς με κίρρωση ή εκτεταμένη ίνωση τα αντισώματα ενάντια στην MDA και στην 4-HNE ήταν πολύ πιο αυξημένα σε σχέση με τους μη-αλκοολικούς υγιείς και τους μη-αλκοολικούς με κάποια άλλη ηπατοπάθεια (Mottaran 2002).

Στην παρούσα μελέτη η ταυτόχρονη μέτρηση των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων σε αρκετά χρόνια νοσήματα του ήπατος και ειδικά στη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα καθιστά δυνατή τη σύγκριση του βαθμού οξειδωτικού στρες μεταξύ των διαφόρων ομάδων των ασθενών. Οι ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια είχαν υψηλότερα επίπεδα δεικτών λιπιδικής υπεροξειδωσης, υψηλότερη δραστικότητα MPO και χαμηλότερα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης σε σχέση με τα άλλα νοσήματα του ήπατος. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συνάρτηση με την αύξηση του βαθμού της λιπιδικής υπεροξειδωσης που παρατηρείται στην αλκοολική ηπατοπάθεια.

Από τον πληθυσμό των ασθενών με αλκοολική ηπατοπάθεια που μελετήθηκαν, η πλειοψηφία (83%) ήταν κίρρωτικοί, ενώ οι περισσότεροι είχαν διακόψει την υψηλή κατανάλωση αλκοόλ. Οι μη κίρρωτικοί ασθενείς είχαν υψηλότερη δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων και χαμηλότερα επίπεδα προϊόντων οξειδωτικής βλάβης σε σχέση με τους κίρρωτικούς, γεγονός που υποδηλώνει ότι στην κίρρωση διαταράσσεται η λειτουργία των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Γενικώς όμως η δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (με εξαίρεση της υπεροξειδικής δισμουτάσης) δεν παρουσίαζε σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες στους μη κίρρωτικούς και στους ασθενείς που είχαν αυξημένες τρανσαμινάσες. Η μη σημαντική μεταβολή των επιπέδων της

δραστικότητας της υπεροξειδάσης και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης πιθανόν να οφείλεται στα πολύ χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης. Η δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης ήταν σημαντικά αυξημένη μόνο στους ασθενείς που είχαν αυξημένους δείκτες ηπατικής βλάβης. Τα παραπάνω συνάδουν με ευρήματα προηγούμενων μελετών που δείχνουν πως σε χρόνια νοσήματα του ήπατος είναι αυξημένη η δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης. Σε κάποιες μελέτες συμπεράναν ότι η αυξημένη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης οφείλεται στην αυξημένη απελευθέρωση της από τα κατεστραμμένα ηπατοκύτταρα (Das 2008, Perlemuter 2005, Zhurkin 1989). Επίσης, η αναστολή της σύνθεσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης του μαγγανίου στα μιτοχόνδρια έχει ως αποτέλεσμα της αύξηση της σύνθεσης της κυτταροπλασματικής υπεροξειδικής δισμουτάσης του χαλκού/ψευδαργύρου (Warner 1996, Wong 1989).

Η υψηλή δραστικότητα της MPO σε ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια σε σχέση με τις άλλες ομάδες ασθενών υποδηλώνει αυξημένη ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων. Υπάρχουν αρκετά δεδομένα που δείχνουν ότι μέρος της ηπατικής βλάβης στην αλκοολική ηπατοπάθεια οφείλεται σε αυτοάνοσες αντιδράσεις έναντι νεοαντιγόνων ως αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ ηπατικών πρωτεϊνών και μεταβολιτών που προκύπτουν από το μεταβολισμό της αιθανόλης (Paronetto 1993). Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί αντισώματα έναντι της ακεταλδεΐδης στον ορό ασθενών με αλκοολική ηπατοπάθεια καθώς και σε ποντίκια στα οποία είχε χορηγηθεί αλκοόλη (Albano 1996, Albano 2002, Rolla 2000). Μεταβολές σε πρωτεΐνες επαγόμενες από την παρουσία οξειδωτικής βλάβης και συγκεκριμένα η δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων με την ακεταλδεΐδη, την MDA και την 4-HNE έχουν παρατηρηθεί στο ήπαρ ποντικών στα οποία χορηγήθηκε αλκοόλη (Tsukamoto 1995). Ο Mottaran και συνεργάτες έδειξαν ότι αντισώματα έναντι αυτών των νεοαντιγόνων βρέθηκαν σε πολύ υψηλότερους τίτλους σε ασθενείς με κίρρωση συγκριτικά με ασθενείς που είχαν μόνο λιπώδης διήθηση (Mottaran 2002).

Πολλές πειραματικές μελέτες αλλά και μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει την ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της σοβαρότητας της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας και του βαθμού του οξειδωτικού στρες (Petta 2009). Το οξειδωτικό στρες στη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα ξεκινά από την περίσσεια των ελεύθερων λιπαρών οξέων, που οξειδώνονται μέσα στα κύτταρα. Η φυσιολογική διαδικασία οξείδωσης (β-οξείδωση) που συμβαίνει στα μιτοχόνδρια, ενισχύεται σε

μεγάλο βαθμό στην μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα και αποτελεί την κύρια πηγή παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Sanyal 2001). Αρκετές μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δεικτών οξειδωτικής βλάβης και μείωση των παραμέτρων που συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική άμυνα, στη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (Chalassani 2004, Yesilova 2005).

Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν και από την παρούσα μελέτη, στην οποία ασθενείς με φυσιολογικές τρανσαμινάσες και λιπώδη διήθηση στο ήπαρ που δεν είχαν υποβληθεί σε βιοψία, εμφάνιζαν σημαντικά αυξημένη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης και αυξημένα επίπεδα ισοπροστανίων. Τα αποτελέσματα είναι συνηγορητικά αυτών από μελέτη σε ποντίκια, στα οποία δημιουργήθηκε στεάτωση (Zhu 2008). Στο πειραματικό αυτό μοντέλο, η αυξημένη παραγωγή ισοπροστανίων ανιχνεύεται πριν τη δημιουργία ηπατοκυτταρικής νέκρωσης.

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια που συνήθως αυξάνονται σε καταστάσεις έντονου οξειδωτικού στρες ήταν σημαντικά αυξημένα μόνο στους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα σε σχέση με τους μάρτυρες. Οι ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα είχαν επιπλέον σημαντική αύξηση στα επίπεδα των αλδευδών, της δραστηριότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης και σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα γλουταθειόνης. Οι παραπάνω σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν τόσο στους ασθενείς με φυσιολογικές τρανσαμινάσες όσο και σε αυτούς με αυξημένες τρανσαμινάσες, εντούτοις η διαφορά στα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης ήταν μεγαλύτερη σε αυτούς με αυξημένες τρανσαμινάσες. Επιπλέον, στους τελευταίους αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες η δραστηριότητα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης και η δραστηριότητα της MPO (Machado 2008). Τα παραπάνω δηλώνουν ότι η οξειδωτική βλάβη συμβαίνει σε όλους τους ασθενείς που έχουν αναπτύξει φλεγμονή στο ήπαρ και φαίνεται να προϋπάρχει της ηπατοκυτταρικής βλάβης.

Η δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης δεν βρέθηκε μειωμένη στους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Αντίθετα η δραστηριότητα της ήταν αυξημένη τόσο σε ασθενείς με φυσιολογικές όσο και σε ασθενείς με παθολογικές τρανσαμινάσες, ενδεχομένως για την αποτελεσματική αντιμετώπιση των αυξημένων ελευθέρων ριζών. Όπως προαναφέρθηκε η δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης έχει βρεθεί να αυξάνεται και σε άλλα χρόνια

νοσήματα του ήπατος (Das 2008, Perlemuter 2005, Zhurkin 1989). Στην περίπτωση της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας, που η οξειδωτική βλάβη ξεκινά από τα μιτοχόνδρια, είτε η καταστροφή τους, είτε η αυξημένη έκθεση τους στο οξειδωτικό στρες μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση της δραστικότητα της κυτταροπλασματικής υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τα επίπεδα της δραστικότητα της καταλάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα σε σχέση με αυτά των μαρτύρων. Τα παραπάνω συνηγορούν με ευρήματα μελέτης που μέτρησε τις δραστικότητες των ενζύμων στο ήπαρ και στο αίμα ασθενών με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (Perlemuter 2005). Συγκεκριμένα, οι δραστικότητες των παραπάνω ενζύμων βρέθηκαν σημαντικά αυξημένες στο ήπαρ, ενώ στο αίμα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές. Πρέπει να επισημανθεί ότι στην παρούσα μελέτη, η πλειοψηφία των ασθενών με μη αλκοολική ηπατοπάθεια είχαν ελάχιστη/ήπια ίνωση (21/28). Όταν συσχετίστηκαν οι δραστικότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων και τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης με το στάδιο της ίνωσης, τότε παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ τους (όσο αυξάνεται το στάδιο της ίνωσης, τόσο μειώνονται τα επίπεδα τους). Αντίθετα τα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης αυξήθηκαν παράλληλα με την αύξηση του σταδίου της ίνωσης. Αυτό είναι μια ισχυρή ένδειξη ότι στην πρόοδο της ηπατικής νόσου σημαντικό ρόλο παίζει η μείωση ή η αναστολή της αντιοξειδωτικής άμυνας, που με τη σειρά της αφήνει το κύτταρο απροστάτευτο από τις βλαπτικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών.

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα στους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα είναι η σημαντική αύξηση της δραστικότητα της MPO σε σχέση με τους μάρτυρες στους ασθενείς που είχαν αυξημένες τρανσαμινάσες. Αυτό είναι ενδεικτικό της αντίδρασης που επάγεται όπως προαναφέρθηκε από το οξειδωτικό στρες ενάντια σε προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης στους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (Albano 2005). Αντίθετα ασθενείς με απλή στεάτωση και φυσιολογικές τρανσαμινάσες δεν παρουσίαζαν μεταβολή της δραστικότητα της MPO σε σχέση με τους μάρτυρες. Συνεπώς, η μέτρηση της δραστικότητα της MPO στο αίμα πιθανόν να αντικατοπτρίζει την παρουσία φλεγμονής στο ήπαρ. Σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι η συσσώρευση των προϊόντων οξειδωσης της MPO των κυτάρων Kupffer σχετίζεται με την

επαγωγή χυμοκινών και τη συσσώρευση ουδετεροφίλων στο ηπατικό παρέγχυμα, που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της NASH (Rensen 2009).

Όπως προκύπτει από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας στην παρούσα μελέτη, είναι η πρώτη φορά που μελετώνται οι δείκτες οξειδωσης των πρωτεϊνών, η δραστικότητα της MPO και τα περισσότερα συστατικά της ενδογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας στα αυτοάνοσα νοσήματα. Σε προηγούμενες μελέτες (πολύ λίγες στον αριθμό) έχουν κυρίως μελετηθεί μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες (π.χ. αντιοξειδωτικές βιταμίνες) τα οποία επηρεάζονται σημαντικά από το είδος της διατροφής, τα επίπεδα της γλουταθειόνης και τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Στην αυτοάνοση ηπατίτιδα έχει πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής μόνο μια κλινική μελέτη που ανέδειξε αυξημένα προϊόντα λιπιδικής υπεροξειδωσης και μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών βιταμινών σε 33 ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα (Pemberton 2004). Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα αλδεϋδών σε όλους τους ασθενείς με αξιοσημείωτη αύξηση στους κίρρωτικούς ασθενείς. Οι υπόλοιποι δείκτες οξειδωτικής βλάβης ήταν επίσης σημαντικά αυξημένοι μόνο στους κίρρωτικούς ασθενείς.

Η δραστικότητα της καταλάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης αυξήθηκε σημαντικά στις περιπτώσεις με νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα, ενώ η δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης παρουσίαζε ήπια μείωση σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντίθετα, στους κίρρωτικούς δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, ενώ τα επίπεδα της γλουταθειόνης μειώθηκαν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες. Η μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας αυξάνει την ευπάθεια των ηπατοκυττάρων στο οξειδωτικό στρες, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την πιο έντονη αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης στους κίρρωτικούς ασθενείς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς με αυτοάνοση ηπατίτιδα. Παράλληλα τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, που είναι δείκτης έντονου οξειδωτικού στρες παρουσίασαν σημαντική αύξηση στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς ασθενείς.

Δεδομένου ότι η ΑΗ είναι σπάνιο νόσημα (170 περιπτώσεις ανά ένα εκατομμύριο στη Νότια Ευρώπη) είναι αρκετά δύσκολο να συγκριθούν ασθενείς που παίρνουν θεραπεία με ασθενείς που

δεν παίρνουν θεραπεία. Στην παρούσα μελέτη οι 34 στους 36 ασθενείς που μελετήθηκαν ήταν υπό θεραπεία τη στιγμή της αιμοληψίας. Η ανταπόκριση στη θεραπεία συσχετίστηκε με τη βελτίωση των περισσότερων δεικτών οξειδωτικού στρες με εξαίρεση τα επίπεδα των αλδευδών και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, που ήταν σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τους μάρτυρες. Αυτό δείχνει ότι η ανοσοκατασταλτική θεραπεία που χορηγείται σε ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα δεν καταστέλλει πλήρως τη δημιουργία ελευθέρων ριζών.

Το οξειδωτικό στρες δεν είναι ένα εύρημα του τελικού σταδίου της ασθένειας, αλλά φαίνεται ότι είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό που εμφανίζεται από τα αρχικά στάδια της αυτοάνοσης ηπατίτιδας, όπως φαίνεται από τη σημαντικά χαμηλή γλουταθειόνη και την αύξηση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης από τα αρχικά στάδια της ίνωσης.

Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση (ΠΧΚ) είναι ένα χρόνια χολοστατικό νόσημα που χαρακτηρίζεται συχνά από ανοσολογικά επαγόμενες βλάβες των ενδοηπατικών χοληφόρων οδηγώντας έτσι στα τελικά στάδια της νόσου (Lindor 1999). Μελέτες που να αφορούν στο ρόλο του οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με ΠΧΚ είναι ελάχιστες. Συγκεκριμένα στην ΠΧΚ έχουν μελετηθεί μόνο τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης, οι αντιοξειδωτικές βιταμίνες (Karlan 1988, Nyberg 1988), η γλουταθειόνη και η υπεροξειδική δισμουτάση (Aboutwerat 2003). Στην παρούσα μελέτη για πρώτη φορά μετρήθηκαν τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, η δραστηριότητα της καταλάσης, της μυελοπεροξειδάσης, της υπεροξειδάσης και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης. Επίσης, είναι η μόνη μελέτη μέχρι στιγμής στην οποία έχουν μετρηθεί ταυτόχρονα οι δείκτες αντιοξειδωτικής ενζυμικής άμυνας και οι δείκτες οξειδωτικής βλάβης σε ασθενείς με ΠΧΚ. Η μέτρηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων στο αίμα παρέχει μια πιο αξιόπιστη εκτίμηση της αντιοξειδωτικής άμυνας σε σχέση με την μέτρηση των αντιοξειδωτικών βιταμινών στο αίμα γιατί η απορρόφηση των τελευταίων επηρεάζεται στην ΠΧΚ.

Σε μια ανοσοιστοχημική μελέτη ηπατικών βιοψιών ανιχνεύθηκε η παρουσία MDA και 4-HNE σε πέντε ασθενείς με ΠΧΚ (Paradis 1997A). Σε μια πρόσφατη μελέτη, η 4-HNE ανιχνεύθηκε στα ηπατοκύτταρα που εντοπίζονται γύρω από τα πυλαία σε 20 ασθενείς με ΠΧΚ (Kawamura 2000). Αυξημένα επίπεδα υπεροξειδικής δισμουτάσης του μαγγανίου έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ΠΧΚ. Η έκφραση της αυξάνεται στα κατεστραμμένα επιθηλιακά κύτταρα ή στις ενδολοβιακές

χοληφόρους οδούς και στα αναγεννημένα ηπατοκύτταρα (Ono 1991). Στη παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκαν τα παραπάνω αποτελέσματα, μιας και βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα αλδευδών, πρωτεϊνικών καρβονυλίων και δραστηριότητας υπεροξειδικής δισμουτάσης σε όλους τους ασθενείς συμπεριλαμβανομένου και αυτών με φυσιολογικά επίπεδα δεικτών ηπατικής βλάβης. Οι παραπάνω δείκτες οξειδωτικής βλάβης αυξήθηκαν σημαντικά ενώ τα επίπεδα της γλουταθειόνης μειώθηκαν σημαντικά από τα αρχικά στάδια της ίνωσης, γεγονός που δείχνει ότι το οξειδωτικό στρες είναι χαρακτηριστικό της νόσου αρχικού σταδίου.

Επίπεδα ισοπροστανίων συσχετίστηκαν θετικά με το στάδιο Ludwig και με τους δείκτες ηπατικής βλάβης και χολόστασης. Ο λόγος οξειδωμένης γλουταθειόνης/ολική δεν φάνηκε να αλλάζει σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες σε όλες τους ασθενείς με ΠΧΚ, γεγονός που δηλώνει ότι λειτουργεί φυσιολογικά ο οξειδοαναγωγικός κύκλος που μετατρέπει την οξειδωμένη γλουταθειόνη σε ανηγμένη από το σύστημα NADPH/αναγωγή της γλουταθειόνης. Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι οι δραστηριότητες των δυο αντιοξειδωτικών ενζύμων που συμμετέχουν στον κύκλο δεν παρουσίαζαν σημαντική μεταβολή σε σχέση με τους μάρτυρες. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με παρατηρήσεις που έγιναν σε πειραματικό μοντέλο απολίνωσης του χοληφόρου πόρου και από μια άλλη μελέτη σε ασθενείς με ΠΧΚ, όπου η συνολική γλουταθειόνη του πλάσματος μειώνεται σημαντικά αλλά ο λόγος οξειδωμένης γλουταθειόνης/ολική παραμένει αμετάβλητος (Baron 1999, Ljubuncic 2000, Pastor 1997). Η αύξηση του λόγου συμβαίνει μόνο στους κίρρωτικούς ασθενείς κάτι που παρατηρήθηκε και στη παρούσα μελέτη. Η ανταπόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με ΠΧΚ μειώνει τις δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων, αυξάνει τα επίπεδα της γλουταθειόνης και μειώνει αυτά των ισοπροστανίων. Όμως δεν μειώνει στα φυσιολογικά επίπεδα τις αλδεύδες, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και τη γλουταθειόνη. Αυτό είναι σε συμφωνία με τον Pemperton 2006, όπου η θεραπεία με ουρσοδεοξυλικό οξύ βελτίωσε την ποσότητα της γλουταθειόνης αλλά δεν μείωσε τα προϊόντα λιπιδικής υπεροξειδωσης. Η δραστηριότητα της μυελοπεροξειδάσης, που αναλύθηκε για πρώτη φορά στους ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, παρουσίαζε θετική συσχέτιση με το στάδιο της ίνωσης στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα. Αντίθετα, στους ασθενείς με

πρωτοπαθή χολική κίρρωση βρέθηκε μείωση της δραστηριότητας στους κίρρωτικούς, ενώ δεν υπήρχε συσχέτιση με τους δείκτες ηπατικής βλάβης.

