



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση

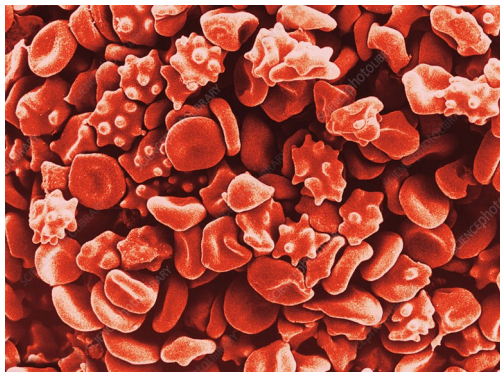


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ακεραιότητα ερυθροκυττάρων και κυστιδιοποίηση σε
ασθενείς με ηπατική νόσο**

POST GRADUATE THESIS

Erythrocyte integrity and vesiculation in patients with liver disease



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Ιωάννης Ηρακλής Σιάνης
Ioannis Iraklis Sianis

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Αλκμήνη Αναστασιάδη
Alkmini Anastasiadi

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

Erythrocyte integrity and vesiculation in patients with liver disease

IOANNIS IRAKLIS SIANIS

22030

dml22030@uniwa.gr

FIRST SUPERVISOR

Alkmini Anastasiadi

SECOND SUPERVISOR

Anastasios Kriebardis

AIGALEO 2024

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 01/10/2024

Ονόματα εξεταστών

Υπογραφή

1^{ος} Εξεταστής Αλκμήνη Αναστασιάδη



2^{ος} Εξεταστής Αναστάσιος Κριεμπάρδης

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Ιωάννης Ηρακλής Σιάνης του Νικολάου, με αριθμό μητρώου 22030 φοιτητής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών

Ιωάννης Ηρακλής Σιάνης

*Σιάνης,
Γεώργιος - Ηρακλής*

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας τους καθηγητές που με καθοδήγησαν σε αυτή τη πτυχιακή εργασία, κυρία Αλκμήνη Αναστασιάδη και κύριο Αναστάσιο Κριεμπάρδη καθώς και όλους τους συνεργάτες μου στο εργαστήριο που χωρίς τη βοήθειά τους δε θα υπήρχε αυτή η εργασία.

Αφιερώσεις

Αφιερώνω την διπλωματική μου εργασία στην οικογένειά μου και ιδιαίτερα στους γονείς μου και στους κοντινούς μου ανθρώπους

Περίληψη

Εισαγωγή: Η εργασία αυτή μελετάει τις επιπτώσεις που έχει η ηπατική νόσος η οποία έχει προκύψει κυρίως από αλκοόλ, στην ακεραιότητα των ερυθροκυττάρων καθώς και στην κυστιδιοποίηση που πραγματοποιείται στα κύτταρα. Εξετάζει την αντοχή των ερυθροκυττάρων σε διάφορες μορφές πίεσης που μπορούν να τα λύσουν και μιλάει για τις αλλαγές που επιφέρει η ηπατική νόσος στα μικροκυτίδια του οργανισμού.

Σκοπός: Μελέτη της ακεραιότητας των ερυθροκυττάρων και της κυστιδιοποίησης σε ασθενείς με ηπατική νόσο.

Μέθοδος: Έλεγχος, σε ασθενείς με ηπατική νόσο, της ακεραιότητας των ερυθροκυττάρων με μεθόδους αιμόλυσης, οσμωτικής ευθραυστότητας, οξειδωτικής ευθραυστότητας, μηχανικής ευθραυστότητας, κρυσταλλοποίησης και έλεγχος μη φυσιολογικών ερυθροκυτταρικών μορφών και μέση διάμετρο ερυθροκυττάρων με τη χρήση μικροσκοπίου.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε $4\% \pm 3\%$ αιμόλυση στους μάρτυρες και $13\% \pm 10\%$ στους ασθενείς με ηπατοπάθεια με στατιστική σημασία $p < 0,05$. Στην οσμωτική αιμόλυση, οι μάρτυρες εμφάνισαν $41\% \text{ g/L NaCl}$ για $50\% \text{ αιμόλυση} \pm 2\% \text{ g/L NaCl}$ σε σύγκριση με τους ασθενείς με ηπατοπάθεια που έδειξαν $34\% \text{ g/L NaCl}$ για $50\% \text{ αιμόλυση} \pm 2\% \text{ g/L NaCl}$ με στατιστική σημασία $p < 0,05$. Στην μηχανική αιμόλυση, οι μάρτυρες εμφάνισαν $71\% \pm 14\%$ αιμόλυση σε σύγκριση με τους ασθενείς με ηπατοπάθεια που εμφάνισαν $48\% \pm 8\%$ με στατιστική τάση $0,05 < p < 0,1$. Στην οξειδωτική αιμόλυση, οι μάρτυρες εμφάνισαν $2,63 \text{ mg Hb/dL} \pm 0,93 \text{ mg Hb/dL}$ σε αντίθεση με τους ασθενείς με ηπατοπάθεια που εμφάνισαν $5,10 \text{ mg Hb/dL} \pm 4,28 \text{ mg Hb/dL}$. Στην κρυσταλλοποίηση, οι μάρτυρες είχαν $17\% \pm 14\%$ αιμόλυση σε σύγκριση με τους ασθενείς με ηπατοπάθεια που εμφάνισαν $13\% \pm 11\%$. Οι μάρτυρες είχαν $2,9$ παθολογικές μορφές ανά 100 ερυθροκύτταρα $\pm 2,3$ παθολογικές μορφές σε σύγκριση με τους ασθενείς με ηπατοπάθεια που είχαν $9,39$ παθολογικές μορφές ανά 100 ερυθροκύτταρα $\pm 7,30$ παθολογικές μορφές. Υπάρχει στατιστική σημασία ($p < 0,05$) στις τιμές των παθολογικών μορφών των ερυθροκυττάρων μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατοπάθεια. Η μέση διάμετρος των ερυθροκυττάρων βρέθηκε να είναι $7,20 \mu\text{m} \pm 0,5 \mu\text{m}$ στους μάρτυρες σε σύγκριση με τους ασθενείς με ηπατοπάθεια που βρέθηκε $7,50 \mu\text{m} \pm 0,63 \mu\text{m}$.

Συμπεράσματα: Τα δείγματα έχουν υψηλό επίπεδο αιμόλυσης χωρίς να ευθύνεται η ευθραυστότητά τους στη μηχανική λύση ή στη λύση λόγω ψύχους. Ενδέχεται να ευθύνεται η λύση λόγω οξειδωτικού στρες ή κάποια λύση ανοσολογικής φύσεως αλλά λόγω του χαμη-

λού αριθμού δειγμάτων μας, δεν μπορούμε να είμαστε βέβαιοι. Επιπλέον παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός παθολογικών μορφών στα ερυθροκύτταρα χωρίς όμως αύξηση στη μέση διάμετρο των κυττάρων.

Λέξεις κλειδιά:

Ερυθροκύτταρα, αιμόλυση, ηπατική νόσος, αλκοολική ηπατική νόσος, κυστιδιοποίηση, μικροκυστίδια

Abstract

Introduction: This work studies the effects of liver disease, which has resulted mainly from alcohol, on the integrity of the erythrocytes as well as on the vesiculation that takes place in the cells. It examines the resistance of erythrocytes to various forms of stress that can break them down and talks about the changes that liver disease brings about in the body's microvesicles.

Purpose: Study of erythrocyte integrity and cystization in patients with liver disease.

Method: Testing, in patients with liver disease, the integrity of erythrocytes by methods of hemolysis, osmotic fragility, oxidative fragility, mechanical fragility, cryohemolysis and testing for abnormal erythrocyte forms and mean erythrocyte diameter using a microscope.

Results: $4\% \pm 3\%$ hemolysis was observed in controls and $13\% \pm 10\%$ in patients with liver disease with statistical significance of $p < 0.05$. In osmotic hemolysis, controls showed 41% g/L NaCl for 50% hemolysis $\pm 2\%$ g/L NaCl compared to patients with liver disease who showed 34% g/L NaCl for 50% hemolysis $\pm 2\%$ g/L NaCl with statistical significance $p < 0.05$. In mechanical hemolysis, controls experienced $71\% \pm 14\%$ of hemolysis compared to patients with liver disease who experienced $48\% \pm 8\%$ with a statistical trend $0.05 < p < 0.1$. In oxidative hemolysis, controls showed $2.63 \text{ mg Hb/dL} \pm 0.93 \text{ mg Hb/dL}$ in contrast to patients with liver disease who showed $5.10 \text{ mg Hb/dL} \pm 4.28 \text{ mg Hb/dL}$. In cryohemolysis, controls had $17\% \pm 14\%$ of hemolysis compared to patients with liver disease who had $13\% \pm 11\%$. Controls had 2.9 abnormalities per 100 erythrocytes ± 2.3 abnormalities compared to patients with liver disease who had 9.39 abnormalities per 100 erythrocytes ± 7.30 pathological forms. There is statistical significance ($p < 0.05$) in the values of pathological forms of erythrocytes between controls and patients with liver disease. The mean erythrocyte diameter of the controls was found to be $7.20 \mu\text{m} \pm 0.5 \mu\text{m}$ compared to the patients with liver disease which was found to be $7.50 \mu\text{m} \pm 0.63 \mu\text{m}$.