Συμπερασματικά, οι μάρτυρες είχαν τα μικρότερα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες και τη μικρότερη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων από όλες τις ομάδες των ασθενών. Αυτό υποδηλώνει ότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε όλες τις ασθένειες του ήπατος με διαφορετικό βαθμό όμως στην κάθε κατηγορία. Η γλουταθειόνη που είναι η πιο άφθονη αντιοξειδωτική ουσία (Meister 1988) μειώθηκε σημαντικά σε όλες τις ομάδες των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντίθετα οι δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων δεν παρουσίασαν μείωση σε σχέση με μάρτυρες (με εξαίρεση την υπεροξειδική δισμουτάση στους ασθενείς με ηπατίτιδα C). Παρατηρήθηκε γενικά αύξηση στα επίπεδα της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων σε σχέση με μάρτυρες κυρίως στις περιπτώσεις που τα υπό μελέτη νοσήματα ήταν σε ενεργότητα. Όμως υπήρχαν και περιπτώσεις αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπου οι δραστηριότητες τους παρουσίαζαν σημαντική αύξηση σε σχέση με μάρτυρες ακόμη και στους ασθενείς με ανενεργό νόσο. Συγκεκριμένα, η δραστηριότητα της καταλάσης ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες συγκριτικά με μάρτυρες. Ακολούθως, η δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης παρουσίαζε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στους ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, με ΠΧΚ και με ηπατίτιδα C, συγκριτικά με τους μάρτυρες, Τέλος, η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης ήταν σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα σε σχέση με τους μάρτυρες. Σε γενικές γραμμές όμως, τα επίπεδα της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων ήταν υψηλότερα στους ασθενείς που παρουσίαζαν αυξημένους δείκτες ηπατικής βλάβης σε σχέση με τους ασθενείς με φυσιολογικές τρανσαμινάσες. Όμως υπήρχαν και περιπτώσεις νοσημάτων (ασθενείς με ηπατίτιδα C που δεν είχαν λάβει θεραπεία), όπου οι δραστηριότητες της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης ήταν σε υψηλότερα επίπεδα στους ασθενείς που είχαν ανενεργό το νόσημα σε σχέση με τους ασθενείς με ενεργό νόσο. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με ανενεργό ηπατίτιδα C παρουσίαζαν σημαντική αύξηση των επιπέδων της δραστηριότητας των δυο αντιοξειδωτικών ενζύμων σε σχέση με μάρτυρες, ενώ οι ασθενείς με ενεργό ηπατίτιδα C είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα δραστηριότητας υπεροξειδικής δισμουτάσης και παρόμοια επίπεδα δραστηριότητας καταλάσης σε σχέση με τους

μάρτυρες. Η αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων δηλώνει προσαρμογή στα αυξανόμενα επίπεδα οξειδωτικού στρες και ότι η αντιοξειδωτική άμυνα λειτουργεί φυσιολογικά (Chow 1988).

Η ομάδα των κίρρωτικών σε όλα τα υπό μελέτη νοσήματα του ήπατος παρουσίαζε χαμηλότερα επίπεδα γλουταθειόνης σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς και τους μάρτυρες. Τα επίπεδα της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων (με εξαίρεση τη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης στη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα) παρουσίαζαν επίσης μείωση στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς. Αντίθετα, τα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης ήταν σε υψηλότερα επίπεδα στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς και τους μάρτυρες σε όλα τα υπό μελέτη ηπατικά νοσήματα. Συνεπώς, η μείωση των επιπέδων ή η διαταραχή της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων αυξάνει περισσότερο τα επίπεδα των προϊόντων οξειδωτικής βλάβης, που με τη σειρά τους συνεισφέρουν στην ενίσχυση της ανοσολογικής αντίδρασης και στην ίνωση δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο. Επίσης, σύμφωνα με τον Deleve η ηπατική αποσύνθεση στα τελευταία στάδια της ασθένειας μπορεί από μόνη της να οδηγήσει στη παραπέρα δημιουργία ελευθέρων ριζών (Deleve 1990).

Η δημιουργία των ΔΜΟ/ΔΜΑ έχει δείχθει να συμβαίνει από τα αρχικά στάδια της ασθένειας στους ασθενείς με ΑΙΗ και ΠΧΚ. Στους ασθενείς με ΠΧΚ, η χολόσταση που είναι κύριο χαρακτηριστικό της ασθένειας οδηγεί στη συσσώρευση των χολικών οξέων και χαλκού στο ήπαρ, γεγονός τα οποία οδηγούν στη δημιουργία των ελευθέρων ριζών [Britton 1995, Ljubuncic 1996, Sokol 1995]. Επιπλέον, η θεραπεία των ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα είναι πιο αποτελεσματική στο να βελτιώνει την παραγωγή των ελευθέρων ριζών από ότι η θεραπεία των ασθενών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση. Παρομοίως, τα θεραπευτικά σχήματα της ηπατίτιδας C μείωσαν στα φυσιολογικά επίπεδα τα αυξημένα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης, ενώ δεν παρατηρήθηκε το ίδιο στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β.

Τα υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με αλκοολική στεατοηπατίτιδα, οι περισσότεροι εκ των οποίων ήταν στο στάδιο της κίρρωσης, ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β. Οι ασθενείς με ηπατίτιδα C που δεν είχαν λάβει θεραπεία είχαν αρκετά υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες.

Οι περισσότεροι δείκτες οξειδωτικού στρες συσχετίστηκαν θετικά με τη φλεγμονώδη δραστηριότητα στο ήπαρ. Η πιο σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε στη δραστικότητα της μυελοπεροξειδάσης. Συνεπώς, η μέτρηση της δραστικότητας της στο αίμα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της φλεγμονώδους δραστηριότητας στο ήπαρ.

Τα ευρήματα της παρούσης μελέτης όπως προαναφέρθηκε συμφωνούν με μελέτες άλλων και ενισχύουν την άποψη ότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην πρόοδο των ηπατικών νοσημάτων, καθώς συσχετίστηκε θετικά με την ιστολογική φλεγμονή και την ηπατική ινογένεση σε όλα τα υπό μελέτη νοσήματα του ήπατος. Προφανώς, πρωτοεμφανίζεται ως αποτέλεσμα της ασθένειας, αλλά στη συνέχεια δημιουργεί ένα καταρράκτη γεγονότων που αναχαιτίζονται μερικώς από τη θεραπεία και συμβάλλει με τη σειρά του στην παραπέρα ενεργοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο.

Η χρόνια φλεγμονή που ήπατος στα υπό μελέτη νοσήματα συντηρεί τη χρόνια παραγωγή ελευθέρων ριζών, μιας και η φλεγμονώδης αντίδραση του ξενιστή είναι μια από τις κυρίες αιτίες δημιουργίας ελευθέρων ριζών (Khansari 2009). Η χρόνια έκθεση των ασθενών σε ΔΜΟ/ΔΜΑ έχει ως αποτέλεσμα την κατανάλωση της γλουταθειόνης και τη διαταραχή της αντιοξειδωτικής άμυνας, που με τη σειρά της κάνει τα κύτταρα πιο ευπαθή στο οξειδωτικό στρες. Η ανεπαρκής αντιοξειδωτική προστασία των κυττάρων επιταχύνει την οξειδωτική βλάβη και οδηγεί ευκολότερα και γρηγορότερα το ηπατοκύτταρο στη νέκρωση. Συνεπώς θεραπείες που θα ανέστελλαν την οξειδωτική βλάβη και θα ενίσχυαν την αντιοξειδωτική άμυνα, προφανώς να αναχαιτίζουν την ηπατοκυτταρική νέκρωση και να καθυστερούσαν αρκετά την πρόοδο της ασθένειας.

Υπάρχουν αρκετά στοιχεία που στηρίζουν την άποψη ότι οι αντιοξειδωτικές θεραπείες μπορούν να μειώσουν τη νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (Medina 2005, Melhem 2005). Σε πρόσφατη μελέτη ο Vidalι και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι το οξειδωτικό στρες και η αντίσταση στην ινσουλίνη συμβάλλει στη στεάτωση, επιταχύνοντας έτσι τη πρόοδο της ίνωσης. Επίσης κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι θεραπευτικά σχήματα που θα συμπεριλαμβάνουν αντιοξειδωτικούς παράγοντες μπορούν να αποβούν ωφέλιμα για τους ασθενείς με ηπατίτιδα C που μολύνονται από όλους τους γονότυπους (με εξαίρεση αυτούς που μολύνονται με τον γονότυπο 3) (Viladi 2008). Ο Glantzounis και οι συνεργάτες βρήκαν πως η

αναστολή της επαγωγίσιμης NO συνθάσης είναι ωφέλιμη για το ήπαρ (Glantzounis 2005). Το NO έχει επικίνδυνες επιπτώσεις στη παρουσία των δραστικών μορφών οξυγόνου, επειδή συμβάλλει στη δημιουργία του υπεροξυνιτρώδους. Το NO εμπλέκεται στη παθοφυσιολογία των ιογενών (χρόνια ηπατίτιδα Β και χρόνια ηπατίτιδα C) και των αυτοάνοσων νοσημάτων (πρωτοπαθής χολική κίρρωση και αυτοάνοση ηπατίτιδα) του ήπατος (García-Monzón 2000, Sanz-Cameno 2002) καθώς επίσης και στην οξεία απόρριψη του μοσχεύματος (Romero 2001). Η αναστολή της έκφρασης της iNOS από τη Ν-ακέτυλο-κυστεΐνη (NAC) μπορεί να αποτελέσει τη βάση για νέες θεραπείες (Majano 2004). Χορήγηση S-αδενοσυλικής-μεθειονίνης (SAMe) σε ασθενείς με αλκοολική κίρρωση είχε ωφέλιμες επιδράσεις (Mato 1999). Οι πιθανοί μηχανισμοί της δράσης της SAMe συμπεριλαμβάνουν: 1) δότης μεθυλοομάδων και συνεισφορά στην επαναφορά του μιτοχονδριακού περιεχομένου της γλουταθειόνης και 2) εξασθένιση της ηπατικής παραγωγής του NO μέσω της επανασύνθεσης του αναστολέα της ενεργοποίησης του NFκB, που είναι ο μεταγραφικός παράγοντας της NO συνθάσης (Majano 2001). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω ευρήματα σε συνδυασμό με τα ευρήματα της παρούσης μελέτης μπορεί να στηριχθεί η άποψη ότι η προσθήκη κατάλληλων αντιοξειδωτικών στα ήδη υπάρχοντα θεραπευτικά σχήματα μπορεί να βελτιώσει τη πρόοδο της φλεγμονής και της ίνωσης καθυστερώντας αρκετά την πρόοδο της ασθένειας. Όμως, η επιλογή του αντιοξειδωτικού παράγοντα πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή γιατί σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη ορισμένες αντιοξειδωτικές ουσίες όπως η ρεσβεταρόλη (RVT) ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό του HCV (Nakamura 2010).

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε πως οι ΔΜΟ/ΔΜΑ συνεισφέρουν στην ηπατική βλάβη που επάγεται από ποικίλες καταστάσεις όπως είναι η κατάχρηση αλκοόλ, η εναπόθεση λίπους στο ήπαρ, ιογενή αίτια και αυτοάνοσες αντιδράσεις του οργανισμού. Επίσης ενίσχυσε τα αποτελέσματα από μελέτες άλλων (Novo 2008, Muriel 2007) και συμπλήρωσε ορισμένα βιβλιογραφικά κενά που αφορούσαν στα αυτοάνοσα νοσήματα και στην ηπατίτιδα Β. Η δημιουργία προϊόντων οξειδωτικής βλάβης ξεκινά από τα αρχικά στάδια των νοσημάτων αλλά η θεραπεία τα μειώνει ως ένα βαθμό. Η ανισσοροπία μεταξύ προφλεγμονώδων/αντιφλεγμονώδων κυτταροκινών και η έκφραση γονιδίων κολλαγόνου που επιδεινώνουν τα ηπατικά νοσήματα είναι καταστάσεις που επάγονται από τις ΔΜΟ/ΔΜΑ (Friedman 2008, Bataller 2003, Parola 2001, Wu

2000). Η ενδογενής αντιοξειδωτική άμυνα φαίνεται να λειτουργεί στους μη κίρρωτικούς ασθενείς όλων των υπό μελέτη νοσημάτων αλλά διαταράσσεται στο έντονο στάδιο της ίνωσης. Η μη επαρκής αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς οδηγεί τμηματικά σε οξειδωτικές βλάβες και μακροχρόνια σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις (ανάπτυξη ίνωσης και κίρρωσης).

VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (ΔΜΟ/ΔΜΑ) εμπλέκονται στην ηπατική βλάβη που επάγεται από αρκετές καταστάσεις όπως είναι η κατάχρηση οινοπνεύματος, η ιογενής ηπατίτιδα και μεταβολικές διαταραχές. Ο σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν να προσδιοριστεί το κατά πόσο το οξειδωτικό στρες είναι ένα χαρακτηριστικό του αρχικού σταδίου των ηπατικών νοσημάτων και να εξεταστεί η επίδραση της θεραπείας, της ηπατικής νέκρωσης και ινογένεσης στα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα και στα ούρα ασθενών με διάφορα χρόνια νοσήματα του ήπατος. Εκτιμήθηκαν τα επίπεδα των ισοπροστανίων, των αλδεϋδών (4-ύδροξυνοεννάλη και μηλονική διαλδεϋδη), των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, της 3-νιτροτυροσίνης, της 8-υδρόξυ-δεοξυγουανοσίνης, της γλουταθειόνης και οι δραστικότητες της μυελοϋπεροξειδάσης, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, της αναγωγάσης της γλουταθειόνης, της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της καταλάσης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 36 ασθενείς με Αυτοάνοση Ηπατίτιδα, 49 ασθενείς με Αυτοάνοσα Χολοστατικά Νοσήματα, 49 ασθενείς με Χρόνια Ηπατίτιδα Β, 47 ασθενείς με Χρόνια Ηπατίτιδα C, 29 ασθενείς με Αλκοολική Ηπατοπάθεια και σε 28 ασθενείς με Μη Αλκοολική Στεατοηπατίτιδα. Τα αποτελέσματα συσχέτισθηκαν με 75 υγιείς εθελοντές παρόμοιας ηλικίας και φύλλου. Είναι η πρώτη φορά στη βιβλιογραφία που μετρώνται τόσο πολλοί δείκτες οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, στη χρόνια Ηπατίτιδα Β και ειδικά στους χρόνιους ανενεργούς φορείς της Ηπατίτιδας Β. Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών βρέθηκε να είναι υψηλότερη στην Αλκοολική Ηπατοπάθεια και χαμηλότερη στη Χρόνια Ηπατίτιδα Β. Το οξειδωτικό στρες είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της Αυτοάνοσης Ηπατίτιδας και των Αυτοάνοσων Χολοστατικών νοσημάτων του ήπατος. Οι χρόνιοι ανενεργοί φορείς της Ηπατίτιδας Β παρουσίαζαν παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η συγκέντρωση της γλουταθειόνης ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε όλες τις ομάδες των ασθενών συγκριτικά με τους μάρτυρες. Επιπλέον, όλα τα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης και οι δραστικότητες των περισσότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων αυξήθηκαν στους ασθενείς με αυξημένους δείκτες ηπατικής βλάβης σε σχέση με τους ασθενείς με φυσιολογικούς δείκτες ηπατικής βλάβης. Όλες οι δραστικότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων μειώθηκαν ενώ τα περισσότερα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης αυξήθηκαν στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους μη κίρρωτικούς. Η θεραπεία μείωσε τους δείκτες οξειδωτικού στρες σε φυσιολογικά επίπεδα μόνο στους ασθενείς με Χρόνια Ηπατίτιδα C. Η θεραπεία των ασθενών με Αυτοάνοση Ηπατίτιδα ήταν πιο αποτελεσματική στο να μειώνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών από ότι η θεραπεία των ασθενών με Αυτοάνοσα Χολοστατικά Νοσήματα. Τέσσερα κύρια ευρήματα προκύπτουν από την παρούσα μελέτη. Πρώτον, η διαταραχή της λειτουργίας της αντιοξειδωτικής άμυνας εμπλέκεται στην εξέλιξη των νοσημάτων σε κίρρωση. Δεύτερον, η παραγωγή ΔΜΟ/ΔΜΑ συμβαίνει από τα αρχικά στάδια των χρόνιων ηπατικών νοσημάτων. Τρίτον, η θεραπεία μειώνει ως ένα βαθμό τα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης και τέταρτον υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ ποικίλων δεικτών οξειδωτικού στρες και της ιστολογικά εκτιμώμενης ηπατικής βλάβης στα αυτοάνοσα και στα ιογενή νοσήματα του ήπατος.

VII.SUMMARY

Reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) are involved in liver damage induced by several conditions such as alcohol abuse, viral hepatitis and metabolic disorders. The aim of our study was to determine whether oxidant stress is a feature of early liver disease and to examine the effect of therapy, hepatic necrosis and fibrogenesis to the levels of oxidative stress markers in blood and urine of patients with various forms of chronic liver diseases. The concentrations of isoprostane, aldehydes such as malondialdehyde and 4-hydroxynonenal, protein carbonyls, 3-nitrotyrosine, 8-hydroxydeoxyguanosine, glutathione and the activities of myeloperoxidase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase and catalase were estimated. Measurements were performed in 49 patients with Autoimmune Cholestatic liver disease, 36 patients with Autoimmune Hepatitis, 49 patients with Chronic Hepatitis B, 47 patients with Chronic Hepatitis C, 29 patients with Alcoholic Liver Disease and 28 patients with Non Alcoholic Steatohepatitis. The results were compared with those from 75 healthy controls matched for age and sex. To our knowledge, it is the first time in the literature that a significant number of many biomarkers of both oxidants and antioxidants were determined in patients with in autoimmune liver diseases, Chronic Hepatitis B patients and especially in chronic inactive HBsAg carriers. Free radical production was found to be the highest in Alcoholic Liver Disease and the lowest in Chronic Hepatitis B. Oxidant stress is a significant feature of Autoimmune Hepatitis and Autoimmune Cholestatic liver disease. Inactive HBsAg carriers demonstrated free radical production. Blood glutathione concentration was significantly lower in all groups of patients compared to controls. Furthermore all the oxidative injury products and the most activities of antioxidant enzymes were increased in all groups of patients with elevated hepatic injury markers compared to patients with normal hepatic injury markers. All the activities of the antioxidants enzymes were reduced whereas the majority of oxidative injury products were increased in cirrhotic patients compared to non cirrhotic. Therapy reduced the markers of oxidative stress in normal levels only in the patients with Chronic Hepatitis C. Treatment for Autoimmune Hepatitis was more effective to ameliorate the production of free radicals than treatment with Autoimmune Cholestatic liver disease. Four major findings have emerged from the present study. Firstly, disturbances in antioxidant enzymes activity seem to be involved in the progress of disease to decompensated liver cirrhosis. Secondly, the generation of ROS/RNS was shown to occur from early stage of all chronic liver diseases. Third, therapy ameliorates the production of free radicals. Fourth, we demonstrated a significant correlation between multiple markers of oxidant stress and histologically assessed liver damage in autoimmune and viral liver diseases.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abd Ellah MR, Niishimori K, Goryo M, Okada K, Yasuda J. Glutathione peroxidase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in bovine blood and liver. *J Vet Med Sci* 2004, 66:1219-21.

Abd Ellah MR, Okada K, Goryo M, Kobayashi S, Oishi A, Yasuda J. Total glutathione and glutathione reductase in bovine erythrocytes and liver biopsy. *J Vet Med Sci* 2008, 70(8):861-4.

Abel S, De Kock M, van Schalkwyk DJ, Swanevelder S, Kew MC, Gelderblom WC. Altered lipid profile, oxidative status and hepatitis B virus interactions in human hepatocellular carcinoma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2009, 81(5-6):391-9.

Aboutwerat A, Pemberton PW, Smith A, Burrows PC, McMahon RF, Jain SK. Oxidant stress is a significant feature of primary biliary cirrhosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003, 1637:142-150.

Acar A, Görenek L, Aydin A, Eyigün CP, Eken A, Sayal A, Pahsa A. Investigation of oxidative stress and antioxidant defense in patients with hepatitis B virus infection and the effect of interferon-alpha plus lamivudine combination therapy on oxidative stress. *Mikrobiyol Bul* 2009, 43(3):411-23.

Acworth IN and Bailey B. Reactive Oxygen Species. In: *The handbook of oxidative metabolism*. Massachusetts: ESA Inc 1997:1-4.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984, 105:121-6.

Akaike T. Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. *Rev Med Virol* 2001, 11:87-101.

Akerboon TP and Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulphide and glutathione mixed disulphides in biological samples. *Meth Enzymology* 1981, 77:373-382.

Akerboom TP, Bilizer MM and Sies H. The relationship of biliary GSSG efflux and intracellular GSSG content in perfused rat liver. *J Biol Chem* 1982, 257:4248-4252.

- Albano E, Tomasi A, Persson JO, Terelius Y, Gorla-Gatti L, Ingelman-Sundberg M et al.** Role of ethanol-inducible cytochrome P-450 (P450IIE1) in catalysing the free radical activation of aliphatic alcohols. *Biochem Pharmacol* 1991, 41:1895-1902.
- Albano E, Clot P, Morimoto M, Tomasi A, Ingelman-Sundberg M, French SW.** Role of cytochrome P4502E1-dependent formation of hydroxyethyl free radical in the development of liver damage in rats intragastrically fed with ethanol. *Hepatology* 1996, 23(1):155-63.
- Albano E.** Free radical mechanisms in immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med* 2002, 32(2):110-4.
- Albano E, Mottaran E, Occhino G, Reale E, Vidali M.** Review article: role of oxidative stress in the progression of non-alcoholic steatosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005, 2:71-3.
- Albano E.** Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc* 2006, 65: 278–290.
- Albano E.** Oxidative mechanisms in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Mol Aspects Med* 2008, 29(1-2):9-16.
- Al-Chalabi T, Boccato S, Portman BC, McFarland IG, Heneghan.** Autoimmune hepatitis (AIH) in the elderly: A systematic retrospective analysis of a large group of consecutive patients with definite AIH followed at a tertiary referral centre. *J Hepatol* 2006, 45:575-83.
- Allen RG. and Tresini M.** Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad Biol Med* 2000, 28:463-499.
- Aleynik SI, Leo MA, Aleynik MK, Lieber CS.** Increased circulating products of lipid peroxidation in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1998, 22:192-196.
- Alpert AJ and Gilbert HF.** Detection of oxidized and reduced glutathione with a recycling postcolumn reaction. *Anal Biochem* 1985, 144:553–562.
- Alter HJ, Sanchez-Pescador R, Urdea MS, Wilber JC, Lagier RJ, Di Bisceglie AM et al.** Evaluation of branched DNA signal amplification for the detection of hepatitis C virus RNA. *J Viral Hepat* 1995, 2:121-32.

- Altomare G, Vendemiale G and Alano O.** Hepatic glutathione content in patients with alcoholic and non alcoholic liver diseases. *Life Sci* 1998, 43:991-998.
- Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL et al.** International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999, 31(5):929-38.
- Amaral JD, Viana RJ, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CM.** Regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J LBile acids Res* 2009.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM.** Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Natl Acad Sci USA* 1993, 90:7915-7922.
- Anderson ME and Meister A.** Dynamic state of glutathione in blood plasma. *J Biol Chem* 1980, 255(20):9530-3.
- Anderson D, Yardley-Jones A, Hambly RJ, Vives-Bauza C, Smykatz-Kloss V, Chua-Anusorn W.** Effects of iron salts and haemosiderin from a thalassaemia patient on oxygen radical damage as measured in the comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen* 2000, 20(1):11-26.
- Andrews PC and Krinsky NI.** A kinetic analysis of the interaction of human myeloperoxidase with hydrogen peroxide chloride ions and protons. *The journal of Biological Chemistry* 1982, 22:13240-13245.
- Angulo P, Keach JC, Butts KP, Lindor KD.** Independent predictors of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999, 30:1356-62.
- Angulo P.** Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002, 346:1221–1231.
- Anzola M.** Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat* 2004, 11:383-393.
- Arnhold J, Furtmüller PG, Obinger C.** Redox properties of myeloperoxidase. *Redox Rep* 2003, 8(4):179-86.
- Arteel GE.** Oxidant and antioxidant in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterologia* 2003, 124:778–790.
- Arthur JR.** The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 2000, 57(13-14):1825-35.

Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, Quinlan GJ, Gutteridge JM. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochem J* 1989, 258(2):617-20.

Asensi M, Sastre J, Pallardo FV et al. A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal Biochem* 1994, 217:323–328.

Aumann KD, Bedorf N, Brigelius-Floche R, Schomburg D, Flohe L. Glutathione peroxidase revisited. Simulation of the catalytic cycle by computer-assisted molecular modelling. *Biomed Environ Sci* 1997, 10:136-155.

Awad JA and Morrow JD. Excretion of F2-isoprostanes in bile: a novel index of hepatic lipid peroxidation. *Hepatology* 1995, 22:962–968.

Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000, 109(1):33-44.

Baccari MC and Bani D. Relaxin and nitric oxide signalling. *Curr Protein Pept Sci* 2008, 9:638-45.

Bailey SM and Cunningham CC. Contribution of mitochondria to oxidative stress associated with alcohol liver disease. *Free Rad Biol Med* 2002, 32:11-16.

Bain C and Inchauspé G. Dendritic cells and hepatitis C virus. *Pathol Biol* 2001, 49:464-5.

Balan V, Dickson ER, Jorgensen RA, Lindor KD. Effect of ursodeoxycholic acid on serum lipids of patients with primary biliary cirrhosis. *Mayo Clin Proc* 1994, 89:392.

Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997, 37:693–704.

Bao Y, Jemth P, Mannervik B, Williamson G. Reduction of thymine hydroperoxide by phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase and glutathione transferase. *FEBS Lett* 1997, 410:210-212.

Baron V and Muriel P. Role of glutathione, lipid peroxidation and antioxidants on acute bile-duct obstruction in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1472:173–180.

Barbaro G, Di Lorenzo G, Ribersani M, Soldini M, Giancaspro G, Bellomo G et al. Serum ferritin and hepatic glutathione concentrations in chronic hepatitis C patients related to the hepatitis C virus genotype. *J Hepatol* 1999, 30:774–782.

Barber T, Borrás E, Torres L, García C, Cabezuelo F, Lloret A et al. Vitamin A deficiency causes oxidative damage to liver mitochondria in rats. *Free Radic Biol Med* 2000, 29:1-7.

Bardella MT, Valenti L, Pagliari C, Peracchi M, Farè M, Fracanzani AL et al. Searching for coeliac disease in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* 2004, 36:333-6.

Baron V and Muriel P. Role of glutathione, lipid peroxidation and antioxidants on acute bile-duct obstruction in the rat. *Biochim. Biophys Acta* 1999, 1472:173–180.

Bassot JM and Nicolas MT. Bioluminescence in scale-worm photosomes: the photoprotein polynoidin is specific for the detection of superoxide radicals. *Histochem Cell Biol* 1995, 104:199-210.

Bastien J and Rochette-Egly C. Nuclear Retinoid Receptors and the Transcription of Retinoid-Target Genes. *Gene* 2004, 328:1-16.

Basu S. Isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation. *Free Rad Res* 2004, 38:105-122.

Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003, 112:1383–1394.

Beckman JS and Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrate the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* 1991, 271:C1424.

Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 1996, 9:836–844.

Begrache K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006, 6:1–28.

Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DM. The antioxidant role of vitamin C. *Adv Free Radic Biol Med* 1986, 2:419-444.

Beppu M, Fukata Y, Kikugawa K. Interaction of malonaldehyde-modified bovine serum albumin and mouse peritoneal macrophages. *Chem Pharm Bull* 1988, 36:4519-26.

Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis*, 3rd edition, VCH Publishers, USA. 1993.

Bergt C, Pennathur S, Fu X, Byun J, O'Brien K, McDonald TO et al. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101(35):13032-7.

Bergtold DS and Simic MG. Hydroxy radical in radiation dosimetry and metabolism: dietary caloric effect. *Prog Clin Biol Res* 1991, 372:21-32.

Berson A, De Beco V, Lettéron P, Robin MA, Moreau C, El Kahwaji J et al. Steatohepatitis-induced drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1998, 114:764-74.

Bertini I and Banci L. Structure and properties of CuZnSOD. *Adv Inorg Biochem* 1998, 45:127-134.

Betten A, Bylund J, Christophe T, Boulay F, Romero A, Hellstrand K et al. A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest* 2001, 108:1221-1228.

Bisby RH and Parker AW. Reaction of ascorbate with α -tocopherolxyl radical in micellar and bilayer membrane systems. *Arch Biochem Biophys* 1995, 317:170-178.

Bocos C, Göttlicher M, Gearing K, Banner C, Enmark E, Teboul M et al. Fatty acid activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995, 53:467-473.

Bogdanos DP, Liaskos C, Pares A, Norman G, Rigopoulou EI, Caballeria L et al. Anti-gp210 antibody mirrors disease severity in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007, 45:1583-4.

Bogdanos DP and Dalekos GN. Enzymes as target antigens of liver-specific autoimmunity: the case of cytochromes P450s. *Curr Med Chem* 2008, 15(22):2285-92.

Bogdanov MB, Beal MF, McCabe DR, Griffin RM, Matson WR. A carbon column-based liquid chromatography electrochemical approach to routine 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

measurements in urine and other biologic matrices: a one-year evaluation of methods. *Free Radic Biol Med* 1999, 107:213-5.

Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993, 74: 597-608.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994, 368:850–853.

Bolukbas C, Bolukbas FF, Horoz M, Aslan M, Celik H, Erel O. Increased oxidative stress associated with the severity of the liver disease in various forms of hepatitis B virus infection. *BMC Infect Dis* 2005, 1(5):95.

Bondy SC. Ethanol toxicity and oxidative stress. *Toxicol Lett* 1992, 63(3):231-41.

Bonnefont-Rousselot D, Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Beucler I, Pounard T. Blood oxidative stress markers are unreliable markers of hepatic steatosis. *Alimentary Phramacology and Therapeutics* 2006, 23:91-98.

Borek C, Ong A, Cleaver JA. DNA damage from ozone and radiation in human epithelial cells. *Toxicol Health* 1998, 4:547-553.

Boveris A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* 1977, 78:67-82.

Bovicelli P. Radical-scavenging polyphenols: new strategies for their synthesis. *J Pharm Pharmacol* 2007, 59(12):1703-10.

Boya P, Pena A, Belouqui O, Larrea E, Conchillo M, Castelruiz Y et al. Antioxidant status and glutathione metabolism in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999, 31:808-814.

Bozeman PM, Learn DB, Thomas EL. Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *Journal of Immunological Methods* 1990, 126:125-133.

Bray PC, Cockle SA, Fielden EM, Roberts PB, Rotilio G and Calabrese L. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem J* 1974,139 :43–48.

Bréchet C. Hepatitis C virus: molecular biology and genetic variability. *Dig Dis Sci* 1996, 41:6S-21S.

Breen AP and Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biol Med* 1995, 18:1033–1077.

Breitner JC. The role of anti-inflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 1996, 47:401-11.

Brigelius-Flohe R, Friedrichs B, Maurer S, Schultz M, Streicher R. Interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation is inhibited by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line. *Biochem J* 2003, 328:199.

Britton RS and Brown KE. Genetic hemochromatosis and Wilson'S disease: Role for oxidant stress? *Hepatology* 1995, 21:1195-1197.

Brolin RE. Gastrointestinal surgery for obesity. *Semin Gastrointest Dis* 1998, 9:163-75.

Brooks S and Faulkner JA. Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms. *Med Sci Sports Exer* 1994, 26:432-439.

Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF. Oxidative stress in Huntington's disease *Brain Pathol* 1999, 9:147-63.

Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993, 300:535-43.

Buettner GR and Jurkiewicz BA. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res* 1996, 145:532-541.

Buffet C. Chronic hepatitis B: current therapy. *Bull Acad Natl Med* 2008, 192:1625-37.

Bugianesi E, Pagotto U, Manini R, Vanni E, Gastaldelli A, de lasio R et al. Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90:3498–3504.

Bureau C, Bernad J, Chaouche N, Orfila C, Béraud M, Gonindard C et al. Non-structural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2001, 276:23077–23083.

Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 1998, 15:246-58.

Cadenas E, Muller A, Brigelius R, Esterbauer H, Seis H. Effects of 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes. *Biochem J* 1983, 214:479–487.

Cadenas E and Packer L. Handbook of Antioxidants. University of Southern California, School of Pharmacy. 2nd ed, 2002.

Camp PG, Coxson HO, Levy RD, Pillai SG, Anderson W, Vestbo J et al. Sex differences in emphysema and airway disease in smokers. *Chest* 2009, 136(6):1480-8.

Carmela L and Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radical Biol Med* 2003, 34:1-10.

Capeillere-Blandin C. Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a twoelectron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADH oxidation. *Biochem J* 1998, 336:395–404.

Cederbaum AI. Microsomal generation of reactive oxygen species and their possible role in alcohol hepatotoxicity. *Alcohol Alcohol Suppl* 1991, 1:291-6.

Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol* 2009, 83(6):519-48.

Cerny A and Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999, 30:595-601.

Cerutti P, Ghosh R, Oya Y, Amstad P. The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1994, 10:123-9.

Chalasani N, Deeg MA, Crabb DW. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004, 99(8):1497-502.

Chan AC. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol* 1993, 71(9):725-31.

Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000, 29:323-33.

Chang TT, Gish RG, de Man R, Gadano A, Sollano J, Chao YC et al. A comparison of entecavir and lamivudine for HbeAgpositive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006, 354:1001–1010.

Chapman JD. Biophysical models of mammalian cell inactivation by radiation I: Meyn RE, Withers HR (eds). *Radiation biology in Cancer Research*. Raven Press, New York, 1980:21-32.

Chen J, Siddiqui A. Hepatitis B virus X protein stimulates the mitochondrial translocation of Raf-1 via oxidative stress. *J Virol* 2007, 81(12):6757-60.

Chitturi S and Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001, 21:27-41.

Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C et al. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *J Hepatology* 2002, 35:373-9.

Choi BM, Pae HO, Kim YM, Chung HT. Nitric oxide-mediated cytoprotection of hepatocytes from glucose deprivation-induced cytotoxicity: involvement of heme oxygenase-1. *Hepatology* 2003, 37: 810-823.

Choi J, Ou JH. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006, 290(5):G847-51.

Chou PT and Khan AU. L-Ascorbic acid quenching of singlet delta molecular oxygen in aqueous media: generalized antioxidant property of vitamin C. *Biochem Biophys Res Commun* 1983, 115: 932-937.

Chow CK (ed). Cellular antioxidant defense mechanisms. Vol I-III. CRC Press, Boca Raton, FL, 1988.

Chow CK. Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1991, 11(2):215-32.

Christodoulou DK, Dalekos GN, Merkouropoulos MH, Kistis KG, Georgitsi G, Zervou E et al. Cryoglobulinemia due to chronic viral hepatitis infections is not a major problem in clinical practice. *Eur J Intern Med* 2001, 12:435-441.

Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSH-Px-GI. *J Biol Chem* 1993, 268:2571-2576.

Chung FL, Chen HJ, Nath RG. Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis* 1996, 17:2105–2111.

Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 2006, 1:S5-10.

Clifford MN. Miscellaneous phenols in foods and beverages-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 2000, 80:1126-1137.

Cline SD, Riggins JN, Tornaletti S, Marnett LJ, Hanawalt PC. Malondialdehyde adducts in DNA arrest transcription by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004, 101:7275-7280.

Clot P, Tabone M, Arico S, Albano E. Monitoring oxidative damage in patients with liver cirrhosis and different daily alcohol intake. *Gut* 1994, 35:1637-1643.

Colonna RJ, Rose RE, Pokornowski K, Baldick CJ, Kleczewski K, Teney DJ. Assessment at three years shows high barrier to resistance that is maintained in entecavir-treated nucleoside naive patients while resistance emergence increases over time in lamivudine refractory patients. *Hepatology* 2006, 44:229A–230A.

Coon MJ. Multiple oxidants and multiple mechanisms in cytochrome P450 catalysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 312:163-8.

Cooper CE. Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1411(2-3):290-309.

- Comporti M, Maellaro E, Del Bello B, Casini AF.** Glutathione depletion: its effects on other antioxidant systems and hepatocellular damage. *Xenobiotica* 1991, 21(8):1067-76.
- Comporti M, Arezzini B, Signorini C, Sgherri C, Monaco B, Gardi C.** F2-isoprostanes stimulate collagen synthesis in activated hepatic stellate cells: a link with liver fibrosis? *Lab Invest* 2005, 85(11):1381-91.
- Comporti M, Signorini C, Arezzini B, Vecchio D, Monaco B, Gardi C.** Isoprostanes and hepatic fibrosis. *Mol Aspects Med* 2008, 29(1-2):43-9.
- Comporti M, Arezzini B, Signorini C, Vecchio D, Gardi C.** Oxidative stress, isoprostanes and hepatic fibrosis. *Histol Histopathol* 2009, 24(7):893-900.
- Cracowski JL, Stanke-Labesque F, Souvignet C, Bessard G.** Isoprostanes: new markers of oxidative stress in human diseases. *Presse Med* 2000, 29(11):604-10.
- Crabb DW.** Ethanol oxidizing enzymes: roles in alcohol metabolism and alcoholic liver disease. *Prog Liver Dis* 1995, 13:151-72.
- Crosswhite P, Sun Z.** Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension. *J Hypertens* 2010, 28(2):201-12.
- Crowther JR.** The ELISA Guidebook. *Methods in Molecular Biology*. The International Atomic Energy Agency, Vienna, Humana Press. 2002, 149.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN.** Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* 2009, 26(8):1001-43.
- Cuzzocrea S, Zingarelli B, Villari D, Caputi AP, Longo G.** Evidence for in vivo peroxynitrite production in human chronic hepatitis. *Life Sci* 1998, 63:25-30.
- Czaja AJ, Pfeifer KD, Decker RH, Vallari AS.** Frequency and significance of antibodies to asialoglycoprotein receptor in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1996, 41:1733-40.
- Czaja AJ and Carpenter HA.** Validation of scoring system for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1996, 41:305-14.

- Czaja AJ, Cassani F, Cataleta M, Valentini P, Bianchi FB.** Antinuclear antibodies and patterns of nuclear immunofluorescence in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1997, 42(8):1688-96.
- Czaja AJ.** Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatology* 1999, 30:394-401.
- Czaja AJ.** Understanding the pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2001A, 96:1224-1231.
- Czaja AJ and Homburger HA.** Autoantibodies in liver disease. *Gastroenterology* 2001B, 120:239-49.
- Czaja AJ.** Autoimmune liver disease and rheumatic manifestations. *Curr Opin Rheumatol* 2007, 19(1):74-80.
- Czaja AJ.** Progress in the diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Minerva Med* 2008, 99(6):549-68.
- Czaja AJ.** Features and consequences of untreated type 1 autoimmune hepatitis. *Liver Int.* 2009, 29(6):816-23.
- Dahm LJ and Jones DP.** Control of cysteine and glutathione (GSH) levels in rat intestine. *Toxicol* 1993, 14:178.
- Dalekos GN, Manoussakis MN, Zervou E, Tsianos EV, Moutsopoulos HM.** Immunologic and viral markers in the circulation of anti-HIV negative heroin addicts. *Eur J Clin Invest* 1993A, 23:219-25.
- Dalekos GN, Manoussakis MN, Goussia AC, Tsianos EV, Moutsopoulos HM.** Soluble interleukin-2 receptors, antineutrophil cytoplasmic antibodies, and other autoantibodies in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1993B, 34(5):658-64.
- Dalekos GN and Tsianos EV.** Anti-neutrophil antibodies in chronic viral hepatitis. *J Hepatol* 1994, 20(4):561.

Dalekos GN, Zervou E, Karabini F, Tsianos EV. Prevalence of viral markers among refugees from southern Albania: increased incidence of infection with hepatitis A, B and D viruses. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995A, 7:553-8.

Dalekos GN, Zervou E, Tsianos EV. IgM antibodies to hepatitis C virus in chronic active hepatitis C in NW Greece. Solution or more questions? *J Hepatol* 1995B, 22(4):509.

Dalekos GN, Zervou E, Merkouropoulos MH, Tsianos EV. Prevalence of hepatitis B and C viruses infection in chronic alcoholics with or without liver disease in Ioannina, Greece: low incidence of HCV infection. *Eur J Epidemiol* 1996, 12:21-5.

Dalekos GN, Christodoulou D, Kistis KG, Zervou EK, Hatzis J, Tsianos EV. A prospective evaluation of dermatological side-effects during alpha-interferon therapy for chronic viral hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998A, 10:933-9.

Dalekos GN, Hatzis J, Tsianos EV. Dermatologic disease during interferon-alpha therapy for chronic viral hepatitis. *Ann Intern Med* 1998B, 128(5):409-10.

Dalekos GN, Wedemeyer H, Obermayer-Straub P, Kayser A, Barut A, Frank H, Manns MP. Epitope mapping of cytochrome P4502D6 autoantigen in patients with chronic hepatitis C during alpha-interferon treatment. *J Hepatol* 1999, 30(3):366-75.

Dalekos GN, Kistis KG, Boumba DS, Voulgari P, Zervou EK, Drosos AA et al. Increased incidence of anti-cardiolipin antibodies in patients with hepatitis C is not associated with aetiopathogenetic link to anti-phospholipid syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000, 12:67-74.

Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C. The antiphospholipid syndrome and infection. *Curr Rheumatol Rep* 2001A, 3:277-85.

Dalekos GN, Zachou K, Makri E et al. Autoimmune hepatitis type 1 (AH-1) in Greece: Clinical, laboratory and demographic characteristics. *Hepatogastroenterology* 2001B, 48:25.