Discussion: Specimens have a high level of hemolysis regardless of mechanical or cold lysis fragility. It is possible that the solution due to oxidative stress or some immune solution is responsible but due to our low number of samples, we cannot be sure. In addition, an increased number of pathological forms was observed in the erythrocytes, but without an increase in the mean diameter of the cells.

Key words: Erythrocytes, hemolysis, liver disease, alcoholic liver disease, vesiculation, microvesicles

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	iv
Ευχαριστίες.....	v
Αφιερώσεις.....	vi
Περίληψη.....	vii
Abstract.....	ix
Συνοτομογραφίες.....	xii
Πρόλογος.....	1
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή.....	3
1.1.1 Φυσιολογικές λειτουργίες ήπατος.....	3
1.1.2 Παθοφυσιολογία ήπατος και μη αλκοολικές ασθένειες.....	3
1.1.3 Παθολογική λειτουργία ήπατος λόγω χρήσης αλκοόλ.....	13
1.2.1 Ήπαρ και ερυθροκύτταρα.....	15
1.2.2 Βλάβες στα ερυθροκύτταρα από τη χρήση αλκοόλ.....	17
1.3.1 Χαρακτηριστικά μικροκυστιδίων.....	18
1.3.2 Φυσιολογικά μικροκυστίδια ερυθροκυττάρων και λειτουργίες τους.....	21
1.3.3 Αλλαγές τους από τη χρήση αλκοόλ και την ηπατική ανεπάρκεια.....	27
Κεφάλαιο 2. Υλικά και μέθοδοι.....	30
2.1 Υλικά.....	30
2.2 Μέθοδοι.....	31
Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα.....	34
Κεφάλαιο 4. Συζήτηση.....	38
Κεφάλαιο 5. Βιβλιογραφία.....	40
Περιεχόμενα Εικόνων.....	43

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
ADH	Alcohol dehydrogenases	Αλκοολική αφυδρογονάση
NAD ⁺ / NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide	Δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης
NADP / NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης
ALDH	Aldehyde dehydrogenases	Αφυδρογονάση της αλδεΐδης
PGE2	Prostaglandin E2	Προσταγλανδίνη E2
SIAM	Swift Increase in Alcohol Metabolism	Ταχεία αύξηση του μεταβολισμού του αλκοόλ
RNA	ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
miRNA	Micro ribonucleic acid	Μίκρο-ριβονουκλεϊκό οξύ
EDTA	(Ethane-1,2-diyldinitrilo)tetraacetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

Πρόλογος

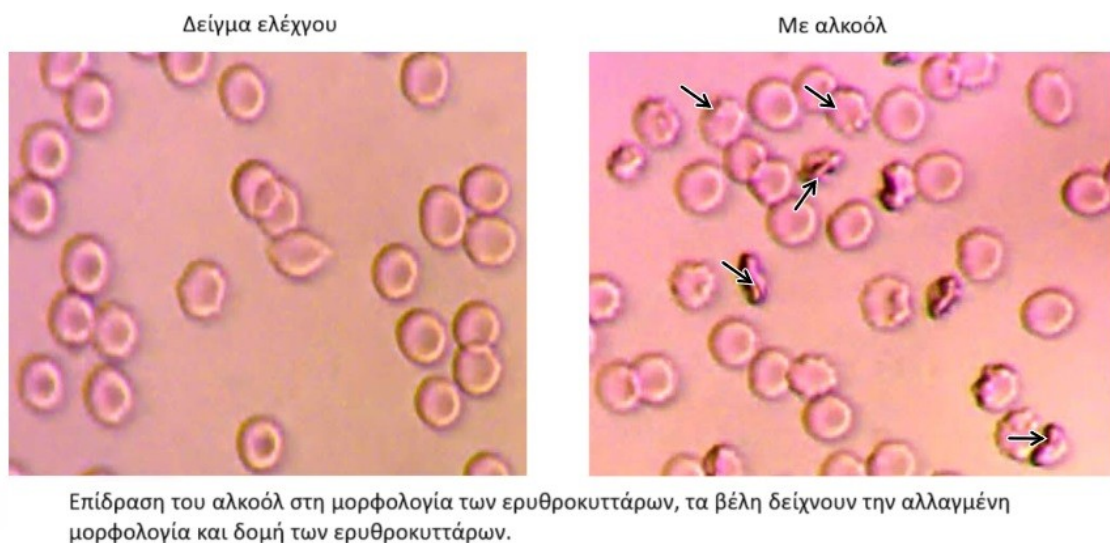
Το ήπαρ είναι υπεύθυνο για μεγάλο μέρος των λειτουργιών του ανθρώπου. Οι δράσεις του είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού και η απουσία τους μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες. Στη σύγχρονη εποχή όμως συναντάμε πολλές ασθένειες για αυτό το χρήσιμο όργανο. Ο νέος τρόπος ζωής, σε συνδυασμό με το αλκοόλ, οδηγούν στην αύξηση των ηπατικών νόσων (1,2). Στις Η.Π.Α., το αλκοόλ, λαμβάνει μέρος στο 46% των θανάτων από ηπατική βλάβη (3). Συγκεκριμένα στην Ευρώπη, όπου η κατανάλωση του αλκοόλ είναι μεγαλύτερη από τον υπόλοιπο κόσμο, το 46% των θανάτων από βλάβη στο ήπαρ οφειλόταν σε αίτιο που δε μπορούσε να προσδιοριστεί ενώ το 40% οφειλόταν σε βλάβη από την υπερκατανάλωση του αλκοόλ. Υπάρχει ενδεχόμενο αυτό το ποσοστό των απροσδιόριστων θανάτων να οφείλεται στο αλκοόλ αλλά να μην μπορεί να αποδειχθεί (4).

Το ήπαρ είναι το όργανο που είναι υπεύθυνο για τον μεταβολισμό του αλκοόλ στον οργανισμό. Τα ηπατοκύτταρα παράγουν τα απαραίτητα ένζυμα για τον μεταβολισμό του αλκοόλ, όμως το αποτέλεσμα αυτού του μεταβολισμού είναι η ιδιαίτερα τοξική ακεταλδεΐδη. Αν και ο χρόνος ζωής της μέσα στον οργανισμό είναι σύντομος, σε χρόνιες χρήσεις μπορεί να προκαλέσει προβλήματα καθώς προσδένεται σε πρωτεΐνες αλλάζοντας τους την λειτουργία (1,2). Επομένως εμφανίζεται η ανάγκη για εύρεση νέων δεδομένων και πληροφοριών ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες στο να βρίσκονται και να θεραπεύονται αυτές τις ασθένειες. Αυτή η μελέτη παρατηρεί τις μεταβολές που έχουν δημιουργηθεί στην ακεραιότητα των ερυθροκυττάρων και στην κυστιδιοποίηση των κυττάρων από δείγματα ασθενών που έχουν ηπατική νόσο λόγω χρήσης αλκοόλ.

Εξετάζοντας τη δομή των ερυθροκυττάρων σε ασθενείς με χρόνια χρήση αλκοόλ, αναμένεται να φανούν τα αποτελέσματα αυτής της χρήσης, διότι η λειτουργικότητα του ήπατος τους είναι μειωμένη. Αυτό οφείλεται στο ότι η δομή της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων επηρεάζεται από τη παρουσία της αιθανόλης του αλκοόλ που δεν έχει καταφέρει να μεταβολίσει ο οργανισμός. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνει την ακεραιότητα των ερυθροκυττάρων και τη λειτουργικότητά τους, καθιστώντας τα πιο αδύναμα στη λύση (5). Όμως η μεμβράνη των ερυθροκυττάρων δεν είναι η μόνη που αποδυναμώνεται από τη παρουσία του αλκοόλ στον οργανισμό. Σχεδόν

όλες οι μεμβράνες του οργανισμού, που έρχονται σε επαφή με το αλκοόλ, χάνουν την ακεραιότητα της δομής τους, είτε βρίσκονται μέσα είτε έξω από το κύτταρο (6).

Τα μικροκυστίδια είναι σωματίδια τα οποία αποβάλλονται τόσο από φυσιολογικά όσο και από κύτταρα με κάποια ασθένεια και αποτελούνται από κυτταρική μεμβράνη που φέρει στο εσωτερικό της στοιχεία του κυττάρου (7). Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες αναλόγως με το μέγεθός τους, σε εκείνα μικρού και σε μεγάλου μεγέθους. Τα μικρού μεγέθους μικροκυστίδια είναι μεταξύ 40nm και 200nm ενώ τα μεγάλα μεταξύ 100 nm και 1000nm. Κατά τη διάρκεια βλαβών του ήπατος, όπως και σε φυσιολογικές συνθήκες, τα κύτταρα του ήπατος αποβάλλουν τέτοια μικροκυστίδια. Όμως σε αντίθεση με τα φυσιολογικά μικροκυστίδια, αυτά φέρουν φορτίο αναλόγως τη βλάβη που έχουν αυτά τα κύτταρα από τα οποία προήλθαν (8). Μελετώντας λοιπόν αυτά τα μικροκυστίδια θα πρέπει να ληφθούν πληροφορίες για το τύπο και την έκταση της ηπατικής βλάβης που έχει ο ασθενής.