Dalekos GN, Makri E, Loges S, Obermayer-Straub P, Zachou K, Tsikrikas T et al. Increased incidence of anti-LKM autoantibodies in a consecutive cohort of hepatitis C patients from central Greece. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002A, 14:35-42.

Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C, Gatselis N. Autoantibodies and defined target autoantigens in autoimmune hepatitis: an overview. *Eur J Intern Med* 2002B, 13(5):293-303.

Dalekos GN, Obermayer-Straub P, Bartels M, Maeda T, Kayser A, Braun S et al. Cytochrome P450 2A6: a new hepatic autoantigen in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2003, 39:800-6.

Dalekos GN, Bogdanos DP, Neuberger J. Celiac disease-related autoantibodies in end-stage autoimmune liver diseases: what is the message? *Liver Int* 2008, 28(4):426-8.

Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003, 9:169-176.

Dan SK and Vasudevan DM. Alcohol induced oxidative stress. *Life Science* 2007, 81:177-87.

Dancygier H. *Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases.* 2009:949-967.

Dandri M, Burda MR, Bürkle A, Zuckerman DM, Will H, Rogler CE et al. Increase in de novo HBV DNA integrations in response to oxidative DNA damage or inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation. *Hepatology* 2002, 35(1):217-23.

D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita* 2007, 43(4):348-61.

Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J* 1986, 235(3):747-54.

Das D, Pemberton PW, Burrows PC, Gordon C, Smith A, McMahon RF, Warnes TW. Antioxidant properties of colchicine in acute carbon tetrachloride induced rat liver injury and its role in the resolution of established cirrhosis. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1502:351–362.

- Das D, Saha SS, Bishayi B.** Intracellular survival of *Staphylococcus aureus*: correlating production of catalase and superoxide dismutase with levels of inflammatory cytokines. *Inflamm Res* 2008, 57(7):340-9.
- Day RM, Suzuki YJ.** Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione. *Dose Response* 2006, 1;3(3):425-42.
- de Jongh FE, Janssen HL, de Man RA, Hop WC, Schalm SW, van Blankenstein M.** Survival and prognostic indicators in hepatitis B surface antigen-positive cirrhosis of liver. *Gastroenterology* 1992, 103:1630-1635.
- De Groot MJ, Van Helden MA, De Jong YF, Coumans WA, Van der Vusse GJ.** The influence of lactate, pyruvate and glucose as exogenous substrates on free radical defense mechanisms in isolated rat hearts during ischaemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1995, 146:147-155.
- DeLeve L and Kaplowitz N.** Importance and regulation of hepatic GSH, *Sem. Liver Dis* 1990, 10:251–266.
- DeLeve LD.** Glutathione defense in non-parenchymal cells. *Semin Liver Dis* 1998, 18(4):403-13.
- De Maria N, Colantoni A, Fagioli S, Liu G-J, Rogers BK, Farinati F et al.** Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Radic Biol Med* 1996, 21:291–295.
- De Minicis S and Brenner DA.** Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex. *J Gastroenterol Hepatol* 2008, 23 Suppl 1:S98-103.
- Del Masterov RF.** An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand* 1980, 492:153-168.
- Denicola A, Rubbo H, Batthyany C, Freeman BA, Radi R.** Diffusion of nitric oxide in native and oxidized low density lipoprotein. *Free Radical Biol Med* 1999, 27:S74.
- Dey A and Cederbaum AI.** Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 2006, 43:S63–S74.

De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU. The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration-dependent. *Biochim Biophys Acta* 1986, 884:119-123.

Diplock AT. Fat-soluble Vitamins. Heineman, London, 1985.

Di Bisceglie AM. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997, 26:34S-38S.

Dixit K, Moinuddin A, Ali A. Immunological studies on peroxynitrite modified human DNA. *Life Sci* 2005, 77:2626-2642.

Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001, 121:91-100.

Dodd RY. Current viral risks of blood and blood products. *Ann Med* 2000, 32:469-74.

Dong MW. Modern HPLC for Practicing Scientists. John Wiley & Sons, Inc, Canada. 2006.

Dreher D and Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 1996, 32A(1):30-8.

Dreschfeld J. Some Points in the Histology of Cirrhosis of the Liver. *J Anat Physiol* 1880, (Pt 1):68.1-77.

Drynan JW, Clifford MN, Obuchowicz J, Kuhnert N. The chemistry of low molecular weight black tea polyphenols. *Nat Prod Rep* 2010, 27(3):417-62.

Dubinina EE, Konovalov PV, Soliternova IB, Kovrugina SV, Zybina NN, Baklanova MIu. Oxidative modification of blood plasma proteins in elderly people with vascular dementia. *Ukr Biokhim Zh* 2001, 73(1):125-32.

Dukan S, Farewell A, Ballesteros M, Taddei F, Radman N, Nystom T. Protein oxidation in response to increased transcriptional errors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:5746-5749.

Duncan MW. A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amin Acids* 2003, 25: 351-361.

Dweger A, Funk M, Lueken B, Schewitzer A, Lehmann U. Effect of ascorbic acid on neutrophil functions hypoxanthine/xanthine oxidase-generation, oxygen-derived radicals. *Eur*

J Clin Chem Clin Biochem 1992, 30:187-191.

Dwyer TM. Cigarette smoke-induced airway inflammation as sampled by the expired breath condensate. Am J Med Sci 2003, 326(4):174-8.

EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, 26-28, February 1999, Consensus Statement. European Association for the Study of the Liver. J Hepatol 1999, 30(5):956-61.

Elbirt KK, Bonkovsky HL. Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. Proc Assoc Am Physicians 1999, 111:438-447.

Elgouhari HM, Abu-Rajab Tamimi TI, Carey WD. Hepatitis B virus infection: understanding its epidemiology, course, and diagnosis. Cleve Clin J Med 2008, 75:881-9.

Escobar JA, Rubio M. and Lissi EA. SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. Free Radical Biol Med 1996, 20:285–290.

Eisenthal R and Danson MJ. Enzyme assays-a practical approach, IRL Press, UK. 1992.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Rad Biol Med 1991, 11:81-128.

Evans P, Kaur H, Mitchinson MJ, Halliwell B. Do human atherosclerotic lesions contain nitrotyrosine? Biochem Biophys Res Commun 1996, 226:346-351.

Exley C. The pro-oxidant activity of aluminum. Free Rad Biol Med 2004, 36:380-387.

Fam SS and Morrow JD. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-a review. Curr Med Chem 2003, 10(17):1723-40.

Farinati F, Cardin R, De Maria N, Della Libera G, Marafin C, Lecis E et al. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. J Hepatol 1995, 22:449–456.

Farinati F, Cardin R, Degan P, De Maria N, Floyd RA, Van Thiel DH. Oxidative DNA damage in circulating leukocytes occurs as an early event in chronic HCV infection. Free Radic Biol Med 1999, 27:1284–1291.

Fattovich G, Giustina G, Schalm SW, Hadziyannis S, Sanchez-Tapias J, Almasio P et al.

Occurrence of hepatocellular carcinoma and decompensation in western European patients with cirrhosis type B. *Hepatology* 1995, 21:77-82.

Fattovich G, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW, Christensen E. Effect of hepatitis B and C virus infections on the natural history of compensated cirrhosis: a cohort of 297 patients. *Am J Gastroenterology* 2002, 97:2886-95.

Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and Fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003, 125:437-443.

Fernandez-Checa C and Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005, 204:263-273.

Fernández-Irigoyen J, Santamaría E, Sesma L, Muñoz J, Ignacio Riezu J, Caballería J. Oxidation of specific methionine and tryptophan residues of apolipoprotein A-linhepatocarcinogenesis. *Proteomics* 2005, 18(5):4964-4972.

Fernandez-Panchon MS, Villano D, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2008, 48(7):649-71.

Fernando MR, Nanni H, Yoshitake S, Nagata-Kuno K, Miakami S. Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cells. *Eur J Biochem* 1992, 209:917-923.

Fielding RA and Meydani M. Exercise, free radical generation, and aging. *Aging (Milano)*, 1997, 2:12-8.

Finkel T and Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000, 408:239-247.

Fiuza C, Salcedo M, Clemente G and Tellado JM. In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. *J Infect Dis* 2000, 182:526-533.

Flohé L. Glutathione peroxidase: fact and fiction. *Ciba Found Symp* 1978, 65:95-122.

- Floyd RA.** The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990, 11:1447-1450.
- Fonseca JC.** Hepatitis D. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002, 35:181-90.
- Foote CS (ed).** Active oxygen chemistry. Blackie, London, 1995.
- Forman HJ, Maiorino M, Ursini F.** Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 2010, 49(5):835-42.
- Forni LG and Willson RL.** Oxygenation of polychloroaromatic hydrocarbons by superoxide in aprotic media. *J Am Chem Soc* 1986, 109:8081.
- Foti MC.** Antioxidant properties of phenols. *J Pharm Pharmacol* 2007, 59(12):1673-85.
- Fourel I, Culen JM, Saputeli J.** Evidence that hepatocyte turnover is required for rapid clearance of duck hepatitis B virus during antiviral therapy of chronically infected ducks. *J Virol* 1994, 68:8321–8330.
- Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN.** Oxidative damage to DNA during aging: 8-OHdG in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci* 1990, 87:4533-4537.
- Frankel EN.** Recent advances in lipid oxidation. *J Sci Food Agric* 1991, 54:495–511.
- Fridovich I.** Superoxide radical and superoxide dismutase. *An Rev Biochem* 1995, 64:97-104.
- Friedman SL.** Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008, 134:1655-1669.
- Fu HB, Hu YJ, Bernstein ER.** Generation and detection of alkyl peroxy radicals in a supersonic jet expansion. *J Chem Phys* 2006, 125(1):014310.
- Fujita N, Sugimoto R, Ma N, Tanaka H, Iwasa M, Kobayashi Y et al.** Comparison of hepatic oxidative DNA damage in patients with chronic hepatitis B and C. *J Viral Hepat* 2008, 15(7):498-507.
- Fulbert JC and Cals MJ.** Free radicals in clinical biology. Origin, pathogenic effect and defense mechanisms. *Pathol Biol (Paris)*. 1992, 40(1):66-77.

Gabeta S, Norman GL, Gatselis N, Liaskos C, Papamichalis PA, Garagounis A et al. IgA anti-b2GPI antibodies in patients with autoimmune liver diseases. *J Clin Immunol* 2008, 28(5):501-11.

Gajewski E, Rao G, Nackerdien Z, Dizdaroglu M. Modification of DNA bases in mammalian chromatin by radiation-generated free radicals. *Biochemistry* 1990, 29:7876–7882.

Ganz T and Nemeth E. Iron Imports IV. Hepcidin and the regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol* 2006, 290:G199–G203.

Gao Y. The multiple actions of NO. *Pflugers Arch* 2010, 459(6):829-39.

García-Closas R, Berenguer A, José Tormo M, José Sánchez M, Quirós JR, Navarro C et al. Dietary sources of vitamin C, vitamin E and specific carotenoids in Spain. *Br J Nutr* 2004, 91(6):1005-11.

Garcia-Monzon C, Majano PL, Zubia I, Sanz P, Apolinario A, Moreno-Otero R. Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with histological severity of liver disease. *J Hepatol* 2000, 32:331–338.

Gardi C, Arezzini B, Monaco B, De Montis MG, Vecchio D, Comporti M. F2-isoprostane receptors on hepatic stellate cells. *Lab Invest* 2008, 88(2):124-31.

Gardne PR. Aconitase: a sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol* 2002, 349:9-23.

Gastaldelli A, Miyazaki Y, Mahankali A, Berria R, Pettiti M, Buzzigoli E et al. The effect of rosiglitazone on the liver: decreased gluconeogenesis in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91:806–812.

Gatselis NK, Georgiadou SP, Tassopoulos N, Zachou K, Liaskos C, Hatzakis A, Dalekos GN. Impact of parietal cell autoantibodies and non-organ-specific autoantibodies on the treatment outcome of patients with hepatitis C virus infection: a pilot study. *World J Gastroenterol* 2005, 11:482-7.

- Gatselis NK, Georgiadou SP, Koukoulis GK, Tassopoulos N, Zachou K, Liaskos C et al.** Clinical significance of organ- and non-organ-specific autoantibodies on the response to anti-viral treatment of patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2006, 24(11-12):1563-73.
- Gatselis NK, Tepetes K, Loukopoulos A, Vasiou K, Zafiriou A, Gioti C, Dalekos GN.** Hepatitis B virus and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Invest* 2007A, 25:55-8.
- Gatselis NK, Rigopoulou E, Stefos A, Kardasi M, Dalekos GN.** Risk factors associated with HCV infection in semi-rural areas of central Greece. *Eur J Intern Med* 2007B, 18:48-55.
- Gatselis NK, Stefos A, Gioti C, Rigopoulou EI, Dalekos GN.** Primary biliary cirrhosis and Henoch-Schonlein purpura: report of two cases and review of the literature. *Liver Int* 2007Γ, 27(2):280-3.
- Gershman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO.** Oxygen Poisoning and x-irradiation: A mechanism in common. *Science* 1954, 119:623-626.
- Gerster H.** High-dose vitamin C: a risk for persons with high iron stores? *Int J Vitam Nutr Res* 1999, 69(2):67-82.
- Girotti AW, Thomas JP, Jordan JE.** Lipid photooxidation in erythrocyte ghosts: sensitization of the membranes toward ascorbate- and superoxide-induced peroxidation and lysis. *Arch Biochem Biophys* 1985, 236(1):238-51.
- Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R.** Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009, 46(5-6):241-81.
- Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM.** The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. *Liver Transpl* 2005, 11:1031-1047.
- Goldberg DM and Spooner RJ.** Assay of glutathione reductase. Bergmeyer HV eds. *Methods of enzymatic analysis* 3rd ed. 1983:258-265.

Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-KB. its role in health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(17):9599-604.

Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res* 2005, 569(1-2):101-10.

Gordon SC, Elloway RS, Long JC, Dmuchowski CF. The pathology of hepatitis C as a function of mode of transmission: blood transfusion vs. intravenous drug use. *Hepatology* 1993, 18:1338-43.

Góth L, Rass P, Páy A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol Diagn* 2004, 8(3):141-9.

Goto T, Haruma K, Kitadai Y, Ito M, Yoshihara M, Sumii K et al. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in gastric mucosa of gastric cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999, 5:1411-1415.

Goulis I and Dalekos GN. Entecavir monotherapy for lamivudine-refractory chronic hepatitis B. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008, 6:855-9.

Gow AJ, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H. Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett* 1996, 385:63-66.

Grant CM. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol* 2001, 39:533-41.

Grieco A, Miele L, Pignatoro G, Pompili M, Rapaccini GL, Gasbarrini G. Is coeliac disease a confounding factor in the diagnosis of NASH? *Gut* 2001, 49:596.

Groeger G, Quiney C, Cotter TG. Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxid Redox Signal* 2009, 11(11):2655-71.

Grossi S, Sumberaz A, Gosmar M, Mattioli F, Testino G, Martelli A. DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with cirrhosis related to alcohol abuse or to hepatitis B and C viruses. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008, 1:22-5.

- Grzelak A, Sosynski M, Bartosz G.** Inactivation of antioxidant enzymes by peroxynitrate. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2000, 60(4): 253-258.
- Gruber J, Schaffer S, Halliwell B.** The mitochondrial free radical theory of ageing--where do we stand? *Front Biosci* 2008, 13:6554-79.
- Grune T, Reinheckel T, Joshi M, Davies KJA.** Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress-role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J Biol Chem* 1995, 270:2344-51.
- Grune T, Reinheckel T, Davies KJA.** Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J Biol Chem* 1996, 271:15504-9.
- Grune T.** Oxidative stress, aging and the proteasomal system. *Biogerontology* 2000, 1:31-40.
- Guéguen P, Dalekos G, Nousbaum JB et al.** Double reactivity against actin and alpha-actinin defines a severe form of autoimmune hepatitis type 1. *J Clin Immunol* 2006, 26(6):495-505.
- Guengerich FP.** Cytochromes p450, drugs, and diseases. *Mol Intervent* 2003, 3:194–204.
- Gundogan F, Elwood G, Mark P, Feijoo A, Longato L, Tong M et al.** Ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in rat placenta: relevance to pregnancy loss. *Alcohol Clin Exp Res* 2010, 34(3):415-23.
- Gupta BL and Baquer NZ.** Hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and antioxidant enzymes in diabetic reticulocytes: effects of insulin and vanadate. *Biochem Mol Biol Int* 1998, 46:1145-1152.
- Gutteridge JMC.** Caeruloplasmin: plasma protein, enzyme and antioxidant. *Ann Clin Biochem* 1978, 15:113-120.
- Gutteridge JMC and Stocks J.** Caeruloplasmin:physiological and pathological perspectives. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1981, 14: 257-268.
- Gutteridge JMC.** Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation. *Free Radic Res Commun* 1986A, 1:173–184.

Gutteridge JMC. Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin. In: A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochim Biophys Acta* 1986B, 869:119–127.

Gutteridge JM and Halliwell B. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol* 1989, 2(2):195-256.

Gutteridge JMC and Halliwell B. Antioxidants and nutrition, health and disease. Oxford University Press 1996.

Guyton A and Hall J. Φυσιολογία του ανθρώπου και μηχανισμοί των νόσων. Εκδόσεις Παρισιάνου Μ, 2000.

Hall HJ (ed). DNA strand breaks and chromosomal aberrations. In: *Radiobiology for the Radiologist*. 4th edn. J B Lippincott Company, Philadelphia, 1994:15-27.

Halliwell B. Generation of the superoxide radical during the peroxidatic oxidation of NADH by catalase at acid pH values. *FEBS Lett* 1977, 80(2):291-3.

Halliwell B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates: is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems? *FEBS Lett* 1978, 92(2):321-6.

Halliwell B. Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: the key role of superoxide dismutase. *Cell Biol Int Rep* 1978, 2(2):113-28.

Halliwell B. The biological effects of the superoxide radical and its products. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1981, 17 Suppl:21-9.

Halliwell B. Production of superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals by phagocytic cells: a cause of chronic inflammatory disease? *Cell Biol Int Rep* 1982, 6(6):529-42.

Halliwell B and Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984, 219(1):1-14.

Halliwell B and Gutteridge JMC. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press, 1985:20-64.

- Halliwell B.** Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1987, 1:358-364.
- Halliwell B, Hoult JR, Blake DR.** Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs. *FASEB J* 1988A, 2(13):2867-73.
- Halliwell B.** Albumin: an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol* 1988B, 37:569-571.
- Halliwell B and Gutteridge JMC.** *Free Radical in Biology and Medicine*. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford England, 1989.
- Halliwell B.** How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun* 1990, 9:1-32.
- Halliwell B and Gutteridge JM.** The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990, 280(1):1-8.
- Halliwell JM, Gutteridge Cross CE.** Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992, 119:598–620Q.
- Halliwell B.** Cigarette smoking and health: a radical view. *J R Soc Health* 1993, 113(2):91-6.
- Halliwell B and Kaur H.** Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* 1994, 350:9-12.
- Halliwell B and Gutteridge JMC.** The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biol Med* 1995, 18:125–126.
- Halliwell B.** Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996A, 16:33-50.
- Halliwell B.** Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res* 1996B, 25(5):439-54.
- Halliwell B and Gutteridge JMC.** Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rded. Oxford University Press, Oxford, 1999:246-350.
- Halliwell B, Clement MV, Long LH.** Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 2000, 486(1):10-3.

Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001,18:685–716.

Halliwell B and Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004, 142:231–255.

Halliwell B and Poulsen HE. Cigarette smoke and oxidative stress. Springer Verlag. Basle, Switzerland 2006.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007, 35(Pt 5):1147-50.

Hamilton DJ. Development of Fibrous Tissue from the Hepatic Parenchyma in Cirrhosis of the Liver. *J Anat Physiol* 1880, (Pt 2):185-194.

Hammer A, Ferro M, Tillian HM, Tatzber F, Zollner H, Schauenstein E, Schaur RJ. Effect of oxidative stress by iron on 4-hydroxynonenal formation and proliferative activity in hepatomas of different degrees of differentiation. *Free Radic Biol Med* 1997, 23(1):26-33.

Harada, K, Iwata, M, Kono, N et al. Distribution of apoptotic cells and expression of apoptosis-related proteins along the intrahepatic biliary tree in normal and non-biliary diseased liver. *Histopathology* 2000, 37:347-354.

Harada K and Nakanuma Y. Molecular mechanisms of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Med Mol Morphol* 2006, 39(2):55-61.

Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Geront* 1956, 2:298-300.