Εικόνα 1: (Μεταφρασμένο) Ερυθροκύτταρα σε απουσία και παρουσία αλκοόλ. Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5281527/>

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

1.1.1 Φυσιολογικές λειτουργίες ήπατος

Το ήπαρ, αν και μόλις περίπου το 2% του ανθρώπινου οργανισμού, παίζει καίριους ρόλους στον μεταβολισμό, στην άμυνα του οργανισμού, στην διάλυση τοξικών ουσιών και λειτουργεί ως αποθήκη, πολύτιμων για τον οργανισμό, βιταμινών. Μία από αυτές τις τοξικές ουσίες είναι και το αλκοόλ. Τριχοειδή αγγεία μεταφέρουν το αίμα που κουβαλάει το αλκοόλ και μέσω λαχνών, έρχεται σε επαφή με τα ηπατοκύτταρα που είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό του. Εκείνα το μεταβολίζουν σε ακεταλδεΐδη, κυρίως μέσα στα κυτοσόλια το οποίο έχει τα απαραίτητα ένζυμα. Όσο μεγαλύτερη η επαφή του ήπατος με το αλκοόλ, τόσο μεγαλύτερη και η ζημιά που θα δεχτεί. Η συσσώρευση της τοξικής ακεταλδεΐδης οδηγεί σε βλάβη στο ήπαρ σε κυτταρικό επίπεδο και αν υπάρχει παρατεταμένη τέτοια βλάβη, ακολουθεί κίρρωση του ήπατος. Σε αυτή τη κατάσταση, το ήπαρ δε λειτουργεί σωστά με αποτέλεσμα να μην μεταβολίζει τις ουσίες που πρέπει αλλά ούτε να παράγει τα απαραίτητα ένζυμα. Με άλλα λόγια, όλες τους οι λειτουργίες υστερούν και το όργανο σιγά σιγά καταρρέει (9).

1.1.2 Παθοφυσιολογία ήπατος και μη αλκοολικές ασθένειες

Η αλκοολική ηπατική νόσος, όπως και η μη αλκοολική ηπατική νόσος, επιδεινώνεται από την ύπαρξη λίπους στο ήπαρ. Οι οδοί που είναι υπεύθυνες για την συγκέντρωση λίπους στο ήπαρ βασίζονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων για να τα καταφέρουν. Το αλκοόλ, όπως και η ακεταλδεΐδη, δε χρησιμεύουν στη σύνθεση λιπιδίων, παρόλα αυτά η παρουσία τους, συνεισφέρει στη συγκέντρωσή του στο ήπαρ. Αυτό οφείλεται στο ότι η παρατεταμένη συγκέντρωσή τους στο ήπαρ, επηρεάζει τις μεταβολικές οδούς που μεταβολίζουν τα λιπίδια. Η οξείδωση της αλκοόλης χρειάζεται NAD και NADH. Με αυτό το τρόπο υπάρχει διαταραχή στο δυναμικό οξειδοαναγωγής των NAD⁺ και NADH καταστέλλοντας έτσι της οξείδωσης των μιτοχονδριακών λιπαρών οξέων που έχει σαν αποτέλεσμα να προάγει την λιπογένεση. Επίσης, το αλκοόλ, δεσμεύει έμμεσα έναν κύριο ρυθμιστή των λιπογονικών γονιδίων με την αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης 1c (SREBP-1c). Επιπλέον, υποβαθμίζει την έκφραση του γονιδίου PPARα που ενισχύει την οξείδωση των λιπαρών οξέων (10).

Μικρό ποσοστό από εκείνους που πίνουν βαριά, αναπτύσσουν αλκοολική ηπατίτιδα. Αν όμως στο ήπαρ υπάρξει παρατεταμένη έκθεση σε αλκοόλ, τότε είναι πιθανό να

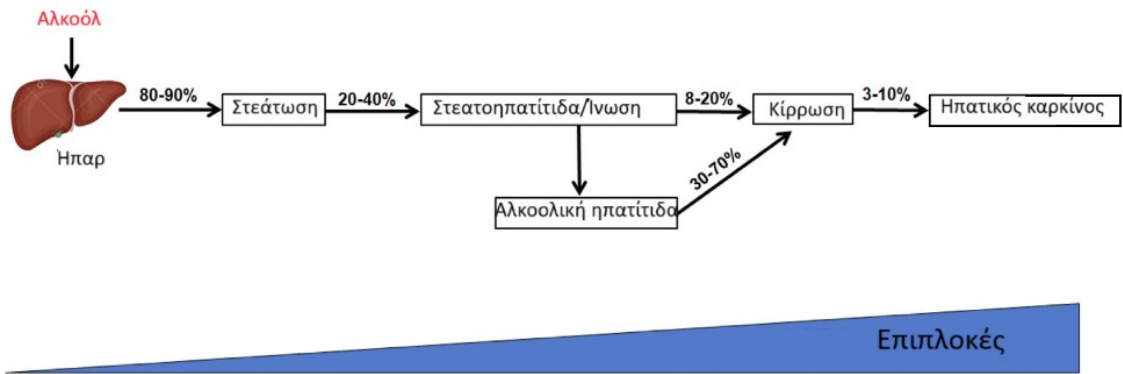
προκληθεί φλεγμονώδη απόκριση, συσσώρευση ελεύθερων ριζών ROS και βλάβη των ηπατοκυττάρων. Ακόλουθο όλων αυτών μπορεί να είναι η αλκοολική στεατοηπατίτιδα η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση, κίρρωση μέχρι και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (10). Αλκοολική ηπατική νόσο με προοδευτική ίνωση και κίρρωση δεν αναπτύσσεται σε όλους όσους πίνουν μεγάλες ποσότητες αλκοόλ. Αυτό μας δείχνει πως υπάρχουν και κάποιοι άλλοι παράγοντες που συνεισφέρουν στην ανάπτυξη αυτής της περίπλοκης νόσου. Οι παράγοντες χωρίζονται σε περιβαλλοντικούς ή αλλιώς εξωγενείς και στους τροποποιητές της νόσου του ξενιστή ή αλλιώς εγγενείς (11).

Όσο εξελίσσεται η αλκοολική ηπατική νόσος, μπορεί να εμφανίσει στεατοηπατίτιδα αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο για κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα χαρακτηριστικά αυτής της στεατοηπατίτιδας είναι η στεάτωση, τα ηπατικά κύτταρα να παρουσιάζουν μπαλόνια που περιέχουν σώματα Mallory-Denk, σκληρυντική υαλική νέκρωση και λοβιακή φλεγμονή κυριαρχούμενη από ουδετερόφιλα. Τα ουδετερόφιλα δεν εμφανίζονται εύκολα σε μη αλκοολικό λιπώδες ήπαρ. Επιπλέον, λόγω του φλεγμονώδους περιβάλλοντος, γίνεται διήθηση λευκοκυττάρων, σχηματισμός ενεργών ενώσεων οξυγόνου (ROS) και τραυματισμός των ηπατοκυττάρων. Ο τραυματισμός των ηπατοκυττάρων έχει σαν αντίδραση την απελευθέρωση μοριακών μοτίβων που σχετίζονται με βλάβη (DAMPs). Έτσι ενεργοποιούνται διάφορες ανοσολογικές αντιδράσεις και προάγεται η ηπατική ίνωση ή η κακοήθεια. Πρόβλημα αποτελεί το ότι η ήπια στεατοηπατίτιδα δεν εμφανίζει συχνά κλινικά συμπτώματα και μπορεί να διαγνωστεί μόνο με βιοψία ήπατος, ενισχύοντας έτσι την ανάγκη εύρεσης νέων, μη επεμβατικών, μεθόδων εντοπισμού της (12).

Η ηπατική ίνωση είναι ένα από τους κύριους παράγοντες θνησιμότητας και νοσηρότητας σε ασθενείς με ηπατική αλκοολική νόσο. Σε ίνωση μπορεί να οδηγηθεί εύκολα κάποιος ασθενής με αλκοολική ηπατίτιδα (10). Η αλκοολική ηπατίτιδα χαρακτηρίζεται από εμφάνιση ίκτερου. Τα συμπτώματα μπορούν να εμφανιστούν ακόμα και μερικές βδομάδες αφού έχει σταματήσει ο ασθενής τη κατάχρηση αλκοόλ (13). Έχει υψηλό βαθμό βραχυπρόθεσμης θνησιμότητας καθώς χαρακτηρίζεται από σοβαρή στεατοηπατίτιδα. Επίσης χαρακτηρίζεται από μεγαμιτοχόνδρια και χολόσταση αλλά και παρουσία ικτέρου ο οποίος μπορεί να συνυπάρχει και με άλλα ηπατικά προβλήματα, όπως π.χ. ασκίτη ή ηπατική εγκεφαλοπάθεια, ή ακόμα και μόνος του. Οι ασθενείς με αλκοολική ηπατίτιδα παρουσιάζουν πιο εμφανής δυσλειτουργίες του ανοσοποιητικού από εκείνους που έχουν μη αλκοολική ηπατική νόσο. Αυτό οδηγεί σε αύξηση του κινδύνου για

ουδετεροφιλία, ηπατική δυσλειτουργία και πολυοργανική ανεπάρκεια. Ακόμα και αν κάποιος ασθενής κάνει πλήρη αποχή από το αλκοόλ, μπορεί να παρουσιάσει επίμονη αλκοολική ηπατίτιδα με κίνδυνο κίρρωσης (12). Παράλληλα με τον ίκτερο, μπορούν να εμφανιστούν και άλλα συμπτώματα όπως πυρετός, κακουχία, απώλεια βάρους και υποσιτισμός. Πέρα από την αλκοολική ηπατοπάθεια, τα συμπτώματα μπορούν να προκληθούν και από σήψη, ιογενή ηπατίτιδα ή ηπατική βλάβη που προκλήθηκε από φάρμακα (13).

Η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ οδηγεί σε ηπατική φλεγμονή με ηπατοκυτταρικές βλάβες και φλεγμονώδεις διηθήσεις, κυρίως πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων. Αντίστοιχα, η αλκοολική στεατοηπατίτιδα εμφανίζει μπαλονάκι των ηπατοκυττάρων και το σώμα Mallory-Denk. Αυτά τα χαρακτηριστικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σαν δείκτες για τον βαθμό και τη σοβαρότητα της εξέλιξης της αλκοολικής ηπατικής νόσου. Η εμφάνιση ίνωσης μπορεί να γίνει σε άτομα που καταναλώνουν επίμονα αλκοόλ ενώ έχουν αλκοολική στεατοηπατοπάθεια καθώς ο οργανισμός προσπαθεί να επουλώσει τα τραύματα που έχει δεχτεί το ήπαρ λόγω της χρόνιας φλεγμονής και της ηπατοκυτταρικής βλάβης. Η ίνωση αποτελεί προϋπόθεση για την ανάπτυξη κίρρωσης. Κατά την ίνωση, πραγματοποιείται συσσώρευση εξωκυτταρικής μήτρας γύρω από τις περικεντρικές και περιηχοειδείς περιοχές (10). Η συνεχή χρήση αλκοόλ από ασθενείς με αλκοολική ηπατική νόσο δημιουργεί πολλά προβλήματα στον οργανισμό. Τα μέσα επιδιόρθωσης του DNA αδρανοποιούνται, τα μιτοχόνδρια των ηπατοκυττάρων βλάπτονται, η χρήση του οξυγόνου επηρεάζεται και αυξάνεται η πιθανότητα για ηπατική ίνωση (12).



Εικόνα 2: (Μεταφρασμένο) Η μεγάλη κατανάλωση αλκοόλ προκαλεί ένα ευρύ φάσμα ηπατικών βλαβών. Η στεαάτωση (λιπώδες ήπαρ) είναι η πιο πρώιμη, πιο κοινή απόκριση που αναπτύσσεται σε περισσότερο από το 90 τοις εκατό των προβληματικών πότων που καταναλώνουν 4 έως 5 ποτά την ημέρα. Με τη συνεχή κατανάλωση αλκοόλ, η ηπατική νόσος που σχετίζεται με το αλκοόλ (ALD) μπορεί να εξελιχθεί σε φλεγμονή του ήπατος (δηλαδή στεατοηπατίτιδα), ίνωση, κίρρωση και καρκίνο του ήπατος (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα). Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9630031/>

Άλλο ένα πρόβλημα της κατανάλωσης αλκοόλ είναι όταν η αιθανόλη μεταβολίζεται, παράγεται ROS μέσα από τις αντιδράσεις. Αν ο μεταβολισμός γίνει συνεχόμενος, τότε τα επίπεδα του ROS αυξάνονται υπερβολικά, καταστρέφοντας τη γλουταθειόνη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να εκτραπεί η αντίδραση για τη παραγωγή μεθειονίνης και S-αδενοσυλμεθειονίνης (SAM) και πλέον να μην δίνονται μεθύλια για τη μεθυλίωση του DNA. Όταν το DNA δεν μεθυλιωθεί σε κατάλληλα επίπεδα, διευκολύνεται ο πολλαπλασιασμός των ηπατοκυττάρων και κατά επέκταση η ογκογένεση. Ακόμα, αν τα ηπατοκύτταρα έχουν χαμηλά επίπεδα NAD⁺, τότε δεν πραγματοποιείται ικανοποιητική ακετυλίωση της ιστονής. Το αποτέλεσμα αυτού είναι η δημιουργία προβλήματος στην οδό Sirtuin 1 (SIRT1)–AMPK της οποίας η δουλειά είναι να μεταβολίζει τα λιπίδια. Έτσι το ήπαρ γίνεται λιπώδες και με προχωρημένο σχηματισμό ίνωσης. Στις γυναίκες παρατηρείται μια ευαισθησία απέναντι στην αλκοολική ηπατική βλάβη σε σχέση με τους άντρες για την ίδια ποσότητα αλκοόλης. Ο λόγος αυτής της ευαισθησίας είναι η χαμηλότερη δραστηριότητα της διουρητικής ορμόνης, η υψηλότερη σύνθεση σωματικού λίπους που παρατηρείται στις γυναίκες καθώς και η φλεγμονώδης απόκριση που πραγματοποιείται από τα οιστρογόνα (12).

Κάποιοι γενετικοί τόποι έχουν εντοπιστεί ότι προάγουν την αλκοολική ηπατική νόσο. Ένας τέτοιος τόπος είναι το γονίδιο 3 που περιέχει τον κύριο παράγοντα για την εξέλιξη της νόσου, την περιοχή φωσφαλιπάσης τύπου πατατίνης. Άλλοι τόποι, που είναι

μικρότερου βαθμού επικινδυνότητας, είναι το μέλος 2 της υπεροικογένειας 6 της διαμεμβράνης καθώς και ο τομέας Οακυλοτρανσφεράσης που συνδέεται με τη μεμβράνη που περιέχουν την πρωτεΐνη 7 (12). Γενετικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη αλκοολικής ηπατικής νόσου καθώς σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε δίδυμα αδέρφια, τα μονοζυγωτικά δίδυμα εμφάνισαν πιο μεγάλο κίνδυνο κίρρωσης από ότι τα διζυγωτικά. Επιπλέον, και το φύλο παίζει ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου καθώς οι γυναίκες είναι πιο εύκολο να αναπτύξουν κίρρωση. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι οι γυναίκες έχουν ορμονικές επιδράσεις στο οξειδωτικό στρες και στη φλεγμονή, έχουν κάποιες διαφορές στην έκφραση των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό του αλκοόλ καθώς και μικρότερο όγκο για να κατανεμηθεί το αλκοόλ. Υπάρχουν και γενετικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της αλκοολικής ηπατικής νόσου και της κίρρωσης. Μια τέτοια παραλλαγή γίνεται στο γονίδιο που κωδικοποιεί το PNPLA3 rs738409 το οποίο ρυθμίζει την εξέλιξη της στεάτωσης, της νεκροφλεγμονής, της ίνωσης και του ηπατοκυτταρικού καρκίνου στους αλκοολικούς. Ακόμα, ο δεσμευμένος στη μεμβράνη MBOAT7 και ο διαμεμβρανικός TM6SF2 τόπος φαίνεται πως επηρεάζουν και αυτοί καθώς ο PNPLA3 όσο και το TM6SF2 παγιδεύουν ηπατικά λιπίδια ενώ το MBOAT7 μεσολαβεί στην μεταφορά λιπαρού οξέος μεταξύ φωσφολιπιδίων και λυσοφωσφολιπιδίων (11).

Για να εμφανίσει συμπτώματα η ηπατική αλκοολική νόσος, συνήθως πρέπει να φτάσει σε μέτρια ή προχωρημένα στάδια. Ένας τρόπος ώστε να εντοπιστεί στα πρώιμα στάδια είναι με το να μετρηθούν τα επίπεδα αμινοτρανσφερασών στα δείγματα αίματος. Αν τα επίπεδα εντοπιστούν 5 με 8 φορές υψηλότερα από το φυσιολογικό, τότε υπάρχει μεγάλη πιθανότητα για ύπαρξη ηπατικής αλκοολικής νόσου σε πρώιμο στάδιο. Επίσης μετράται και η αναλογία της τρανσφεράσης ασπαρτίνης προς την τρανσφεράση της αλανίνης η οποία παρατηρείται να είναι πάνω από 2 σε ασθενείς με ηπατική αλκοολική νόσο. Το πρόβλημα με αυτή την εξέταση όμως είναι ότι σε ασθενείς με κίρρωση, τα αποτελέσματα της αναλογίας δεν είναι αξιόπιστα. Ακόμα ένας δείκτης για την αλκοολική ηπατική νόσο είναι η γ-γλουταμυλ-τρανπεπτιδάση (GGT) γιατί αποτελεί βιοδείκτη για τη φλεγμονή λιπώδους ήπατος μετά από αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ. Ένα μειονέκτημα που έχει όμως είναι ότι μπορεί να βρεθεί αυξημένη και σε ασθενείς με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος, χολαστική ηπατική νόσο, ηπατική βλάβη που προκλήθηκε από φάρμακα αλλά ακόμα και σε καρδιακή ανεπάρκεια. Ενδεχομένως, μια καλύτερη επιλογή αντί της γ-

γλουταμυλ-τρανπεπτιδάση (GGT) είναι τα επίπεδα ορού της διασπασμένης από κασπάση κυτοκερατίνης 18 (CK18Asp396) λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας τους. Για να μετρηθεί η εξέλιξη της αλκοολικής ηπατικής νόσου, είναι απαραίτητο να μετρηθεί η ίνωση του ήπατος. Το επίπεδο της ηπατικής ακαμψίας είναι ανάλογο των επιπέδων της ίνωσης. Για τη μέτρηση της ίνωσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι μέθοδοι της Fibrotest και Enhanced Liver Fibrosis (ELF) (10).