Harris DA and Bashford CL. Spectroscopy and spectrofluorimetry-a practical approach. IRL. Eds.Press.1992.

Harrison PM and Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage, function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1996, 1275:161-168.

Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, Timchenko NA, Kulaksiz H, Clemens D et al. Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem* 2006, 281:22974–22992.

Hartley DP, Ruth JA, Petersen DR. The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase. *Arch Biochem Biophys* 1995, 316(1):197-205.

Hatano E, Bennett BL, Manning AM, Qian T, Lemasters JJ, Brenner DA. NF- κ B stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF- α and Fas-mediated apoptosis. *Gastroenterology* 2001, 120:1251-1262.

Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* 2003, 25(3-4):259-74.

Hayes D and McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 1999, 31:273–300.

Hazen SL and Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalysed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 1997, 99:2075–2081.

Hehner SP, Breitzkreutz R, Shubinsky G, Unsoeld H, Schulze-Osthoff K, Schmitz ML. Enhancement of T-cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *J Immunol* 2000, 165:4319-4328.

Hei TK and Filipic M. Role of oxidative damage in the genotoxicity of Arsenic. *Free Rad Biol Med* 2004, 37:574-581.

Heistad DD, Wakisaka Y, Miller J, Chu Y, Pena-Silva R. Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 2009, 73(2):201-7.

Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC, Ames BN. DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95:288-93.

- Helmersson J and Basu S.** F2-Isoprostane excretion rate and diurnal variation in human urine. *Prostagl Leukot Essent Fat Acids* 1999, 61: 203-205.
- Hengartner MO.** The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000, 407:770-776.
- Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL et al.** Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 2008, 48:169-76.
- Hensley K and Maitt ML.** Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J Neurosci* 1998, 18:8126-8132.
- Higuchi H, Kurose I, Kato S, Miura S, Ishii H.** Ethanol-induced apoptosis and oxidative stress in hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 1996, 20:340A-346A.
- Hines IN and Wheeler MD.** Recent advances in alcoholic liver disease III. Role of the innate immune response in alcoholic hepatitis. *Am J Physiol* 2004, 287:G310–G314.
- Hino K, Sainokami S, Shimoda K, Niwa H, Iino S.** Clinical course of acute hepatitis C and changes in HCV markers. *Dig Dis Sci* 1994, 39:19-27.
- Hino K.** Diagnosis of hepatitis C. *Intervirolgy* 1994, 37:77-86.
- Hodgson EK and Fridovich I.** The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry* 1975, 14(24):5299–5303.
- Hoek JB, Cahill A, Pastorino JC.** Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterologia* 2002, 122:2049–2063.
- Hoek JB and Pastorino JG.** Cellular signalling mechanisms in alcoholic liver damage. *Semin Liver Dis* 2004, 24:257–272.
- Hogg N.** The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2002, 42:585–600.
- Hollander J, Bejma J, Ookawara T, Ohno H, Ji LL.** Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age. *Mech Ageing Dev* 2000, 116:33-45.
- Holme D and Peck H.** *Analytical Biochemistry*. 3rd edition. Prentice Hall. 1998.

Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997, 26:15S-20S.

Hoofnagle JH. Reactivation of hepatitis B. *Hepatology* 2009, 49:S156-65.

Hsu KL, Ko SF, Cheng YF, Huang CC. Spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma during pregnancy. *Obstet Gynecol* 2001, 98:913-6.

Hubscher SG, Elias E, Buckels JA, Mayer AD, McMaster P, Neuberger JM. Primary biliary cirrhosis. Histological evidence of disease recurrence after liver transplantation. *J Hepatol* 1993, 18:173-184.

Hyun JW, Jung YC, Kim HS, Choi EY, Kim JE, Yoon BH et al. 8-OHdG causes death of human leukemia cells deficient in 8-oxoguanine glycosylase 1 activity by inducing apoptosis. *Mol Cancer Res* 2003, 1:290-299.

Invernizzi P and Gershwin ME. The genetic basis of primary biliary cirrhosis: premises, not promises. *Gastroenterology* 2008, 135:1044–1047.

Irshad M, Chaudhuri, Joshi YK. Superoxide dismutase and total anti-oxidant levels in various forms of liver diseases. *Hepatol Res* 2002, 23:178–184.

Issemann I and Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990, 347:645–650.

Ishii H, Kurose I, Kato S. Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *J Gastroenterol Hepatol* 1997, 12(9-10):S272-82.

Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992, 298:431-437.

Ismail NA, Okasha SH, Dhawan A, Abdel-Rahman AO, Shaker OG, Sadik NA. Antioxidant enzyme activities in hepatic tissue from children with chronic cholestatic liver disease. *Saudi J Gastroenterol* 2010, 16(2):90-4.

Ito A. Electron track simulation for microdosimetry. In: Jenkins TM, Melson WR, Rindi A (eds). *Monte Carlo Transport of Electrons and Photons*. Plenum Publishers New York. 1988:361-382.

- Jackson MJ and O'Farrell S.** Free radicals and muscle damage. *Br Med Bull* 1993, 49:630-641.
- Jaeckel E, Cornberg M, Wedemeyer H, Santantonio T, Mayer J, Zankel M et al.** Treatment of Acute Hepatitis C with Interferon Alfa-2b. *N Engl J Med* 2001, 345:1452-1457.
- Jain SK, Pemberton PW, Smith A, McMahon RF, Burrows PC, Aboutwerat A, Warnes TW.** Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. *J Hepatol* 2002, 36:805–811.
- Jakus V and Lopuchova M.** Role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in liver diseases. *Bratisl Lek Listy* 1999, 100:548–559.
- Jalil AM and Ismail A.** Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules* 2008, 13(9):2190-219.
- Johnstone AP and Thorpe R.** *Immunochemistry in practice*, 3rd edition, Blackwell Science, UK, 1987. Jones BE and Czaja MJ. Mechanisms of hepatic toxicity III. Intracellular signaling in response to toxic liver injury. *Am J Physiol* 1998A, 275: G874-8.
- Jones DP, Carlson JL, Samiec PS, Sternberg P Jr, Mody VC Jr, Reed RL, Brown LA.** Glutathione measurement in human plasma: evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC. *Clin Chim Acta* 1998B, 275:175–184.
- Jones DE.** Pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Gut* 2007, 56:1615–1624.
- Jovanovic SV and Simic MG.** Antioxidants in nutrition. *Ann N Y Acad Sci.* 2000, 899:326-34.
- Kadiska MB, Gladen BC, Baird DD, Graham LB, Parker CE, Ames BN et al.** Biomarkers of oxidative stress study II. Are oxidation products of lipids, proteins and DNA markers of CCL4 poisoning? *Free Radic Biol Med* 2005, 38:698-710.
- Kadokawa Y, Ohba K, Omagari K, Akazawa S, Hayashida K, Ohnita K et al.** Intracellular balance of oxidative stress and cytoprotective molecules in damaged interlobular bile ducts in autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis: In situ detection of 8-hydroxydeoxyguanosine and glutathione-S-transferase. *Hepatol Res* 2007, 37(8):620-7.

Kageyama F, Kobayashi Y, Kawasaki T, Toyokuni S, Uchida K, Nakamura H. Successful interferon therapy reverses enhanced hepatic iron accumulation and lipid peroxidation in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2000, 95:1041–1050.

Kakhlon O and Cabantchik ZI. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med* 2002, 33:1037–1046.

Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000, 118:554-9.

Kao JH. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2008, 2(4):553-62.

Kaplan MM, Elta GH, Furie B, Sadowski JA and Russell RM. Fat-soluble vitamin nutriture in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1988, 95:787–792.

Kaplan MM and Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005, 353:1261–1273.

Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M. The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985, 25:715–744.

Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury. *J Hepatol* 2000, 32:39-47.

Kasai H. Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free Rad Biol Med* 2002, 33:450-456.

Kashiba-Iwatsuki M, Yamaguchi M, Inoue M. Role of ascorbic acid in the metabolism of S-nitroso-glutathione. *FEBS Lett* 1996, 389:149-152.

Kasprzak KS. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Rad Biol Med* 2002, 32:958.

Kato N. Molecular Virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001A, 55:133-159.

Kato J, Kobune M, Nakamura T, Kuroiwa G, Takada K, Takimoto R et al. Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in chronic hepatitis C patients by phlebotomy and low iron diet. *Cancer Res* 2001B, 61:8697–8702.

Kawamura K, Kobayashi Y, Kageyama F, Kawasaki T, Nagasawa M, Toyokuni S et al. et al. Enhanced hepatic lipid peroxidation in patients with primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2000, 95:3596–3601.

- Kazuhiko K and Hideyuki M.** Oxidative stress and hepatitis C viral infection. *Hepatology Research* 2006, 34:65-73.
- Keam SJ.** Telbivudine. *Drugs* 2007, 67:1917–1929.
- Kelekis NL, Makri E, Vassiou A, Patsiaoura K, Spiridakis M, Dalekos GN.** Confluent hepatic fibrosis as the presenting imaging sign in nonadvanced alcoholic cirrhosis. *Clin Imaging* 2004, 28:124-7.
- Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos DP, Muratori L et al.** Cytochrome P450ZD6 (193-212): A new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol* 2003, 170:1481-9.
- King A and Young G.** Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J Am Diet Assoc* 1999, 99(2):213-8.
- Kirkman HN, Galliano S, Gaetani GF.** The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem* 1987, 262:660-666.
- Kirsch M, Korth HG, Sustmann R, de Groot H.** The pathobiochemistry of nitrogen dioxide. *Biol Chem* 2002, 383(3-4):389-99.
- Khan F, Siddiqui AA and Ali R.** Measurement and significance of 3-nitrotyrosine in systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2006, 64:507–514.
- Khan F and Ali R.** Antibodies against nitric oxide damaged poly L-tyrosine and 3-nitrotyrosine levels in systemic lupus erythematosus. *J Biochem Mol Biol* 2006, 39:189-196.
- Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M.** Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2009, 3(1):73-80.
- Klassen, Tuma LW, Sorel MF.** Immune mechanisms of alcohol-induced liver disease. *Hepatol* 1995, 22:355-357.
- Klebanoff SJ.** Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999, 111:383-9.
- Knight JA.** Free Radicals, Antioxidants, Aging, and Disease. AACC Press, Washington,

DC.1999.

Ko WS, Guo CH, Yeh MS, Lin LY, Hsu GS, Chen PC et al. Blood micronutrient, oxidative stress, and viral load in patients with chronic hepatitis C. *World Journal of Gastroenterology* 2005, 11:4697–4702.

Kondo S, Toyokuni S, Tsuruyama T, Ozeki M, Tachibana T, Echizenya M et al. Peroxynitrate-mediated stress is associated with proliferation of human metastatic colorectal carcinoma in the liver. *Canc Lett* 2002, 179:87-93.

Kono H, Arteel GE, Rusyn I, Sies H, Thurman RG. Ebselen prevents early alcohol-induced liver disease. *Free Radic Biol Med* 2001, 30:403-411.

Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005, 4:471–479

Kosugi H, Kato T, Kikugawa K. Formation of yellow, orange and red pigments in the reaction of alk-2-enals with 2-thiobarbituric acid. *Anal Biochem* 1987, 165:456–464.

Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2009, 47(4):333-43.

Kozhemiakin LA, Bulavin DV, Udintsev AV, Smirnov VV. The subcellular distribution of the glutathione system enzymes in the brain tissue of the rat. *Tsit* 1993, 35:58-63.

Kromidas S. HPLC Made to measure. A practical handbook for optimization. 2000:3-48.

Kurien BT and Scofield RH. In vitro modification of solid phase multiple antigenic peptides/autoantigens with 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) provide ideal substrates for detection of anti-HNE antibodies and peptide antioxidants. *J Immunol Methods* 2005, 303:66–75.

Kurien BT and Scofield RH. Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens, *Autoimmun Rev* 2008, 7:567–573.

Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)H⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* 2002, 368:545-553.

Kutnink MA, Hawkes WC, Schaus EE, Omaye ST. An internal standard method for the unattended high-performance liquid chromatographic analysis of ascorbic acid in blood components. *Anal Biochem* 1987, 166:424–430.

Kuwabara M, Takahashi K, Inanami O. Induction of apoptosis through the activation of SAPK/JNK followed by the expression of death receptor Fas in X-irradiated cells. *J Radiat Res* 2003, 44:203-209.

Landis-Piwowar KR, Dou QP. Polyphenols: biological activities, molecular targets, and the effect of methylation. *Curr Mol Pharmacol* 2008, 1(3):233-43.

Langley DR, Walsh AW, Baldick CJ, Eggers BJ, Rose RE, Levine SM et al. Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *J Virol* 2007, 81:3992–4001.

Larosche I, Lettéron P, Berson A, Fromenty B, Huang TT, Moreau R et al. Hepatic mitochondrial DNA depletion after an alcohol binge in mice: probable role of peroxynitrite and modulation by manganese superoxide dismutase. *J Pharmacol Exp Ther* 2010, 332(3):886-97.

Laroux FS, Lefer DJ, Kawachi S, Scalia R, Cockrell AS, Gray L et al. Role of nitric oxide in the regulation of acute and chronic inflammation. *Antioxid Redox Signal* 2000, 2:391–396.

Larrea E, Beloqui O, Munos-Navas MA, Civeira MP, Prieto J. Superoxide dismutase in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Free Radic Biol Med* 1998, 24:1235–1241.

Lass A, Forster MJ, Sohal RS. Effects of coenzyme Q10 and a-tocopherol administration on their tissue levels in the mouse: elevation of mitochondrial a-tocopherol by coenzyme Q10. *Free Radic Biol Med* 1999, 26:1375–1382.

Lau DT, Kleiner DE, Ghany MG, Park Y, Schmid P, Hoofnagle JH. 10-Year follow-up after interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998, 28:1121-7.

Lau D and Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther* 2006, 111(1):16-26.

Lauterburg BH, Adams JD and Mitchell JR. Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology* 1984, 4:586–590.

Lavanchy D. Chronic viral hepatitis as a public health issue in the world. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008, 22:991-1008.

Lawler JM, Powers SK, Visser T, Van Dijk H, Kordus MJ, Ji LL. Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: effects of fiber type and age. *Am J Physiol* 1993, 265:R1344- R1350.

Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N et al. Neurodegeneration, myocardial injury and perinatal death in mitochondrial SOD-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:9782-9788.

Lee YM and Kaplan MM. Primary sclerosing cholangitis. *N Engl J Med* 1995A, 332:924-933.

Lee KS, Buck M, Hougum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF- α and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest* 1995B, 96:2461-2468.

Leeuwenburgh C, Fiebig R, Chandwaney R, Ji LL. Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol* 1994, 267:R439-R445.

Lenzi M, Manotti P, Muratorr L et al. Liver cytosolic 1 antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Gut* 1995, 36:749-54.

Letteron P, Duchatelle V, Berson A, Fromenty B, Degott C, Benhaumou JP et al. Increased ethane exhalation an in vivo index of lipid peroxidation, in alcohol-abusers. *Gut* 1993, 34:409-414.

Levent G, Ali A, Ahmet A. Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis C patients before and after pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin therapy. *J Transl Med* 2006, 4:25-30.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990, 186: 464-78.

Levine RL, Williams J, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994, 233:346-57.

- Li CQ and Wogan GN.** Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett* 2005, 226:1-15.
- Li J, Billiar TR.** Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol* 1999, 276(5 Pt 1):G1069-73.
- Liaskos C, Rigopoulou E, Zachou K et al.** Prevalence and clinical significance of anticardiolipin antibodies in patients with type 1 autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2005, 24:251-60.
- Liaskos C, Bogdanos DP, Rigopoulou EI, Dalekos GN.** Development of antimitochondrial antibodies in patients with autoimmune hepatitis: art of facts or an artifact? *J Gastroenterol Hepatol* 2007, 22(3):454-5.
- Lim SG, Ng TM, Kung N, Krastev Z, Volfova M, Husa P et al.** A double-blind placebo-controlled study of emtricitabine in chronic hepatitis B. *Arch Intern Med* 2006, 166:49–56.
- Limaye PV, Raghuram N, Sivakami S.** Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2003, 243(1-2):147-52.
- Lin HS, Jenner AM, Ong CN, Huang SH, Whiteman M and Halliwell B.** A high-throughput and sensitive methodology for the quantification of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: measurement with gas chromatography-mass spectrometry after single solid-phase extraction. *Biochem J* 2004, 380:541–548.
- Lindor KD, Dickson ER, Baldus WP, Jorgensen RA, Ludwig J, Murtaugh PA et al.** Ursodeoxycholic acid in the treatment of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1994, 106:1284.
- Lindor KD.** In: J. Neuberger, Editor, *Primary Biliary Cirrhosis*, West End Studios, UK, 1999:123-127.
- Liochev SI and Fridovich I.** The roles of superoxide and hydroxy radical, and secondarily derived radicals in oxidation reactions catalyzed by vanadium salts. *Arch Biochem Biophys* 1991, 291:379-382.

Liou I and Kowdley KV. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006, 40:S11-6.

Lippman RD. Free radical-induced lipoperoxidation and aging. In: Miquel J, Quintanilha AT, Weber H (eds) *Handbook of free radicals and antioxidant in biomedicine*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1989:187-197.

Livrea MA, Tesoriere L, Pintaudi AM, Calabrese A, Maggio A, Freisleben HJ et al. Oxidative stress and antioxidants status in beta-thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. *Blood* 1996, 88: 3608-3614.

Ljubuncic P, Fuhrman B, Oiknine J, Aviram M and Bomzon A. Effect of deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on lipid peroxidation in cultured macrophages. *Gut* 1996, 39:475–478.

Ljubuncic P, Tanne Z and Bomzon A. Evidence of a systemic phenomenon for oxidative stress in cholestatic liver disease *Gut* 2000, 47:710–716.

Locarnini S. Hepatitis B viral resistance: Mechanisms and diagnosis. *J Hepatol* 2003, 39:S124–S132.

Loehr TM (ed). Iron carriers and iron protein. VCH Publ, New York, 1989.

Loginov AS, Matiushin BN, Tkachev VD. Enzyme system for dismutation of active forms of oxygen in the liver during chronic impairment of hepatobiliary system. *Vapor Med Khim* 1991, 37:31–33.

Lonardo A. Fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis. Where do we stand and where are we going? *Dig Dis* 1999, 17:80-9.

Los M, Droge W, Stricker K, Baeurle PA, Schulze-Osthoff K. Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *Eur J Immun* 1995, 25:159-165.

Lu SC, Garcia-Ruiz C, Kuhlenkamp J, Ookhtens M, Salas-Prato M and Kaplowitz N. Hormonal regulation of glutathione efflux. *J Biol Chem* 1990, 265:16088–16095.

Lu S and Li L. Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *J Integr Plant Biol* 2008, 50(7):778-85.

- Lu SC.** Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 2009, 30(1-2):42-59.
- Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR.** Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med* 2009 360:2758-69.
- Ludwig J, Viggiano T, McGill D, Ott B.** Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980, 55:434-438.
- Lushchak VI.** Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms. *Biochemistry (Moscow)* 2007, 72(8):809-827.
- Machado MV, Ravasco P, Jesus L, Marques-Vidal P, Oliveira CR, Proença T et al.** Blood oxidative stress markers in non-alcoholic steatohepatitis and how it correlates with diet. *J Gastroenterol* 2008, 43(1):95-102.
- Mackay IR, Weiden S, Hasker J.** Autoimmune hepatitis. *Ann NY Acad Sci* 1965, 124:767-780.
- MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA.** Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 1998, 37: 1613-1622.
- Macías-Rodríguez RU and Torre A.** Pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis. An insulin resistance overview. *Rev Invest Clin* 2009, 61(2):161-72.
- Maddrey W.** Bone disease in patients with primary biliary cirrhosis; in Popper H, Schaffner F (eds): *Progress in Liver Disease.* New York, Grune & Stratton, 1990 9:537-554.
- Madill J, Arendt BM, Aghdassi E, Therapondos G, Lilly L, Chow CW et al.** Hepatic lipid peroxidation and antioxidant micronutrients in hepatitis virus C liver recipients with and without disease recurrence. *Transplant Proc* 2009, 41(9):3800-5.
- Maher JJ.** Alcoholic steatosis and steatohepatitis. *Semin Gastrointest Dis* 2002, 13:31-9.
- Mahmood S, Yamada G, Niiyama G, Kawanaka M, Togawa K, Sho M et al.** Effect of vitamin E on serum aminotransferase and thioredoxin levels in patients with viral hepatitis C. *Free Radic Res* 2003, 37:781–785.