Για να διαγνωστεί αλκοολικό λιπώδες ήπαρ σε έναν άνθρωπο που κάνει κατάχρηση αλκοόλ, θα πρέπει να τηρούνται κάποιες προϋποθέσεις. Θα πρέπει να μπορεί να εντοπιστεί ηπατική στεάτωση η οποία εντοπίζεται στον υπέρηχο ενώ παράλληλα έχει αυξημένα ηπατικά ένζυμα, χωρίς όμως να υπάρχει άλλη ηπατική νόσο που θα μπορούσε να προκαλέσει αυτά. Το αλκοολικό λιπώδες ήπαρ έχει αρκετούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν, άμεσα ή έμμεσα, την ανάπτυξή του. Μια δυσκολία που υπάρχει για το αλκοολικό λιπώδες ήπαρ είναι ότι είναι δύσκολο να διαγνωστεί λόγω των ασυμπτωματικών και μη ειδικών συμπτωμάτων του (12).

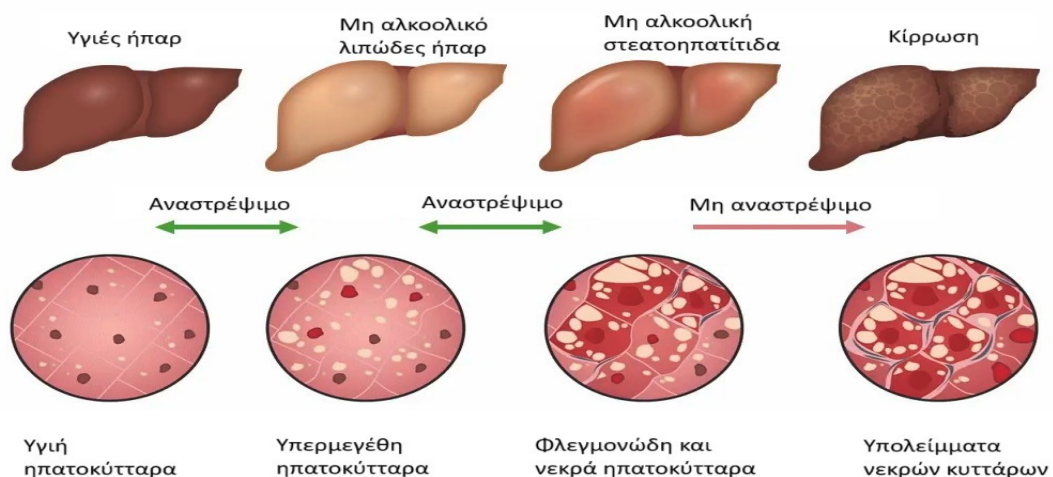
Η παχυσαρκία είναι ένας από τους πιο κύριους περιβαλλοντικούς παράγοντες για την ανάπτυξη αλκοολικής ηπατικής νόσου. Μπορεί να επιβαρύνει την κατάσταση καθώς επηρεάζει τη διαλυτότητα των λιπιδίων στην αιθανόλη και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών του λιπώδους ιστού. Η παχυσαρκία με την αλκοολική ηπατική νόσο έχουν στενή αλληλεπίδραση και η παρουσία της παχυσαρκίας έχει αθροιστική επίδραση με το αλκοόλ. Η παχυσαρκία μπορεί να οδηγήσει σε αλκοολική στεατοηπατίτιδα ενώ ένα αλκοολικό λιπώδες ήπαρ οδηγεί στην αντίσταση στην ινσουλίνη, προάγοντας έτσι την παχυσαρκία. Στοιχεία του μεταβολικού συνδρόμου μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο για ηπατική νόσο. Τέτοια συστατικά είναι η περίμετρος μέσης, το κάπνισμα και η χρήση αλκοόλ. Αλλά δεν είναι οι μόνοι παράγοντες που μπορούν να δημιουργήσουν αυτή τη νόσο. Υπάρχει αυξημένη πιθανότητα ηπατικής ίνωσης και αυξημένη θνησιμότητα αν ο ασθενής καταναλώνει αλκοόλ και συννοσηρεί με ιογενή ηπατίτιδα, κληρονομική αιμοχρωμάτωση ή έχει μολυνθεί με HIV (12).

Η αλκοολική ηπατική νόσος είναι άμεσα συνδεδεμένη με την κατανάλωση μεγάλης ποσότητας αλκοόλ καθημερινός. Πιο συγκεκριμένα, 120g καθαρού αλκοόλ την ημέρα αυξάνουν πολύ υψηλά τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Υπάρχουν όμως συνήθειες της καθημερινότητας που μειώνουν τον κίνδυνο. Φαίνεται πως η κατανάλωση του αλκοόλ μαζί με το φαγητό μειώνει τον κίνδυνο σε σχέση με την κατανάλωση σκέτης της αλ-

κόλλης καθώς και η κατανάλωση κρασιού σε σχέση με τα υπόλοιπα οινοπνευματώδη ποτά (11).

Τα τυπικά εργαστηριακά ευρήματα που θα δηλώσουν την πιθανή παρουσία αλκοολικής ηπατοπάθειας είναι η υπερχολερυθριναιμία, ουδετεροφιλία και επίπεδα ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης στον ορό μεγαλύτερα από το διπλάσιο του φυσιολογικού ανώτατου ορίου. Λόγω των κινδύνων τη βιοψίας, πραγματοποιείται μόνο αν δεν είμαστε σίγουροι για την ύπαρξη της νόσου και μπορεί να μας βοηθήσει με την πρόγνωση. Αλλιώς, τα εργαστηριακά ευρήματα θα είναι εκείνα που θα μας δείξουν αν πρόκειται για αλκοολική ηπατική νόσο. Για αυτό το λόγο, οι εξετάσεις αυτές πρέπει να γίνονται με μεγάλη ακρίβεια για την αποφυγή εσφαλμένης διάγνωσης. Σε μια αλκοολική ηπατική νόσο μπορούν να βρεθούν συνήθως παρατεταμένος χρόνος προθρομβίνης, υπολευκωματιναιμία και μειωμένος αριθμός αιμοπεταλίων. Επιπλέον, ανευρίσκεται και εξωηπατική ανεπάρκεια οργάνων σε έως και 48-65% των περιπτώσεων (13).

Η μη αλκοολική ηπατική νόσος χαρακτηρίζεται από αυξημένα ηπατικά ένζυμα και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα της αλκοολικής ηπατικής νόσου αλλά χωρίς την παρουσία κατανάλωσης αλκοόλ. Αν και η αλκοολική ηπατική νόσος και η μη αλκοολική ηπατική νόσος έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά, η κύρια διαφορά τους είναι η αιτία της νόσου. Και οι δύο ασθένειες έχουν μια γενετική προδιάθεση η οποία χειροτερεύει την ασθένεια με το να συσσωρεύει λίπος στο ήπαρ. Ακόμα αυξάνει το ενδοπλασματικό καθώς και το οξειδωτικό στρες, προάγει την φλεγμονή και την ιογένεση (10).



Εικόνα 3: (Μεταφρασμένο) Πορεία μη αλκοολικής ηπατικής κίρρωσης. Πηγή: <https://www.lecturio.com/concepts/nonalcoholic-fatty-liver-disease/>

Εκτός από ομοιότητες, έχουν βρεθεί και κάποιες διαφορές. Στη μη αλκοολική στεατοηπατοπάθεια, το MyD88 των μακροφάγων προσδένεται στον υποδοχέα Toll 4 κατά τη δέσμευση του συνδέτη και ενεργοποιεί τη μετάδοση σήματος. Αντίθετα, στην αλκοολική στεατοηπατοπάθεια, δε φαίνεται να έχει κάποιο παρόμοιο ρόλο. Στην περίπτωση της αλκοολικής στεατοηπατοπάθειας όμως βλέπουμε πιο έντονο ενδοπλασματικό και οξειδωτικό στρες από ότι στην μη αλκοολική, όταν εκφραστούν τα γονίδια που πυροδοτούν την απόπτωση (10).

Και στις δύο νόσους παρατηρούνται διαφορετικοί τρόποι θανάτου των κυττάρων του ήπατος. Εντοπίζονται θάνατοι από απόπτωση αλλά και νεκρόπτωση, πυρόπτωση και φερρόπτωση. Λόγο αυτής της ποικιλίας που εμφανίζεται στον τρόπο που πεθαίνουν τα κύτταρα αυτά, δεν είναι αποτελεσματική μια αναστολή της απόπτωσης στη θεραπεία. Όταν πραγματοποιείται νεκρόπτωση στην αλκοολική στεατοηπατοπάθεια, εξαρτάται από το RIPK-3 και το RIPK-1 σε αντίθεση με την μη αλκοολική ηπατοπάθεια όπου το RIPK-3 δε φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξή της. Η πυρόπτωση προάγει την φλεγμονή ενεργοποιώντας το φλεγμονώδες σύμπλεγμα επιδεικνύοντας την έκκριση της οικογένειας ιντερλευκίνης IL-1 και τη συνεχή απελευθέρωση DAMPs τα οποία επιδεινώνουν και άλλο την φλεγμονή. Στην αλκοολική στεατοηπατοπάθεια, η φλεγμονή πραγματοποιείται στα μακροφάγα κυρίως ενώ στην μη αλκοολική πραγματοποιείται στα ηπατοκύτταρα κυρίως. Μια ακόμα διαφορά είναι ότι στην αλκοολική στεατοηπατοπάθεια, τα φλεγμονώδη σώματα και η έκκριση IL-1 γίνεται στις πρώιμες φάσεις της εξέλιξης της νόσου ,ενώ στην μη αλκοολική γίνεται στα τελευταία (10).

Άλλες διαφορές μεταξύ των δύο νόσων είναι η σύνθεση του μικροβιώματος και στα επίπεδα του LPS που κυκλοφορούν, αλλαγές στην λιποτοξικότητα, αντίσταση στην ινσουλίνη και οι κατεστραμμένοι εκκριτικοί παράγοντες των ηπατοκυττάρων. Το πρόβλημα όμως βρίσκεται στο ότι αυτές οι διαφορές μπορεί και να οφείλονται στην διαφορά της διατροφής των ασθενών που φέρουν αυτές τις δύο νόσους καθώς εκείνοι που έχουν την αλκοολική στεατοηπατοπάθεια, συνήθως καταναλώνουν και πολύ μεγάλες ποσότητες αλκοόλ για μεγάλα χρονικά διαστήματα μαζί με αυξημένη κατανάλωση θερμίδων (10).

Διαφορά της αλκοολική ηπατικής νόσου με την μη αλκοολική αποτελεί και η ποσότητα αλκοόλ που καταναλώνει ο ασθενής. Το όριο αυτό δεν έχει κατοχυρωθεί με ακρίβεια αλλά συνήθως είναι στα 20g για τις γυναίκες και 30g για τους άντρες, την ημέρα. Σχεδόν τα δυο τρίτα των ασθενών με μη αλκοολική ηπατική νόσο, καταναλώνουν κάποια

ποσότητα αλκοόλ. Σε κάποιες περιπτώσεις μάλιστα έχει βρεθεί ότι το αλκοόλ έχει προστατευτική δράση απέναντι στη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα ενώ σε άλλες ότι αυξάνει το κίνδυνο για την ανάπτυξη ηπατικής νόσου και ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα για τη προστατευτική επίδραση, φαίνεται πως σε παχύσαρκους ασθενείς, η μέτρια πρόσληψη αλκοόλ ενδέχεται να μειώνει την αντοχή στην ινσουλίνη που είχαν αναπτύξει αυτοί οι άνθρωποι. Έτσι να μειώνει και τον κίνδυνο ανάπτυξης μη αλκοολικής ηπατοπάθειας σε αυτούς τους ανθρώπους (14).

Επίσης, η μέτρια ή μικρή ποσότητα αλκοόλ μπορεί να προστατεύσει από την αύξηση των αμινοτρανσφερασών. Αντίθετα, μια υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφερασών. Όμως οι αμινοτρανσφεράσες δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν ικανοποιητικά για τον έλεγχο της μη αλκοολικής ηπατοπάθειας. Ρόλο επιπλέον παίζει και το είδος του αλκοολούχου ποτού καθώς φαίνεται πως το κρασί σε μικρές δόσεις, μειώνει αυτόν τον κίνδυνο. Ακόμα, φαίνεται πως η κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να προστατεύσει τους άντρες από ανάπτυξη λιπώδους ήπατος. Μια κατανάλωση αλκοόλ χαμηλότερη των 20g την ημέρα για 1 με 3 μέρες ανά εβδομάδα, έχει συσχετιστεί με χαμηλότερο επιπολασμό λιπώδους ήπατος. Άρα βλέπουμε και μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας κατανάλωσης αλκοόλ και του επιπολασμού του λιπώδους ήπατος (14).

Σε κάποιες μελέτες έχει βρεθεί ότι υπάρχει μια θετική συσχέτιση μεταξύ της επιβίωσης στην μη αλκοολική ηπατική νόσο και την μέτρια πρόσληψη αλκοόλ. Φαίνεται πως μια μικρή κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να έχει θετικά αποτελέσματα ενώ μια κατανάλωση άνω των 1,5 ποτών την ημέρα, το αποτέλεσμα είναι αύξηση της θνησιμότητας. Αντίστοιχα έχει εντοπιστεί θετική συσχέτιση και μεταξύ της μέτριας χρήσης αλκοόλ και της μειωμένης μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας και της ίνωσης. Όμως και εδώ, μια αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να βοηθήσει στην εξέλιξη της νόσου και να επιταχύνει την ίνωση καθώς και να αυξήσει τον κίνδυνο ηπατοκυτταρικού καρκίνου σε ασθενείς που ήδη έχουν προχωρημένη ίνωση (14).

Σε κάποιες πιο πρόσφατες μελέτες όμως δεν εντοπίστηκε κάποια ευεργετική λειτουργία του αλκοόλ σε αυτές τις ασθένειες αλλά αντίθετα ότι η κατανάλωση αλκοόλ οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο επιδείνωσης, ακόμα και ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Τόσο η μη αλκοολική ηπατική νόσος όσο και η μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, φαίνεται πως επηρεάζονται αρνητικά από την πρόσληψη αλκοόλ. Τελικά δεν φαίνεται να υπάρ-

χει κάποιο ασφαλές όριο κατανάλωσης αλκοόλ για τους ασθενείς με μη αλκοολική ηπατική νόσο. Ακόμα και ποσότητες πιο μικρές από τις μέτριες δοσολογίες ενδέχεται να οδηγήσουν σε προβλήματα. Πρόβλημα μπορεί να οδηγήσει και η ανοχή στην ινσουλίνη που παρουσιάζουν κάποιοι ασθενείς. Μια μέτρια πρόσληψη αλκοόλ σε ασθενείς με μη αλκοολική ηπατική νόσο οδηγεί σε αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Ο κίνδυνος αυξάνεται ακόμα περισσότερο όταν υπάρχει και παρουσία ηπατίτιδας Β και C (14).

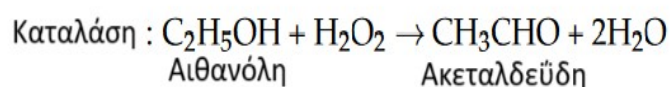
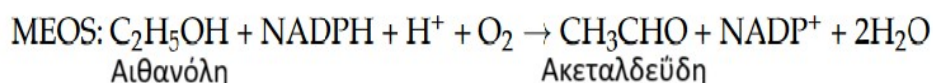
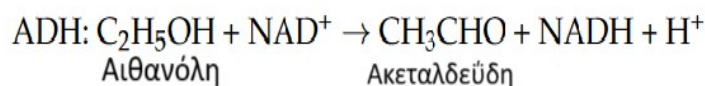
Άλλος ένας παράγοντας που επηρεάζει την αλκοολική ηπατική νόσο είναι η παχυσαρκία η οποία αυξάνει τον επιπολασμό της στεάτωσης. Ακόμα, δημιουργεί το ίδιο πρόβλημα και σε ασθενείς με μη αλκοολική ηπατική νόσο. Ακόμα και η ήπια χρήση αλκοόλ, διευκολύνει την ανάπτυξη παχυσαρκίας. Επιπλέον, η ταυτόχρονη παρουσία αλκοόλ και παχυσαρκίας, έχει συνεργική επίδραση και αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ηπατοκυτταρικού καρκίνου (14).