Maiani G, Castón MJ, Catasta G, Toti E, Cambrodón IG, Bysted A. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res* 2009, 2:S194-218.

Maiorino M, Thomas JP, Girotti AW, Ursini F. Reactivity of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipids and cholesterol hydroperoxides. *Free Radic Res Commun* 1991, 13:131-135.

Majano PL, García-Monzón C, López-Cabrera M, Lara-Pezzi E, Fernández-Ruiz E et al. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. *J Clin Invest* 1998, 101:1343–1352.

Majano PL, García-Monzón C, García-Trevijano ER, Corrales FJ, Cámara J, Ortiz P et al. S-Adenosylmethionine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in rat liver and isolated hepatocytes. *J Hepatol* 2001, 35:692-699.

Majano PL, Medina J, Zubía I, Sunyer L, Lara-Pezzi E, Maldonado-Rodríguez A et al. N-Acetyl-cysteine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in human hepatocytes. *J Hepatol* 2004, 40:632-637.

Makaritsis KP, Gatselis NK, Ioannou M, Petinaki E, Dalekos GN. Polyclonal hypergammaglobulinemia and high smooth-muscle autoantibody titers with specificity against filamentous actin: consider visceral leishmaniasis, not just autoimmune hepatitis. *Int J Infect Dis* 2009, 13(4):e157-60.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004, 79(5):727-47.

Mandrekar P, Szabo G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol* 2009, 50(6):1258-66.

Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. The Retinoids Receptors in the Retinoids, *Biology Chemistry and Medicine*. 2nd ed, Raven Press, New York, 1994:319-350.

Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial

treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001, 358(9286):958-65.

Mantena SK, King AL, Andringa KK, Eccleston HB, Bailey SM. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. *Free Radic Biol Med* 2008, 44(7):1259-72.

Mantle D and Preedy VR. Free radicals as mediators of alcohol toxicity. *Adverse Drug React Toxicol Rev* 1999, 18(4):235-52.

Mao H, Reddy GR, Marnett LJ. Solution structure of an oligodeoxynucleotide containing the malondialdehyde deoxyguanosine adduct N²-(3-oxo-1-propenyl)-Dg (ring-opened M1G) positioned in a (CpG)₃ frameshift hotspot of the *Salmonella typhimurium* hisD3052 gene. *Biochemistry* 1999, 38:13491-501.

Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shifman ML et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003, 348:808–816.

Marcellin P, Castelnau C, Martinot-Peignoux M, Boyer N. Natural history of hepatitis B. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2005, 51:63-75.

Marquez LA and Dunford HB. Mechanism of the Oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine by Myeloperoxidase Determined by Transient- and Steady-State Kinetics. *Biochemistry* 1997, 36 (31):9349–9355.

Marnett LJ. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC* 1999A, 150:17-27.

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999B, 424:83-95.

Marnett LJ. Generation of mutagens during arachidonic acid metabolism. *Cancer Metastas Rev* 1999Γ, 13:303-308.

Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends in Mol Med* 2008, 14:72-81.

Marshal WJ. Κλινική βιοχημεία. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας. 3rd edition. 1998:97-103.

Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005, 16:577–586.

Masini A, Ceccarelli D, Gallesi D, Giovannini F, Trenti T. Lipid hydroperoxide induced mitochondrial dysfunction following acute ethanol intoxication in rats. The critical role for mitochondrial reduced glutathione. *Biochem Pharmacol* 1994, 47:217-24.

Mates JM, Perez-Gomez C, Blanca M. Chemical and biological activity of free radical 'scavengers' in allergic disease. *Clin Chim Acta* 2000, 296:1-15.

Mato JM, Cámara J, Fernández de Paz J, Caballería L, Coll S, Caballero A et al. S-adenosylmethionine in alcoholic liver cirrhosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *J Hepatol* 1999, 30:1081-1089.

Matsunami T, Sato Y, Sato T, Ariga S, Shimomura T, Yukawa M. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Int J Clin Exp Pathol* 2009, 3(2):177-88.

Ma Y, Gäken J, McFarlane BM, Foss Y, Farzaneh F, McFarlane IG et al. Alcohol dehydrogenase: a target of humoral autoimmune response in liver disease. *Gastroenterology* 1997, 112: 483-492.

Mbellering D, McAndrew J, Patel RP. Nitric oxide dependent induction of glutathione synthesis through increased expression of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Arch Biochem Biophys* 1998, 358:74-82.

McCord JM and Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969, 244:6049-6055.

McCord JM and Wong K. Phagocyte-produced free radicals: roles in cytotoxicity and inflammation. *Ciba Found Symp* 1978, (65):343-60.

McCord JM and Omar BA. Sources of free radicals. *Toxicol Ind Health* 1993, 9(1-2):23-37.

McCullough AJ. Update on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Gastroenterol* 2002, 34:255–262.

- McCullough AJ.** Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006, 1:S17-29.
- McElhinney B, Poynter ME, Shrivastava P et al.** Eosinophil peroxidase catalyzes JNK-mediated membrane blebbing in a Rho kinase-dependent manner. *J Leukoc Biol* 2003, 74:897–907.
- McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al.** Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998, 339:1485-92.
- McMaster MC.** HPLC: A practical User's Guide. 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc. 2006.
- Meadows J, Smith RC, Reeves J.** Uric acid protects membranes and linoleic acid from zone induced oxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 1986, 137:536-541.
- Meager EA, Barry OP, Burke A, Lucey MR, Lawson JA et al.** Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. *J Clin Invest* 1999, 104:805-813.
- Medina J, Moreno-Otero R.** Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. *Drugs* 2005, 65:2445-2461.
- Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Mobarhan S.** Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr Rev* 2002, 60:289-93.
- Meister A.** Glutathione, metabolism and function via the gamma-glutamyl cycle. *Life Sci* 1974, 15(2):177-90.
- Meister A and Anderson ME.** Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983, 52:711-760.
- Meister A.** Glutathione. In: I.M. Aria, W.B. Jakoby, H. Popper, D. Schachter and D.A. Shafritz, Editors, *The Liver: Biology and Pathobiology* (second ed.), Raven Press, New York 1988, 401–417.
- Meister A.** Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 1988, 263:17205-17208.

Melhem A, Stern M, Shibolet O, Israeli E, Ackerman Z, Pappo O et al. Treatment of chronic hepatitis C virus infection via antioxidants: results of a phase I clinical trial. *J Clin Gastroenterol* 2005, 39:737–742.

Mellqvist UH, Hansson M, Brune M, Dahlgren C, Hermodsson S, Hellstrand K. Natural killer cell dysfunction and apoptosis induced by chronic myelogenous leukemia cells: role of reactive oxygen species and regulation by histamine. *Blood* 2000, 96:1961-1968.

Mello T, Ceni E, Surrenti C, Galli A. Alcohol induced hepatic fibrosis: role of acetaldehyde. *Mol Aspects Med* 2008, 29(1-2):17-21.

Meydani M and Evans WJ. *Free Radical in Aging*. ed. Yu B.P, CRC Press. Boca Raton, Florida, 1993:183-204.

Meyer M, Pahl HL, Baeuerle PA. Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes. *Chemico-Biol Interact* 1994, 91:91-100.

Michel F, Bonnefont-Rousselot D, Mas E, Draï J, Thérond P. Biomarkers of lipid peroxidation: analytical aspects. *Ann Biol Clin* 2008, 66:605-20.

Miele L, Forgione A, Gasbarrini C, Grieco A. Noninvasive assessment of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Translational Research* 2007, 149:114-125.

Miller JW, Selhub J, Joseph JA. Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of O-methylation and melatonin. *Free Radical Biol Med* 1996, 21:241-249.

Milani S, Herbst H, Schuppan D, Surrenti C, Riecken EO, Stein H. Cellular localization of type I, III and IV procollagen gene transcripts in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 1990, 137: 59-70.

Mimidis K, Papadopoulos VP, Elefsiniotis I et al. Hepatitis C virus survival curve analysis in naïve patients treated with peginterferon alpha-2b plus ribavirin. A randomized controlled trial for induction with high doses of peginterferon and predictability of sustained viral response from early virologic data. *J Gastrointestin Liver Dis* 2006, 15:213-9.

Misra HP and Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1972, 247(21):6960-2.

Miwa S, St-Pierre J, Partidge L, Brand MD. Superoxide and hydrogen peroxide production by drosophila mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2003, 35:938-948.

Miyagi SJ, Brown IW, Chock JM, Collier AC. Developmental changes in hepatic antioxidant capacity are age-and sex-dependent. *J Pharmacol Sci* 2009, 111(4):440-5.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991, 43:109–142.

Moncada C, Torres V, Varghese G, Albano E, Israel Y. Ethanol-derived immunoreactive species formed by free radical mechanisms. *Mol Phramacol* 1994, 46:786-791.

Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis *Cancer Res* 2001, 61:4365-4370.

Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87:9383-9387.

Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. *N Engl J Med* 1995, 332:1198-1203.

Morrow JD and Roberts LJ. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* 1996, 51:1-9.

Morrow JD and Roberts LJ. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 1997, 36:1-21.

Motomura K, Ohata M, Satre M, Tsukamoto H. Destabilization of TNF-a Mrna by retinoic acid in hepatic macriphages: implications for alcoholic liver disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, 281:E420-E429.

- Mottaran E, Stewart SF, Rolla R, Vay D, Cipriani V, Moretti M.** Lipid peroxidation contributes to immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med* 2002, 32:38-45.
- Moulas AN, Noulas A, Makri E, Papadamou G, Bonanou-Tzedaki S and Dalekos GN.** Total antioxidant status and erythrocytes superoxide dismutase activity in patients with chronic Hepatitis B and C. *Eur J of Inflammation* 2004, 2:77-84.
- Munteanu I and Didilescu C.** Chemistry and toxicology of cigarette smoke in the lungs. *Pneumologia* 2007, 56(1):41, 43-6.
- Muratori L, Cataleta M, Muratori P, Manotti P, Lenzi M, Cassani F et al.** Detection of anti liver cytosol antibody type 1 (antiLC-1) by immunodiffusion, counterimmunoelectrophoresis and immunoblotting: comparison of three different techniques. *J Immunol Methods* 1995, 187:259-64.
- Muriel P.** Cytokines in liver diseases. In Sahu S, editor. *Hepatotoxicity: From Genomics to In Vitro and In Vivo Models*. West Sussex, UK: Wiley, 2007:371–389.
- Muriel P.** Role of free radicals in liver diseases. *Hepato Int*. 2009.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW.** *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26th edition. McGraw-Hill. 2003.
- Murphy MP.** How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 2009 417:1-13.
- Nagata K, Suzuki H, Sakaguchi S.** Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *J Toxicol Sci* 2007, 32(5):453-68.
- Nagao A.** Absorption and function of dietary carotenoids. *Forum Nutr*. 2009, 61:55-63.
- Nair S, Singh SV, Krishan A.** Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. *Cytometry* 1991, 12:336-342.
- Nair J, Srivatanakul P, Haas C, Jedpiyawongse A, Khuhaprema T, Seitz HK et al.** High urinary excretion of lipid peroxidation-derived DNA damage in patients with cancer-prone liver diseases. *Mutat Res* 2010, 683(1-2):23-8.

Nakanuma Y, Hirai N, Kono N, Ohta G. Histological and ultrastructural examination of the intrahepatic biliary tree in primary sclerosing cholangitis. *Liver* 1986, 6:317-325.

Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Hokari R, Kato N, Hibi T, Miura S. An antioxidant resveratrol significantly enhanced replication of hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2010, 16:184-192.

Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Thomas P, Dannenberg AJ. Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF- κ B-dependent genes. *Am J Physiol* 2003, 284:G321–G327.

Natori S, Rust C, Stadheim LM, Srinivasan A, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis is a pathological feature of human alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2001, 34:248–253.

Negro F and Sanyal AJ. Hepatitis C virus, steatosis and lipid abnormalities: clinical and pathogenic data. *Liver Int* 2010, 2:26-37.

Neuzil J and Stocker R. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett* 1988, 331:281-285.

Nicholson SK, Tucker GA, Brameld JM. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *Proc Nutr Soc* 2008, 67(1):42-7.

Nihro Y, Miyataka H, Sudo T, Matsumoto H, Saton T. Alkylascorbic acids as free radical quenchers: synthesis and inhibitory effect on lipid peroxidation. *J Med Chem* 1991, 34:2152-2157.

Niki E. Free Radicals in the 1900's: From in vitro to in vivo. *Free Rad Res* 2000, 33:697-704.

Nobili V, Pastore A, Gaeta LM, Tozzi G, Comparcola D, Sartorelli MR et al. Glutathione metabolism and antioxidant enzymes in patients affected by nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2005, 355(1-2):105-11.

Nordmann R, Ribière C, Rouach H. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Radic Biol Med* 1992, 12(3):219-40.

Nourooz-Zadeh J, Cooper MB, Ziegler D, Betteridge DJ. Urinary 8-epi-PGF_{2a} and its endogenous β -oxidation products (2,3-dinor-5,6-dihydro, and 2,3-dinor-8-epi-PGF_{2a}) as biomarkers of total body oxidative stress. *Bioch Biophys Res Com* 2005, 330:731-736.

- Novo E, Parola M.** Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrog Tissue Repair* 2008, 13:5-23.
- Nowak MA, Bonhoefer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H.** Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *ProcNatl Acad Sci USA* 1996, 93:4398–4402.
- Nyberg A, Berne B, Nordlinder H, Busch C, Eriksson U, Loof L and Vahlquist A.** Impaired release of vitamin a from liver in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1988, 8:136–141.
- Obermayer–Straub P, Stassburg CP, Manns MP.** Autoimmune hepatitis. *J Hepatology* 2000, 32:181-97.
- Ohhira M, Ono M, Ohhira M, Sekiya C, Namiki M, Fujimoto Y et al.** Changes in free radical-metabolizing enzymes and lipid peroxides in the liver of Long-Evans with cinnamon-like coat color rats. *J Gastroenterol* 1995, 30:619–623.
- Ohmori H and Kanayama N.** Immunogenicity of an inflammation-associated product, tyrosine nitrated self-proteins. *Autoimmun Rev* 2005, 4:224–229.
- Okado-Matsumoto A, Fridovich I.** Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 2001, 276(42):38388-93.
- Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM, Weinman SA.** Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 2002, 122:366–375.
- Okuno M, Moriwaki H, Imai S, Muto Y, Kawada N, Suzuki Y, Kojima S.** Retinoids Exacerbate Rat Liver Fibrosis by Inducing the Activation of Latent TGF-beta in Liver Stellate Cells. *Hepatology* 1997, 26:913-921.
- Olinescu R and Smith TL.** *Free Radicals in Medicine.* Nova Science Publishers, Inc. Huntington, New York, 2002.
- Oliveira CP, da Costa Gayotto LC, Tatai C, Della Bina BI, Janiszewski M, Lima ES et al.** Oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, in rats fed with a choline-deficient diet. *J Cell Mol Med* 2002, 6:399-406.
- Olson JA and Krinsky NI.** Introduction:the colorful fascinating world of the carotenoids:

important physiologic modulators. *FASEB J* 1995, 9:1547-1550.

Ono M, Sekiya C, Ohhira M, Ohhira M, Namiki M, Endo Y et al. Elevated level of serum Mn-superoxide dismutase in patients with primary biliary cirrhosis: possible involvement of free radicals in the pathogenesis in primary biliary cirrhosis. *J Lab Clin Med* 1991, 118(5):476-83.

Ookhtens M, Hobdy K, Corvasce MC, Aw TY and Kaplowitz N. Sinusoidal efflux of glutathione in the perfused rat liver. Evidence for a carrier-mediated process. *J Clin Invest* 1985, 75:258–265.

Orhan H, Vermeulen NP, Tump C, Zappey H, Meerman JH. Simultaneous determination of tyrosine, phenylalanine and deoxyguanosine oxidation products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry as non-invasive biomarkers for oxidative damage. *J Chrom B* 2004, 799:245-254.

Ozawa T. Formation of oxygen radicals in the electron transfer chain and antioxidant properties of coenzyme Q. In: Lenaz G (ed) *Coenzyme Q: Biochemistry, bioenergetics and clinical applications of ubiquinone*. Wiley & Sons, Chichester, 1985:441-456.

Ozcelik D and Uzun H. Copper intoxication; antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Biol Trace Elem Res* 2009, 127(1):45-52.

Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1995, 19(2):227-50.

Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967, 70:158-169.

Pal S, Polyak SJ, Bano N, Qiu WC, Carithers RL, Shuhart M, Gretch DR, Das A. Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. *J Gastroenterol Hepatol* 2010, 25(3):627-34.

Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med* 1999, 26:746-761.

Palozza P and Krinsky NI. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview.

Methods Enzymol 1992, 213:403-420.

Panta K, Chattopadyay R, Chattopadyay DJ, Chatterjee IB. Vitamin C prevents cigarette smoke-induced oxidative damage in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000, 29:115-124.

Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 232(1):164-8.

Papamichalis PA, Zachou K, Koukoulis GK, Veloni A, Karacosta EG, Kypri L et al. The revised international autoimmune hepatitis score in chronic liver diseases including autoimmune hepatitis/overlap syndromes and autoimmune hepatitis with concurrent other liver disorders. *J Autoimmune Dis* 2007, 4:3.

Pastor A, Collado PS, Almar M, González-Gallego J. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *Journal of Hepatology* 1997, 27(2):363-370.

Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003, 333(1):19-39.

Par A, Roth E, Rumi G, Kovacs Z, Nemes J, Mozsik G. Oxidative stress and antioxidant defense in alcoholic liver disease and chronic hepatitis C. *Orv Hetil* 2000, 141:1559-1655.

Paradis V, Kollinger M, Fabre M, Holstege A, Poynard T, Bedossa P. In Situ Detection of Lipid Peroxidation By-Products in Chronic Liver Diseases. *Hepatology* 1997, 26:135–142.

Paradis V, Mathurin P, Kollinger M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Piton A, et al. In situ detection of lipid peroxidation in chronic hepatitis C: correlation with pathological features. *J Clin Pathol* 1997, 50:401–406.

Pares A and Rodes J. Natural history of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2003, 7:779–794.

Parikh-Patel A, Gold E, Mackay IR, Gershwin ME. The geoepidemiology of primary biliary cirrhosis: contrasts and comparisons with the spectrum of autoimmune diseases. *Clin Immunol* 1999, 91:206–218.

Parola M, Leonarduzzi G, Biasi F, Albano E, Biocca ME, Poli G, Dianzani MU et al.

Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. *Hepatology* 1992, 16:1014-1021.

Parola M, Pinzani M, Casini A, Albano E, Poli G, Gentilini A et al. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen $\alpha 1$ (I) gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 194:1044-1050.

Parola M and Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001, 35:297–306.

Parola M and Robino G. Oxidative stress related molecules and liver fibrosis. *Journal of Hepatology* 2001, 35:297-306.

Paronetto F. Immunologic reactions in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1993, 13(2):183-95.

Pastor A, Collado PS, Almar M and Gonzalez-Gallego J. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol* 1997, 27:363–370.

Pastorino JG and Hoek JB. Ethanol potentiates tumor necrosis factor- α cytotoxicity in hepatoma cells and primary rat hepatocytes by promoting induction of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2000, 31:1141-1152.

Paumgartner G and Pusch T. Medical treatment of cholestatic liver disease. *Clin Liver Dis* 2008, 12:53–80.

Pecsok R, Shields LD, McWilliam IG. Σύγχρονες μέθοδοι στη χημική ανάλυση. Δεύτερη έκδοση. Σταύρος Βολιώτης. Εκδόσεις Α.Πνευματικός, Αθήνα 1980:171-189.

Pemberton PW, Aboutwerat A, Smith A, Burrows PC, McMahon RF, Warnes TW. Oxidant stress in type I autoimmune hepatitis: the link between necroinflammation and fibrogenesis? *Biochim Biophys Acta* 2004, 1689(3):182-9.

Pemberton PW, Aboutwerat A, Smith A, Warnes TW. Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis improves glutathione status but fails to reduce lipid peroxidation. *Redox Rep* 2006, 11(3):117-23.

Pennington CD and Gregory EM. Isolation and reconstitution of iron- and manganese-containing superoxide dismutases from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J Bacteriol* 1986, 166(2):528-32.

Peoples MC and Karnes HT. Recent developments in analytical methodology for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and related compounds. *J Chromatogr B* 2005, 827:5–15.

Perlemuter G, Davit-Spraul A, Cosson C, et al. Increase in liver antioxidant enzyme activities in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005, 25:946–953.

Perlemuter G, Bigorgne A, Cassard-Doulier A, Naveau S. Nonalcoholic fatty liver disease: from pathogenesis to patient care. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* 2007, 3:458-469.