Η προστασία του ήπατος από τραυματισμό μπορεί να γίνει με την κατανάλωση καφέ. Φαίνεται πως ο κίνδυνος μειώνεται στο ένα πέμπτο για όσους πίνουν τέσσερα ή περισσότερα φλιτζάνια καφέ σε σχέση με εκείνους που δεν πίνουν. Αντίθετα, το κάπνισμα πάνω από ένα πακέτο την ημέρα, αυξάνει τη πιθανότητα εμφάνισης αλκοολικής κίρρωσης έως και 3 φορές. Επιπλέον, και η συνλοίμωξη με ιογενή ηπατίτιδα Β και C διευκολύνει την ανάπτυξη αλκοολικής ηπατικής νόσου αλλά και το ανάποδο καθώς και το αλκοόλ επιδεινώνει την ιογενή ηπατίτιδα. Όμως μια δυσκολία είναι ότι και οι δύο αυτές ασθένειες επηρεάζουν με παρόμοιο τρόπο το ήπαρ οπότε δε μπορούμε να ξέρουμε με σιγουριά ποια από τις δύο κάνει την ιστολογική βλάβη και ποια το επιδεινώνει. Πιο συγκεκριμένα για την ηπατίτιδα C, ακόμα και 50g την ημέρα αλκοόλ είναι ικανά να αυξήσουν σημαντικά τον κίνδυνο για προχωρημένη ίνωση. Το αλκοόλ αυξάνει το οξειδωτικό στρες, την κυτταροτοξικότητα, μειώνει την λειτουργία του ανοσοποιητικού και μειώνει την απόκριση στην αντιική θεραπεία επιδεινώνοντας έτσι και άλλο την ηπατίτιδα. Παρομοίως ενδέχεται να επηρεάζει και την ηπατίτιδα Β αλλά δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για αυτό ακόμα. Ακόμα ένας παράγοντας ανάπτυξης ίνωσης και κίρρωσης λόγω αλκοόλ, είναι το υπερβολικό βάρος. Σε αυτό ίσως φταίει η αλληλεπίδραση που υπάρχει μεταξύ αλκοόλ και λιποτοξικότητα από στεάτωση που οφείλεται στην παχυσαρκία (11).

1.1.3 Παθολογική λειτουργία ήπατος λόγω χρήσης αλκοόλ

Η ηπατική βλάβη που προκαλείται από υπερκατανάλωση αλκοόλ φαίνεται να ευθύνεται και από τον κυτταρικό θάνατο των ηπατικών κυττάρων. Τα ηπατικά κύτταρα οδηγούνται σε καταστάσεις με έντονο στρες οι οποίες τα αναγκάζουν να απομακρυνθούν από το ήπαρ με απόπτωση. Το αλκοόλ προκαλεί μεγάλο στρες στις μεμβράνες τους, είτε με οξειδωτικό, υποξικό ή ενδοπλασματικό στρες, με αποτέλεσμα να μην αφήνει άλλη επιλογή στον οργανισμό από το να τα απομακρύνει (15).

Από το σύνολο του αλκοόλ που καταναλώνει κάποιος, μόνο το 10% αποβάλλεται από τα ούρα, τον ιδρώτα και την αναπνοή. Το υπόλοιπο 90% θα μεταφερθεί μέσω του αίματος από την πυλαία αρτηρία, στο ήπαρ όπου τα ένζυμά του θα το μεταβολίσουν. Μέσα στο ήπαρ, τρία είναι τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό της αιθανόλης του αλκοόλ σε ακεταλδεΐδη. Πρώτο είναι η αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) η οποία μαζί με NAD μετατρέπει την αιθανόλη σε ακεταλδεΐδη με την συμπαραγωγή NADH και H⁺. Η αλκοολική αφυδρογονάση βρίσκεται μέσα στο κυτοσόλιο των ηπατοκυττάρων. Δεύτερο ένζυμο υπεύθυνο για τον μεταβολισμό της αιθανόλης είναι το μικροσωμικό σύστημα οξείδωσης αιθανόλης (MEOS). Μετατρέπει την αιθανόλη, με τη βοήθεια NADPH, H⁺ και O₂, σε ακεταλδεΐδη με την συμπαραγωγή NADP και δύο μόρια H₂O. Τρίτο ένζυμο είναι η καταλάση και βρίσκεται στα υπεροξισώματα. Εκείνο με τη σειρά του μετατρέπει την αιθανόλη, με τη βοήθεια του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), σε ακεταλδεΐδη και δύο μόρια H₂O. Η δουλειά της καταλάσης είναι μικρότερης έκτασης σε σχέση με τις άλλες δύο (16,17).



Εικόνα 4: (Μεταφρασμένο) Αντιδράσεις μετατροπής της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη. Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6316574/>

Η μετατροπή της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη είναι το πρώτο στάδιο στην απομάκρυνση του αλκοόλ από τον οργανισμό. Η ακεταλδεΐδη, όσο μένει μέσα στον οργανισμό, προκαλεί προβλήματα καθώς είναι ιδιαίτερα τοξική για εκείνον (1,2,9,16), επομένως είναι απαραίτητη η απομάκρυνσή της. Κατά την διάρκεια της παρουσίας της στον οργανισμό, επηρεάζει άμεσα το DNA προκαλώντας χρωμοσωμικές βλάβες αλλά και προσδέεται με πρωτεΐνες κάνοντάς τες να αυξάνουν το στρες στα κύτταρά τους. Για αυτούς τους λόγους, ο οργανισμός χρησιμοποιεί ένα ένζυμο, την αφυδρογονάση της αλδεΐδης (ALDH), για την ταχεία απομάκρυνσή της. Η αφυδρογονάση της αλδεΐδης μετατρέπει την ιδιαίτερα τοξική αλδεΐδη στο λιγότερο τοξικό οξικό άλας, προστατεύοντας τα κύτταρα από την ισχυρή δράση της. Στην συνέχεια, το λιγότερο τοξικό οξικό άλας μετατρέπεται σε διοξείδιο του άνθρακα, λιπαρά οξέα και νερό σε ιστούς έξω από το ήπαρ (16).

Η αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) όπως και η αφυδρογονάση της αλδεΐδης (ALDH) χρειάζονται NAD^+ για να επιτελέσουν τις λειτουργίες τους. Αυτό σημαίνει πως σε μεγάλες ποσότητες αιθανόλης, όπως στην ταχεία κατανάλωση μεγάλης ποσότητας αλκοόλ, ο οργανισμός βρίσκεται στην ανάγκη να αυξήσει τη λειτουργία αυτών των ενζύμων. Για να μπορέσει να διατηρήσει ενεργοποιημένα αυτά τα δύο ένζυμα για μεγαλύτερη διάρκεια, μπαίνει σε μία κατάσταση που του επιτρέπει να φέρει περισσότερο NAD^+ . Η ταχεία αύξηση στο μεταβολισμό του αλκοόλ (SIAM) επιτρέπει στον οργανισμό να βρει τα μόρια που χρειάζεται. Μέσα σε 2 με 3 ώρες από την κατανάλωση ακόμα και μικρής ποσότητας αλκοόλ, ο οργανισμός μπαίνει σε αυτή την κατάσταση. Ένα πρόβλημα όμως αυτής της κατάστασης είναι ότι αυξάνει την κατανάλωση οξυγόνου (O_2) οδηγώντας, τα κύτταρα κοντά στους ηπατικούς λοβούς, σε υποξία και ενδεχομένως να προκαλεί ζημιά στο ήπαρ (18).

Το SIAM μπορεί να επηρεαστεί από κάποιους παράγοντες με αποτέλεσμα τη μείωση της δράσης του. Λόγο της σύνδεσης του ήπατος με το έντερο, μια πιθανή αποστείρωση του εντέρου μπορεί να οδηγήσει σε σταμάτημα του SIAM. Το αλκοόλ όμως έχει την ικανότητα να αυξήσει τη χλωρίδα του εντέρου, την παραγωγή τοξικών ουσιών από αυτή και τη διαπερατότητα των τοιχωμάτων του εντέρου επιτρέποντας να περάσουν ουσίες των βακτηρίων μέσα στη πυλαία κυκλοφορία. Ενδοτοξίνες που περνούν με αυτόν τον τρόπο έχουν την ικανότητα να επηρεάσουν την φυσιολογική λειτουργία του SIAM μιμούμενες τη διέγερση της πρόσληψης οξυγόνου όπως κάνει και το αλκοόλ. Αντίθετα, ανταγωνιστές ενδοτοξινών μπορούν να σταματήσουν τη λειτουργία του SIAM. Οι ενδοτοξίνες δεν είναι ικα-

νές από μόνες του προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα στο ήπαρ. Η παράλληλη παρουσία τους όμως μαζί με χρόνια χρήση αλκοόλ, μπορεί να αυξήσει τη βλάβη και αν οδηγήσει σε αλκοολική ηπατοπάθεια. Για να προστατευτεί το ήπαρ από της ενδοτοξίνες, χρησιμοποιείται τα μακροφάγα Kupffer κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα παράγουν προσταγλανδίνη E2 (PGE2) η οποία κάνει τα ηπατοκύτταρα να λάβουν περισσότερο οξυγόνο. Αυτή η αύξηση της προσταγλανδίνης E2 γίνεται και σε πρόσληψη μεγάλης ποσότητας αλκοόλ αλλά παίζει επίσης ρόλο στο SIAM (18).

1.2.1 Ήπαρ και ερυθροκύτταρα

Το ήπαρ με τα ερυθροκύτταρα έχουν μεγάλη συνέργεια. Πολλές από τις λειτουργίες του είναι απαραίτητες για τη σωστή και φυσιολογική κυκλοφορία των υγρών ερυθροκυττάρων στο αίμα.