Pero RW, Sheng Y, Olsson A, Brynggelsson C, Lund-Pero M et al. Hypochlorous acid/N-chloramines are naturally produced DNA repair inhibitors. *Carcinogenesis* 1996, 17:13-19.

Pessayre D and Fromenty B. NASH: A mitochondrial disease. *J Hepatol* 2005, 42:928-940.

Peterhans E. Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases. *Biol Trace Elem Res* 1997, 56:107–116.

Petersen DR and Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med* 2004, 37:937–945.

Petta S, Muratore C, Craxì A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future. *Dig Liver Dis* 2009, 41(9):615-25.

Petras T, Siems WG, Grune T. 4-hydroxynonenal is degraded to mercapturic acid conjugate in rat kidney. *Free Radic Biol Med* 1995, 19(5):685-8.

Philipp T, Durazzo M, Trautwein C, Alex B, Straub P, Lamb JG, Johnson EF et al. LKM-3 autoantibodies on chronic hepatitis D. Recognize the UDP-glucuronosyl-transferase. *Lancet* 1994, 344:578-81.

Phung N, Pera N, Farrell G, Leclercq I, Hou JY, George J. Pro-oxidant-mediated hepatic fibrosis and effects of antioxidant intervention in murine dietary steatohepatitis. *Int J Mol Med* 2009, 24(2):171-80.

- Pietrangelo A.** Iron, oxidative stress and liver fibrogenesis. *J Hepatol* 1999, 28:8-13.
- Pinto RE and Bartley W.** The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem J* 1969, 112: 109-115.
- Plastaras JP, Guengerich FP, Nebert DW, Marnett LJ.** Xenobiotic-metabolizing cytochromes P450 convert prostaglandin endoperoxide to hydroxyheptadecatrienoic acid and the mutagen, malondialdehyde. *J Biol Chem* 2000, 275:11784-11790.
- Poli G and Parola M.** Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 1997, 22:287–305.
- Poli G.** Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2000, 21:720-726.
- Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G.** 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* 2008, 28:569-631.
- Polizos A, Kelekis N, Sinani C, Patsiaoura K, Papadamou G, Dalekos GN.** Advanced intrahepatic cholangiocarcinoma in hepatitis C virus-related decompensated cirrhosis: case report and review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003,15:331-4.
- Poonawala A, Nair SP, Thuluvath PJ.** Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: a case-control study. *Hepatology* 2000, 32:689-92.
- Poynard T, Bedossa P, Opolon P.** Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997, 349:825-32
- Pratico D, Iuliano L, Basili S, Ferro D, Camastra C, Cordova C, FitzGerald GA, Violi F.** Enhanced lipid peroxidation in hepatic cirrhosis. *J Investig Med* 1998, 46(2):51-7.
- Praticò D.** Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol Sci* 2008, 29(12):609-15.
- Price CP and Newman DJ.** Principles and practice, 2nd edition, Grove Dictionaries Inc, USA, 1996.

- Prince MI, Chetwynd A, Craig WL, Metcalf JV, James OF.** Asymptomatic primary biliary cirrhosis: clinical features, prognosis, and symptom progression in a large population based cohort. *Gut* 2004, 53:865–870.
- Pryor WA, Stanley JP, Blair E.** Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids* 1976, 11(5):370-9.
- Pryor WA.** Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann Rev Physiol* 1986, 48: 657-667.
- Pryor WA.** Free radical reactions and their importance in biochemical systems. *Fed Proc* 1973, 32(8):1862-9.
- Pryor WA.** Free Radicals. McCraw-Hill, New York, 1996.
- Pullar JM, Winterbourn CC, Vissers MCM.** Loss of GSH and thiol enzymes in endothelial cells exposed to sublethal concentrations of hypochlorous acid. *Am J Physiol* 1999, 277: H1505–H1512.
- Puppo A and Halliwell B.** Formation of hydroxyl radicals in biological systems. Does myoglobin stimulate hydroxyl radical formation from hydrogen peroxide? *Free Radic Res Commun* 1988, 4(6):415-22.
- Quertemont E and Didone V.** Role of acetaldehyde in mediating the pharmacological and behavioral effects of alcohol. *Alcohol Res Health* 2006, 29(4):258-65.
- Radi R.** Kinetic analysis of reactivity of reactivity of peroxyxynitrate with biomolecules. *Methods Enzymol* 1996, 269:354-366.
- Radi R.** Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chem Res Toxicol* 1998, 11:720-721.
- Rahman I, Clerch RC, Massaro D.** Rat lung antioxidant enzyme induction by ozone. *Am J Physiol* 1991, 260:L412-8.
- Rahman I.** Dietary polyphenols mediated regulation of oxidative stress and chromatin remodeling in inflammation. *Nutr Rev* 2008, 66 Suppl 1:S42-5.

Rao CR, Miller PJ, and Rao DC. Handbook of Statistics, Volume 27: Epidemiology and Medical Statistics. 2007.

Ratzu V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000, 118:1117-23.

Ravanat JL, Guicherd P, Tuce Z, Cadet J. Simultaneous determination of liver oxidative DNA lesions in human urine. *Chem Res Toxicol* 1999, 12:802-808.

Ravanfar P, Satyaprakash A, Creed R, Mendoza N. Existing antiviral vaccines. *Dermatol Ther.* 2009, 22:110-28.

Ray RS, Mehrotra S, Prakash S, Joshi PC. Ultraviolet radiation-induced production of superoxide radicals by selected antibiotics. *Drug Chem Toxicol* 1996, 19(1-2):121-30.

Reddy YN. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Tuberc* 2004, 51:213-218.

Reid A.E. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2001, 121:710-723.

Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER. Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *PNAS* 2001, 98(1):69-74.

Requena JR, Levine RL, Stadtman ER. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids* 2003, 25:221–226.

Renaudineau Y, Dalekos GN, Guéguen P, Zachou K, Youinou P. Anti-alpha-actinin antibodies cross-react with anti-ssDNA antibodies in active autoimmune hepatitis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2008, 34(3):321-5.

Rensen SS, Slaats Y, Nijhuis J, Jans A, Bieghs V, Driessen A et al. Increased hepatic myeloperoxidase activity in obese subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol.* 2009, 175(4):1473-82.

Reynolds WF, Patel K, Pianko S, Blatt LM, Nicholas JJ, McHutchison JG. A genotypic association implicates myeloperoxidase in the progression of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2002, 3(6):345-9.

Richelle M, Turini ME, Guidoux R, Tavazzi I, Métairon S, Fay LB. Urinary isoprostane excretion is not confounded by the lipid content of the diet. *FEBS Lett* 1999, 459:259–262.

Richmond R, Halliwell B, Chauhan J, Darbre A. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals: detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds. *Anal Biochem* 1981,118(2):328-35.

Rigopoulou EI and Dalekos GN. Anti-sp100 antibodies in primary biliary cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2004, 39:406-7.

Rigopoulou EI, Suri D, Chokshi S, Mullerova I, Rice S, Tedder RS et al. Lamivudine plus interleukin-12 combination therapy in chronic hepatitis B: antiviral and immunological activity. *Hepatology* 2005A, 42:1028-36.

Rigopoulou EI, Stefanidis I, Liaskos C, Zervou EK, Rizos C, Mina P et al. HCV-RNA qualitative assay based on transcription mediated amplification improves the detection of hepatitis C virus infection in patients on hemodialysis: results from five hemodialysis units in central Greece. *J Clin Virol* 2005B, 34:81-5.

Rigopoulou EI, Davies ET, Pares A, Zachou K, Liaskos C, Bogdanos DP et al. Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gut* 2005Γ, 54:528-32.

Rigopoulou EI, Dalekos G, Bogdanos DP. How common are connective tissue disorders in patients with autoimmune hepatitis? *Semin Arthritis Rheum* 2007A, 36(5):332.

Rigopoulou EI, Mytilinaiou M, Romanidou O, Liaskos C, Dalekos GN. Autoimmune hepatitis-specific antibodies against soluble liver antigen and liver cytosol type 1 in patients with chronic viral hepatitis. *J Autoimmune Dis* 2007B, 4:2.

Rigopoulou EI, Bogdanos DP, Liaskos C, Koutsoumpas A, Baum H, Vergani D, Dalekos GN. Anti-mitochondrial antibody immunofluorescent titres correlate with the number and intensity of immunoblot-detected mitochondrial bands in patients with primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta* 2007Γ, 380:118-21.

Rigopoulou EI, Davies ET, Bogdanos DP, Liaskos C, Mytilinaiou M, Koukoulis GK et al.

Antimitochondrial antibodies of immunoglobulin G3 subclass are associated with a more severe disease course in primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2007Δ, 27(9):1226-31.

Rigopoulou EI and Dalekos GN. Autoimmune hepatitis: of host and pathogen. *Hepatology* 2008, 47:2147-8.

Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1994, 65(1):27-33.

Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G. Viral hepatitis and liver disease. Turin: Minerva Medica, 1997.

Rodes J, Benhamou JP, Blei A, Reichen J, Rizzetto M. Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice. 3^{ed} edition, Blackwell 2007:583-630.

Roberts JL and Morrow JD. Measurement of F2-Isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000, 28: 505-513.

Rocchi E, Casalgrandi G, Ronzoni A, Rosa MC, Cioni G, Marazzi A et al. Antioxidant liposoluble vitamins and carotenoids in chronic hepatitis. *Europ Jour of Intern Med* 2001, 12:116-121.

Rodrigo R and Bosco C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2006, 142(3-4):317-27.

Rolla R, Vay D, Mottaran E, Parodi M, Traverso N, Aricó S, Sartori M et al. Detection of circulating antibodies against malonaldehyde-acetaldehyde adducts in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 2000, 31(4):878-84.

Romero MJ, Bosch-Morell F, Romero B et al. Serum MDA: possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 1998, 25: 993-997.

Romero M, García-Monzón C, Clemente G, Salcedo M, Alvarez E, Majano PL et al Intrahepatic expression of inducible nitric oxide synthase in acute liver allograft rejection: evidence of modulation by corticosteroids. *Liver Transpl* 2001, 7:16-21.

- Romieu I, Castro-Giner F, Kunzli N, Sunyer J.** Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: a review. *Eur Respir J* 2008, 31:179-97.
- Ronis MJ, Hakkak R, Korourian S, Albano E, Yoon S, Ingelman-Sundberg M et al.** Alcoholic liver disease in rats fed ethanol as part of oral or intragastric low-carbohydrate liquid diets. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004, 229(4):351-60.
- Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I, Giustarini D, Lusini L and Colombo R et al.** Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clin Chem* 2002, 48:742–753.
- Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanraman B, Barnes S, et al.** Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1994, 269:26066-75.
- Rubbo H, Trostchansky A, O'Donnell VB.** Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: mechanisms and consequences. *Arch Biochem Biophys* 2009, 484(2):167-72.
- Russanov E and Ivancheva E.** Ascorbate and Fe⁺⁺-induced lipid peroxidation in liver mitochondria isolated from copper-deficient rats. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 1979, 5(2):67-72.
- Ruvolo PP, Deng X, May WS.** Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* 2001, 15:515-521.
- Sacheck JM, Milbury PE, Cannon JG, Roubenoff R, Blumberg JB.** Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radical Biol Med* 2003, 34:1575-88.
- Sahari JC.** Retinoids in Mammalian Vision, in *The Handbook of Experimental Pharmacology, The Retinoids*, Nau H and Blaner W.S. eds, Springer Verlag, Heidelberg, 1999, 139:563-588.
- Salunga TL, Cui ZG, Shimoda S, Zheng HC, Nomoto K, Kondo T et al.** Oxidative stress-induced apoptosis of bile duct cells in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2007, 29(2-3):78-86.
- Sampey BP, Stewart BJ, Petersen DR.** Ethanol-induced modulation of hepatocellular extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity via 4-hydroxynonenal. *J Biol Chem* 2007, 282:1925–1937.

Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001, 120(5):1183-92.

Sanz-Cameno P, Medina J, García-Buey L, García-Sánchez A, Borque MJ, Martín-Vílchez S et al. Enhanced intrahepatic inducible nitric oxide synthase expression and nitrotyrosine accumulation in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2002, 37:723-729.

Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita* 2007, 43(4):394-405.

Sartori S, Andorno S, Rigamonti C, Boldorini R. Chronic hepatitis C treated with phlebotomy alone: biochemical and histological outcome. *Dig Liver Dis* 2001, 33:157–162.

Sato M and Bremner I. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med* 1993, 14:325-337.

Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 2005, 38(7):995-1014.

Schwemmer M, Fink B, Köckerbauer R, Bassenge E. How urine analysis reflects oxidative stress-nitrotyrosine as a potential marker. *Clinica Chimica Acta* 2000, 297:207-216.

Schif ER, Lai CL, Hadziyanis S, Neuhaus P, Terault N, Colombo M et al. Adefovir dipivoxil therapy for lamivudine-resistant hepatitis B in pre- and post-liver transplantation patients. *Hepatology* 2003, 38:1419–1427.

Schneider T and Issekutz AC. Quantitation of eosinophil and neutrophil into rat lung by specific assays for eosinophil peroxidase and myeloperoxidase. *Journal of Immunological Methods* 1996, 198:1-14.

Schrader M and Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*.2006, 1763:1755-66.

Schreck R and Baeuerle PA. A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol* 1991, 1:39-42.

- Schwabe RF and Brenner DA.** Mechanisms of liver injury I. TNF- α -induced liver injury: role of IKK, JNK and ROS pathways. *Am J Physiol* 2006, 290:G583–G589.
- Schwarz KB.** Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic Biol Med* 1996, 21:641–649.
- Schwartz JL.** The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumor cell growth. *J Nutr* 1996, 126(4 Suppl):1221S-7S.
- Schwedhelm E, Tsikas D, Gutzki FM, Frölich JC.** Gas Chromatographic-Tandem Mass Spectrometric Quantification of Free 3-Nitrotyrosine in Human Plasma at the basal State. *Anal Biochem* 1999, 276:195-203.
- Seibold F, Weber P, Schöning A, Mörk H, Goppel S, Scheurlen M.** Neutrophil antibodies (pANCA) in chronic liver disease and inflammatory bowel disease: do they react with different antigens? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996, 8(11):1095-100.
- Seko Y and Imura N.** Active oxygen generation as a possible mechanism of selenium toxicity. *Biomed Environ Sci* 1997, 10:333-339.
- Selmi C, Invernizzi P, Miozzo M, Podda M, Gershwin ME.** Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology* 2004, 127:485–492.
- Sen CK and Packer L.** *Methods in Enzymology, Volume 352: Redox Cell Biology and Genetics, Part A.* 2002.
- Serpillon S, Floyd BC, Gupte RS, George S, Kozicky M, Neito V et al.** Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009, 297(1):H153-62.
- Servili M, Esposito S, Fabiani R, Urbani S, Taticchi A, Mariucci F et al.** Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology* 2009, 17(2):76-84.

Severi T, Ying C, Vermeesch JR, Cassiman D, Cnops L, Verslype C et al. Hepatitis B virus replication causes oxidative stress in HepAD38 liver cells. *Mol Cell Biochem* 2006, 290(1-2):79-85.

Sevilla CL, Mahle NH, Eliezer N et al. Development of monoclonal antibodies to the malondialdehyde-deoxyguanosine adduct, pyrimidopurinone. *Chem Res Toxicol* 1997, 10:172-180.

Shahidi F and Naczk M. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications.* Lancaster, PA: Technomic, 1995.

Sharma MK and Buettner GR. Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: an ESR study. *Free Radic Biol Med* 1993, 14:649-653.

Shaw S, Jayatilleke E, Ross WA, Gordon ER, Leiber CS. Ethanol-induced lipid peroxidation: potentiation by long-term alcohol feeding and attenuation by methionine. *J Lab Clin Med* 1981, 98:417-24.

Shibutani S, Takeshida M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxoG. *Nature* 1991, 349:431-434.

Shiffman ML. Pegylated interferons: what role will they play in the treatment of chronic hepatitis C? *Curr Gastroenterol Rep* 2001, 3:30-7.

Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 9697-9701.

Shigenaga MK and Bruce NA. Assays for 8-OHdG: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radical Biology Medicine* 1991, 10:211-216.

Shimoda R, Nagashima M, Sakamoto M et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res* 1994, 54:3171-3172.

Shimoda S, Miyakawa H, Nakamura M, Ishibashi H, Kikuchi K, Kita H, Niino H et al. CD4 T-cell autoreactivity to the mitochondrial autoantigen PDC-E2 in AMA-negative primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2008, 31:110-115.

Shiraishi N, Inai Y, Bi W, Nishikimi M. Fragmentation and dimerization of copper-loaded prion protein by copper-catalysed oxidation. *Biochem J* 2005, 387(Pt 1):247-55.

Shulga N, Hoek JB, Pastorino JG. Elevated PTEN levels account for the increased sensitivity of ethanol-exposed cells to tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. *J Biol Chem* 2005, 280:9416–9424.

Shulman AI. Larson C et al. Structural Determinants of Allosteric Ligand Activation in RXR Heterodimers. *Cell* 2004, 116:417-429.

Sies H. Oxidative stress. Introductory remarks. In: *Oxidative stress*, Academic Press London 1985:1-8.

Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999, 27:916–921.

Siems WG, Zollner H, Grune T, Esterbauer H. Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonene is not the main product. *J Lipid Res* 1997, 38:612–622.

Simic MG. Oxygen radicals in biology and medicine. New York, Plenum Press, 1998.

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993, 74:2391-9.

Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, Stenson WF. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996, 111:871-885.

Singh D, Greenwald JE, Bianchine J, Metz EN, Sagone AL Jr. Evidence for the generation of hydroxyl radical during arachidonic acid metabolism by human platelets. *Am J Hematol* 1981, 11(3):233-40.

Slund F, Zheng M, Beckwith J, Storz G. Regulation of OxyR-transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:6161-6165.

Snell GD. The H-2 locus of the mouse: observations and speculations concerning its comparative genetics and its polymorphism. *Folia Biol (Praha)* 1968, 14(5):335-58.

Smirnoff N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr Opin Plant Biol* 2000, 3:229–235.

Smith JL. The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Crit Rev Microbiol* 2004, 30(3):173-85.

Sokol RJ, Winkhofer-Roob BM, Devereaux MW and McKim JM. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* 1995, 109:1249-1256.

Sokol RJ. Antioxidant defenses in metal-induced liver damage. *Semin Liver Dis* 1996, 16(1):39-46.

Sorrentino P, Terracciano L, D'Angelo S, Ferbo U, Bracigliano A, Tarantino L et al. Oxidative stress and steatosis are cofactors of liver injury in primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol* 2010.

Sperati A, Abeni DD et al. Exposure to indoor background radiation and urinary concentrations of 8-OHdG, a marker of oxidative DNA damage. *Envir Health Perspec* 1999, 107:213-5.

Spickett CM, Jerlich A, Panasenko OM, Arnhold J, Pitt AR, Stelmaszyńska T, Schaur RJ. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase with lipids. *Acta Biochim Pol* 2000, 47(4):889-99.

Spickett CM. Chlorinated lipids and fatty acids: an emerging role in pathology. *Pharmacol Ther* 2007, 115(3):400-9.

Spitz DR, Sullivan SJ, Malcolm RR and Roberts RJ. Glutathione dependent metabolism and detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic Biol Med* 1991, 11:415–423.

Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 1990, 9(4):315-25.

Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* 2004, 24:7779-7788.

Stasiuk M and Kozubek A. Biological activity of phenolic lipids. *Cell Mol Life Sci* 2010, 67(6):841-60.

Stefek M, Trnkova Z, Krizanova L. 2,4-dinitrophenylhydrazine carbonyl assay in metal-catalysed protein glycooxidation. *Redox Rep* 1999, 4(1-2):43-8.

Stefos A, Gatselis N, Zachou K, Rigopoulou E, Hadjichristodoulou C, Dalekos GN. Descriptive epidemiology of chronic hepatitis B by using data from a hepatitis registry in Central Greece. *Eur J Intern Med* 2009, 20:35-43.

Stevens A and Lowe J. Παθολογική ανατομική. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδη, 1994:246-247.

Stevenson DE and Hurst RD. Polyphenolic phytochemicals--just antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci* 2007, 64(22):2900-16.

Storz G and Tartaglia LA. Oxy R, a regulator of antioxidant genes. *J Nutr* 1992, 122(3):627-30.

Strassburg CP, Alex B, Zindy F, Gerken G, Lüttig B, Meyer zum Büschenfelde KH et al. Identification of cyclin A as a molecular target of antinuclear antibodies (ANA) in hepatic and non-hepatic diseases. *J Hepatol* 1996, 25:859-66.

Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, Nakajima Y, Ishikawa H, Mitsuyoshi H, Sakamoto Y et al. Serum thioredoxin levels as an indicator of oxidative stress in patients with hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2000, 33:616–622.

Suzuki K, Tatsumi H, Satoh S. Manganese-superoxide dismutase in endothelial cells. Localization and mechanism of induction. *Am J Physiol* 1993, 265:H1173-H1178.

Swietek K and Juszczak J. Reduced glutathione concentration in erythrocytes of patients with acute and chronic viral hepatitis. *J Viral Hepat* 1997, 4(2):139-41.

Takeda K, Matsuzawa A, Nishitoh H, Ichijo H. Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell Struct Funct* 2003, 28:23-9.

Takehita K, Chi C, Hirata H, Ono M, Ozawa T. In vivo generation of free radicals in the skin of live mice under ultraviolet light, measured by L-band EPR spectroscopy. *Free Radic Biol Med* 2006, 40(5):876-85.

Tamura S and Shimomura I. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005, 115:1139–1142.

Tardif JC. Antioxidants: the good, the bad and the ugly. *Can J Cardiol* 2006, Suppl B:61B-65B.

Thomas EL, Grisham MB, Jefferson MM. Myeloperoxidase-dependent effect of amines on functions of isolated neutrophils. *J Clin Invest* 1983, 72:441.

Thomas MJK. Ultraviolet and visible spectriscopy, John Wiley, UK. 1996.

Thorin F, Romero D, Lindh M, Dahlgren C, Hellstrand K. A hepatitis C virus-encoded, nonstructural protein (NS3) triggers dysfunction and apoptosis in lymphocytes: role of NADPH oxidase-derived oxygen radicals. *Journal of Leukocyte Biology* 2004, 76:1180-1186.

Thuluvath PJ and Triger DR. Selenium in chronic liver disease. *J Hepatol* 1992, 14:176-183.

Thurman RG. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxins. *Am J Physiol* 1998, 275:G605-G611.

Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969, 27:502–522.

Tilg H and Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000, 343:1467-1476.

Tillmann HL, Hadem J, Leifeld L, Zachou K, Canbay A, Eisenbach C et al. Safety and efficacy of lamivudine in patients with severe acute or fulminant hepatitis B, a multicenter experience. *J Viral Hepat* 2006, 13:256-63.

Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Bain VG, Kneteman NM, Tyrrell DL. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996, 24:714–717.

Tipoe GL, Leung TM, Hung MW, Fung ML. Green tea polyphenols as an anti-oxidant and anti-inflammatory agent for cardiovascular protection. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2007, 7(2):135-44.

Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, Murata T, Ishizaki E, Isobe C. Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Annals Neurol* 1999, 46:129-131.

Trush MA and Kensle TW. An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1991,10:201-209.

Tsai SM, Lin SK, Lee KT, Hsiao JK, Huang JC, Wu SH et al. Evaluation of redox statuses in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Ann Clin Biochem* 2009, 46(Pt 5):394-400.

Tsang AH and Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1792(7):643-50.

Tsikakos D, Mitschke A, Suchy MT, Gutzki FM, Stichtenoth DO. Determination of 3-nitrotyrosine in human urine at the basal state by gas-chromatography-tandem mass spectrometry and evaluation of the excretion after oral intake. *J of Chromat B Article in Press*, 2005.

Tsikrikoni A, Kyriakou DS, Rigopoulou EI, Alexandrakis MG, Zachou K, Passam Fet al. Markers of cell activation and apoptosis in bone marrow mononuclear cells of patients with autoimmune hepatitis type 1 and primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2005, 42:393-9.

Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, Niemelä O, Parkkila S, Ylä-Herttuala S et al. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest* 1995, 96(1):620-30.

Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free radical Biology Medicine* 2002, 32:303-308.

Turrens JF and Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 1980, 191:421-427.

Uchida K, Shiraishi M, Naita Y, Torii N, Nakamura Y, Osawa T. Activation of stress signaling pathway by end product of lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1999, 274:2234-42.

Uchida K. 4-HNE: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2003, 42:318-343.

Ursini F and Bindoli A. The role of selenium peroxidase in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem Phys Lipids* 1987, 44:255-276.

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2009, 27(2):120-39.

Valerio LG and Petersen DR. Formation of liver microsomal MDA-protein adducts in mice with chronic dietary iron overload. *Toxicol Lett* 1998, 98:31-9.

Valgimigli M, Valgimigli L, Trerè D, Gaiani S, Pedulli GF, G ramantieri L, Bolondi L. Oxidative stress EPR measurement in human liver by radical-probe technique. Correlation with etiology, histology and cell proliferation *Free Radic Res* 2002, 36:939-948.

Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005, 12:1161-208.

Van der Vliet A, Hu ML, O'Neill CA, Cross CE, Halliwell B. Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem J* 1994, 303:295-301.

Van der Berc. Autoimmune hepatitis: Pathogenesis, diagnosis and treatment. *Scand J Gastroenterology* 1998, 225:66-69.

Vandeputte C, Guizon I, Genestie-Denis I, Vannier B, Lorenzon G. A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol Toxicol* 1994, 10:415-421.

Vendemiale G, Grattagliano I, Portincasa P, Serviddio G, Palasciamo G, Altomare E. Oxidative stress in symptom-free HCV carriers: relation with ALT flare-up. *Eur J Clin Invest* 2001, 31:54-63.

Vento R, D'Alessandro N, Giuliano M, Lauricella M, Carabillò M, Tesoriere G. Induction of apoptosis by arachidonic acid in human retinoblastoma Y79 cells: involvement of oxidative stress. *Exp Eye Res* 2000, 70:503-17.

Vergani D. LKM antibody: getting in some target practice. *Cut* 2000, 46:449-50.

Vergani D, Longhi MS, Bogdanos DP, Ma Y, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis. *Semin Immunopathol* 2009, 31(3):421-35.

Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biol Med* 1999, 26:202-226.

Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kouretas D. Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radic Biol Med* 2009, 47(10):1371-4.

Victor VM, Apostolova N, Herance R, Hernandez-Mijares A, Rocha M. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in atherosclerosis: mitochondria-targeted antioxidants as potential therapy. *Curr Med Chem* 2009, 16(35):4654-67.

Vidali M, Tripodi MF, Ivaldi A, Zampino R, Occhino G, Restivo L et al. Interplay between oxidative stress and hepatic steatosis in the progression of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008, 48:399–406.

Vissers MC and Winterbourn CC. Oxidative damage to fibronectin. I. The effects of the neutrophil myeloperoxidase system and HOCl. *Arch. Biochem. Biophys* 1991, 285:53–59.

Visconti R and Grieco D. New insights on oxidative stress in cancer. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2009, 12(2):240-5.

Voitkun V and Zhitkovich A. Analysis of DNA-protein crosslinking activity of malonaldehyde in vitro. *Mutat Res* 1999, 424:97-106.

Volkman M, Martin L, Bäurle A, Heid H, Strassburg CP, Trautwein C et al. Soluble liver antigen: Isolation of a 35 KOREcombinant protein (SLA-P35) specifically recognizing sera from patients with autoimmune hepatitis type 3. *Hepatology* 2001, 33:591-6.

Von Sonntag C. *The chemical Basis of Radiation Biology.* Taylor and Francis London, 1987.

Vranová E, Inzé D, Van Breusegem F. Signal transduction during oxidative stress. *J Exper Bot* 2002, 53:1227-1236.

Wagner BA, Buettner GR, Burns CP. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry* 1994, 33(15):4449-53.

Wagner BA, Buettner GR, Oberley LW et al. Myeloperoxidase is involved in H₂O₂-induced apoptosis of HL-60 human leukemia cells. *J Biol Chem* 2000, 275:22461–22469.

Waluga M, Hartleb M. Alcoholic liver disease. *Wiad Lek* 2003, 56(1-2):61-70.

Wang T and Weinman SA. Causes and consequences of mitochondrial reactive oxygen species generation in hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2006, 3:S34-7.

Wang J, Wang G, Ansari GA and Khan MF. Activation of oxidative stress-responsive signaling pathways in early splenotoxic response of aniline. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008, 230:227–234.

Wang G, Cai P, Ansari GA, Khan MF. Oxidative and nitrosative stress in trichloroethene-mediated autoimmune response. *Toxicology* 2007, 229:186–193.

Wang Y and Ho CT. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. *J Agric Food Chem* 2009, 57(18):8109-14.

Wang N, Li D, Lu NH, Yi L, Huang XW, Gao ZH. Peroxynitrite and hemoglobin-mediated nitrative/oxidative modification of human plasma protein: effects of some flavonoids. *J Asian Nat Prod Res* 2010, 12(4):257-64.

Warren KW, Athanassiades S, Monge JI. Primary sclerosis cholangitis. A study of forty-two cases. *Am J Surg* 1996, 1:1008-1009.

Warner BB, Stuart J, Gebb S and Wispe JR. Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *Am J Physiol* 1996, 271:L150–L158.

Watt BE, Proudfoot AT, Vale JA. Hydrogen peroxide poisoning. *Toxicol Rev* 2004, 23(1):51-7.

Wayner DM, Burton GW, Ingold KU. The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration-dependent. *Biochim Biophys Acta* 1986, 884:119-123.

Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 2003,33(2):105-36.

- Weisburger JH.** Tea and health: the underlying mechanisms. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999, 220: 271-275.
- Wendel A.** in “ Enzymatic Basis of Detoxification” Vol. 1, Academic Press, New York, 1980:333-353.
- Wenk J, Brenneisen P, Meewes C.** UV-Induced Oxidative Stress and Photoaging. Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology *Curr Probl Dermatol*. Basel, Karger, 2001, 29:83-94.
- Werle B, Cinquin K, Marcellin P, Pol S, Maynard M, Trépo C, Zoulim F.** Evolution of hepatitis B viral load and viral genome sequence during adefovir dipivoxil therapy. *J Viral Hepat* 2004, 11:74–83.
- Whatley SA, Curti D, Das Gupta F, Ferrier IN, Jones S, Taylor C et al.** Superoxide neuroleptics and the ubiquinone and cytochrome b5 reductase in brain and lymphocytes from normal and schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 1998, 3:227-237.
- Wheeler MD, Kono H, Yin M, Rusyn I, Froh M, Connor HD et al.** Delivery of the Cu/Zn-superoxide dismutase gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats. *Gastroenterol* 2001, 120:1241-1250.
- Whiteman M and Halliwell B.** Loss of 3-nitrotyrosine on exposure to hypochlorous acid: implications for the use of 3-nitrotyrosine as a bio-marker in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 258(1):168-72.
- Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS et al.** The novel neuromodulator H₂S: an endogenous peroxynitrate scavenger? *J Neurochem* 2004, 90:765-768.
- Wies I, Brunner S, Henninger J, Herkel J, Kanzler S, Meyer KH, Lohse AW.** Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* 2000, 355(9214):1510-15.
- Wiest R and Groszmann RJ.** The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002, 35:478-491.
- Wink DA, Cook JA, Krishna MC et al.** Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci* 1993, 90:9813-9817.

Winston GW, Harvey W, Berl L, Cederbaum AI. The generation of hydroxyl and alkoxy radicals from the interaction of ferrous bipyridyl with peroxides. *Biochem J* 1983, 216(2):415-21.

Willis MS, Klassen LW, Tuma DJ, Sorrell MF and Thiele GM. Adduction of soluble proteins with malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) induces antibody production and enhances T-cell proliferation. *Alcohol Clin Exp Res* 2002, 22:94–106.

Wong GH, Goeddel OV. The induction of manganous superoxide dismutase by TNF: possible protective mechanism. *Science* 1988, 242:941-4.

Wong GH, Elwell JH, Oberley LW and Goeddel DV. Manganese suproxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumour necrosis factor. *Cell* 1989, 58:923-931.

Wong SN and Lok AS. Tenofovir disoproxil fumarate: Role in hepatitis B treatment. *Hepatology* 2006, 44:309–313.

Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 2003, 28:32-40.

Woodside JV, McCall D, McGartland C, Young IS. Micronutrients: dietary intake v. supplement use. *Proc Nutr Soc* 2005, 64(4):543-53.

Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2000, 35: 665-672.

Wu HC, Wang Q, Yang HI, Ahsan H, Tsai WY, Wang LY et al. Urinary 15-F_{2t}-isoprostane, aflatoxin B₁ exposure and hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Carcinogenesis* 2008, 5:971-6.

Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004, 339:1-9.

Yang F, Yan S, He Y, Wang F, Song S, Guo Y et al. Expression of hepatitis B virus proteins in transgenic mice alters lipid metabolism and induces oxidative stress in the liver. *J Hepatol* 2008, 48:12-9.

Yang CS, Lambert JD, Sang S. Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols. *Arch Toxicol* 2009, 83(1):11-21.

Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, Ozcan A, Uygun A, Cakir E et al. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005, 100(4):850-5.

Yasmineh WG, Theologides A. Catalase as a roving scavenger of hydrogen peroxide: a hypothesis. *J Lab Clin Med* 1993, 122(1):110-4.

Yip WW and Burt AD. Alcoholic liver disease. *Semin Diagn Pathol* 2006, 23:149–160.

Young AJ and Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 2001, 385(1):20-7.

Zabłocka A and Janusz M. The two faces of reactive oxygen species. *Postepy Hig Med Dosw* 2008, 26:118-24.

Zachou K, Liaskos C, Christodoulou DK, Kardasi M, Papadamou G, Gatselis N et al. Anti-cardiolipin antibodies in patients with chronic viral hepatitis are independent of beta2-glycoprotein I cofactor or features of antiphospholipid syndrome. *Eur J Clin Invest* 2003, 33:161-8.

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

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

Zachou K, Liaskos C, Rigopoulou E, Gabeta S, Papamichalis P, Gatselis N et al. Presence of high avidity anticardiolipin antibodies in patients with autoimmune cholestatic liver diseases. *Clin Immunol* 2006, 119(2):203-12.

- Zamara E, Novo E, Marra F, Gentilini A, Romanelli RG, Caligiuri A et al.** 4-hydroxynonenal as a selective pro-fibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2004, 40:60–68.
- Zamocky M and Koller F.** Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophys Mol Biol* 1999, 72:19-66.
- Zarkovic N.** 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med* 2003, 24:281–291.
- Zervou EK, Dalekos GN, Boumba DS, Tsianos EV.** Value of anti-HBc screening of blood donors for prevention of HBV infection: results of a 3-year prospective study in Northwestern Greece. *Transfusion* 2001, 415:652-8.
- Zervou EK, Boumba DS, Liaskos C, Georgiadou S, Tsianos EV, Dalekos GN.** Low prevalence of HCV, HIV, and HTLV-I/II infection markers in northwestern Greece: results of a 3-year prospective donor study (1995-1997). *Eur J Intern Med* 2003, 14:39-44.
- Zervou EK, Gatselis NK, Xanthi E, Ziciadis K, Georgiadou SP, Dalekos GN.** Intrafamilial spread of hepatitis B virus infection in Greece. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2005 17:911-5.
- Zervou EK, Ziciadis K, Karabini F, Xanthi E, Chrisostomou E, Tzolou A.** Vasovagal reactions in blood donors during or immediately after blood donation. *Transfus Med* 2005, 15:389-94.
- Zhu MJ, Sun LJ, Liu YQ, Feng YL, Tong HT, Hu YH, Zhao Z.** Blood F2-isoprostanes are significantly associated with abnormalities of lipid status in rats with steatosis. *World J Gastroenterol* 2008, 14(29):4677-83.
- Zhurkin AT, Dubinima EE and Koryagin VN.** Immunological indicators and superoxide dismutase activity in the erythrocytes of patients with viral hepatitis. *Ter Arkh* 1989, 61(2): 58-60.
- Zurbay CL, Parson WW, Vance DE.** Αρχές Βιοχημείας Ι, Εκδόσεις Πασχαλίδης 2005: 205-222.

Διαμαντίδης Γ. Εισαγωγή στη Βιοχημεία. 2^η έκδοση, Θεσσαλονίκη, University studio press, 1990:41-55.

ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. (Παπαθεοδωρίδης Γ, Γερμανίδης Γ). Κατευθυντήριες οδηγίες θεραπευτικής παρεμβάσεως σε ασθενείς με λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας Β ή C. 2008.

Μουτσόπουλος ΧΜ. Αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα. Στο: Χ.Μ. Μουτσόπουλος. Αυτοανοσία - Αυτοάνοσα Ρευματικά Νοσήματα. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα 1990:11-7.

Νταλέκος Γ και Σταθάκης Ν. Νοσήματα του ήπατος, των χοληφόρων οδών και του παγκρέατος. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας, 2001.

Νταλέκος ΓΝ. Αυτοαντισώματα και αυτοαντιγόνα σχετιζόμενα με την αυτοάνοση ηπατίτιδα και την επαγόμενη από τους ιούς ηπατιτιδών αυτοάνοση απόκριση. Σημαντικά εργαλεία στην κλινική πράξη και στη μελέτη της παθογένειας των αυτοάνοσων ηπατικών παθήσεων. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 2004, 21(6):502-527.

Ντουράκης ΣΠ. Το πρόβλημα της ιικής αντίστασης στη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας Β. Αρχ Ελλ Ιατρ 2009, 26:295-306.

Τριχόπουλος Δ, Τζώνου Α, Κατσιγιάννη Κ. Βιοστατιστική. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, 2001.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: Αντιδραστήρια

ΕΤΑΙΡΙΑ	ΟΝΟΜΑ	ΤΥΠΟΣ
Fluka	Αλβουμίνη από ορό βοδιού	BSA
Sigma Aldrich	Αναγωγή της γλουταθειόνης	GR
Sigma Aldrich	Ανηγμένη γλουταθειόνη	GSH
Sigma Aldrich	Ανοσοσφαιρίνη G	IgG
Sigma Aldrich	Βήτα-νικοτινάμυδο αδένινο δινουκλεοτίδιο φωσφορικό	NADPH
Sigma Aldrich	Βινυλοπυριδένιο	2-VP
Sigma Aldrich	Βορουδρικό νάτριο	NaBH ₄
Sigma Aldrich	Βουτυλιωμένο υδροξυτολουένιο	BHT
Sigma Aldrich	Γουαϊκόλη	guaicole
Sigma Aldrich	Δεξτράνη	Dextran
Sigma Aldrich	Διθειούχο νιτροβενζοϊκό οξύ	DTNB
Sigma Aldrich	Διμέθυλο σουλφοξείδιο	DMSO
Sigma Aldrich	Διφαινυλουδραζίνη	DNPB
Sigma Aldrich	Θειοβαρβιτουρικό οξύ	2-TBA
Fluka	Κατάλαση από ορό βοδιού	CAT
HyCult Biotechnology	Κιτ 3-νιτροτυροσίνης	
Oxford	Κιτ ισοπροστανίων	
ζαφειρόπουλος	Κιτ κρεατινίνης	
ζαφειρόπουλος	Κιτ μέτρησης πρωτεϊνών	
Sigma Aldrich	Κυτιλικό βρωμιούχο τριμέθυλοαμμώνιο	CTAB
Sigma Aldrich	Μυελουπεροξειδάση	MPO
Sigma Aldrich	Ξανθίνη	
Sigma Aldrich	Οξειδάση της ξανθίνης	XO
Fluka	Οξειδωμένη γλουταθειόνη	GSSG
Riedel de Haen	Οξικό νάτριο	CH ₃ COONa
Fluka	Οξικός αιθυλεστέρας	
Sigma Aldrich	Τετρααίθοξυπροπάνιο	TEP
Sigma Aldrich	Τετραμέθοξυπροπάνιο	TMP
Sigma Aldrich	Τετραμέθυλο βενζιδίνη	TMB
Riedel de Haen	Τριχλωροοξικό οξύ	TCA
Sigma Aldrich	Υδροξείδιο του καλίου	KOH
Sigma Aldrich	Υδροξείδιο του νατρίου	NaOH
Fluka	Υδροχλωρική γουανιδίνη	GmHCl
Sigma Aldrich	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	GPx
Riedel de Haen	Υπεροξείδιο του υδρογόνου	H ₂ O ₂ 35%
Sigma Aldrich	Υποχλωριώδες νάτριο	NaOCl
Sigma Aldrich	Φωσφορικό νάτριο	Na ₂ HPO ₄
Riedel de Haen	Φωσφορικό οξύ	H ₃ PO ₄

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ: Πρότυπες καμπύλες