Το ήπαρ είναι υπεύθυνο και για την παραγωγή και έκκριση της εψιδίνης. Η εψιδίνη είναι μια ορμόνη που αποτελείται από 25 αμινοξέα και εκκρίνεται στο αίμα κυρίως από το ήπαρ ενώ απεκκρίνεται από τα νεφρά. Βασικός της ρόλος είναι η ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου. Ο καταρράκτης σηματοδότησης BMP-SMAD είναι εκείνος που ενεργοποιεί την παραγωγή εψιδίνης αλλά τον καταρράκτη τον ενεργοποιούν δύο μονοπάτια. Το πρώτο είναι οι οξείες αλλαγές στο σίδηρο πλάσματος και ο δεύτερος είναι οι αλλαγές στο σίδηρο των ιστών. Δηλαδή το ήπαρ, μέσω της έκκρισης της εψιδίνης, είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο των επιπέδων σιδήρου. Η δουλειά της εψιδίνης είναι να αποικοδομεί την φερροπορτίνη και έτσι να ελέγχει την είσοδο του σιδήρου στο αίμα. Η φερροπορτίνη είναι μια πρωτεΐνη που παράγεται από τα εντεροκύτταρα του δωδεκαδακτύλου, τα δικτυοενδοθηλιακά μακροφάγα, τα ηπατοκύτταρα και τους πλακουντιακούς συγκιτιοτροφολάστες. Η είσοδος του σιδήρου μπορεί να γίνει με τη διατροφή, όταν τα μακροφάγα απομακρύνουν τα ερυθρά από τη κυκλοφορία και από τις φυσικές αποθήκες σιδήρου στον οργανισμό. Όταν ο οργανισμός χρειάζεται σίδηρο, όπως σε στιγμές που πρέπει να φτιαχτούν πολλά νέα ερυθροκύτταρα, τότε μειώνει την παραγωγή της εψιδίνης. Το κάνει αυτό για να υπάρχει διαθέσιμος σίδηρος και να μην τον απομακρύνει η εψιδίνη. Αν όμως η συγκέντρωση του σιδήρου αυξηθεί, σε επίπεδα που μπορεί να προκαλέσουν τοξικότητα ή να ωφελήσουν επικίνδυνα για τον οργανισμό παθογόνα, τότε η παραγωγή της εψιδίνης θα αυξηθεί. Η υπερβολική όμως καταστολή της εψιδίνης ενδέχεται να προκαλέσει υπερφόρ-

τωση σιδήρου σε αναιμίες που συγκρατούν πολύ σίδηρο ενώ αν παραχθεί παραπάνω από τη κατάλληλη ποσότητα ενδέχεται να προκαλέσει προβληματική ερυθροποίηση καθώς δεν θα υπάρχει επαρκές σίδηρος. Αν η εψιδίνη υπερεκφραστεί τότε μπορεί να οδηγήσει σε σιδηροπενική αναιμία (19).

Επίσης το ήπαρ είναι ικανό, μαζί με τον σπλήνα και τον μυελό των οστών, να διασπάσουν την αίμη. Αρχικώς την διασπούν σε μπιλιβερδίνη η οποία με τη σειρά της θα αναχθεί σε μη συζευγμένη χολερυθρίνη. Μέσω της κυκλοφορίας, και συνδεδεμένη με την αλβουμίνη, θα φτάσει στο ήπαρ. Εκεί, το σύστημα διφωσφορικής ουριδίνης γλυκουρονουλοτρανσφεράσης (UGT) θα την κάνει υδρόφιλη. Στην συνέχεια, η απέκκριση της, θα γίνει είτε μέσω των καναλιών της χολής στη χολή όπου θα αποβληθεί τελικά από τα κόπρανα, είτε θα διαλυθεί στο αίμα και θα την αναλάβουν τα νεφρά. Το μεγαλύτερο μέρος της χολερυθρίνης θα πάρει την διαδρομή του εντέρου. Εκεί ένα μέρος της όμως μπορεί να μετατραπεί, από τα βακτήρια του εντέρου, σε ουροχολερυθρίνη ή μη συζευγμένη χολερυθρίνη και να μπει στην εντεροηπατική κυκλοφορία (9).

Άλλο ένα σημαντικό στοιχείο για την φυσιολογική λειτουργία των ερυθροκυττάρων είναι και τα μακροφάγα και ιδιαίτερα τα μακροφάγα του ήπατος. Στο σύνολο είναι ένα καίριο σημείο τόσο στην παραγωγή όσο και στην καταστροφή των ερυθροκυττάρων. Τα μακροφάγα στο μυελό των οστών στην αρχή και τα μακροφάγα στο σπλήνα και ήπαρ στο τέλος. Πιο συγκεκριμένα για τα μακροφάγα του ήπατος, τα κύτταρα Kupffer, γίνονται πολύ σημαντικά όταν υπάρξει ανάγκη για αυξημένη ερυθροφαγοκυττάρωση όπως σε περιπτώσεις αιμόλυσης, μόλυνσης ή κληρονομικών ασθενειών αίματος. Τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν τα κατεστραμμένα ερυθροκύτταρα για να τα απομακρύνουν από την κυκλοφορία. Αυτή η φαγοκυττάρωση, ή αλλιώς ερυθροφαγοκυττάρωση για τα ερυθροκύτταρα, απελευθερώνει σίδηρο. Ο σίδηρος αυτός είτε δεσμεύεται από τη φερριτίνη μέσα στα μακροφάγα είτε απελευθερώνεται στην κυκλοφορία όπου μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για ερυθροποίηση. Όταν ένα ερυθροκύτταρο φαγωθεί από ένα μακροφάγο μπαίνει μέσα σε ένα λυσόσωμα του κυττάρου. Στην συνέχεια αυτό το λυσόσωμα ενώνεται με ένα φαγόσωμα και σχηματίζουν το ερυθροφαγολυσόσωμα που πραγματοποιεί την αποικοδόμηση του ερυθροκυττάρου (20).

Μια ακόμα επίδραση του ήπατος στα ερυθροκύτταρα είναι ότι κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής φάσης του ανθρώπου, το ήπαρ είναι το όργανο που παράγει την ερυθροποιητίνη. Όταν ο οργανισμός γεννηθεί, η ερυθροποιητίνη παράγεται πλέον από κύττα-

ρα του νεφρικού φλοιού αν και το mRNA της μπορεί να βρεθεί και σε άλλα όργανα όπως το ήπαρ, τον σπλήνα, τον μυελό των οστών και τον εγκέφαλο. Παρόλα αυτά η ηπατικής ερυθροποιητίνη, περίπου το 10% της ερυθροποιητίνης του πλάσματος, εξακολουθεί να παράγεται στο ήπαρ από τα ηπατοκύτταρα (21).

1.2.2 Βλάβες στα ερυθροκύτταρα από τη χρήση αλκοόλ

Μεγάλες ποσότητες αιθανόλης στο αίμα προκαλούν αλλαγές στο μέσο όγκο των ερυθροκυττάρων (MCV) καθώς και στη μέση περιεκτικότητά τους σε αιμοσφαιρίνη (MCH) αλλά και στον αριθμό τους. Η αύξηση του όγκου των ερυθρών (MCV) μπορεί να βρεθεί και σε ασθενείς με χρόνια ηπατοπάθεια (22,23). Από την αιθανόλη επηρεάζονται ακόμα και τα λευκά κύτταρα αλλά δε γνωρίζουμε ακριβώς σε ποιο βαθμό (22). Στην παρουσία αλκοόλ, το σύνολο του αίματος επηρεάζεται είτε έμμεσα είτε άμεσα. Η χρήση του κάνει ζημιά στις πρωτεΐνες του πλάσματος, μειώνοντας έτσι την ικανότητα του οργανισμού για παραγωγή λειτουργικών θρόμβων, ενώ μια παρατεταμένη χρήση του οδηγεί σε προβλήματα αιμοποίησης. Σε περίπτωση που ο ασθενής έχει έλλειψη σε φολικό οξύ και σε βιταμίνες, που είναι κοινό στον χρόνια αλκοολισμό, τότε η αιμοποίηση μειώνεται περαιτέρω. Τα ερυθροκύτταρα στους χρόνιους αλκοολικούς εμφανίζουν χαρακτηριστικές δομικές ανωμαλίες (23). Η υπερβολική χρήση αλκοόλ επηρεάζει αρνητικά και τον μυελό των οστών καθώς και εκεί γίνεται μέρος του μεταβολισμού της αιθανόλης. Οι ερυθροποίηση, κοκκιοποίηση και θρομβοποίηση, που πραγματοποιεί ο μυελός των οστών, μειώνονται σε αυτή τη κατάσταση. Το αλκοόλ βλάπτει τον αιμοποιητικό ιστό διαταράσσοντας τη δομή των κυττάρων, τα μονοπάτια σηματοδότησης, τον μεταβολισμό αυτών των κυττάρων καθώς και στον σύνολο την επιβίωση τους. Ακόμα προκαλεί πρόβλημα στον πολλαπλασιασμό και στην διαφοροποίηση τους (24). Αυτό φαίνεται και από το ότι τα πρώιμα πρόδρομα κύτταρα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την δημιουργία των ερυθροκυττάρων, χάνουν την φυσιολογική συνοχή στη μεμβράνη τους όταν έρχονται σε επαφή με μεγάλη περιεκτικότητα αλκοόλ. Ο πιο πιθανός λόγος που συμβαίνει αυτό είναι η φτωχή σε φολικό οξύ δίαιτα. Όμως ο ίδιος ο μεταβολισμός του αλκοόλ μειώνει τις συγκεντρώσεις του φολικού οξέως με το να δυσκολεύει την απορρόφησή του από τον οργανισμό (23).

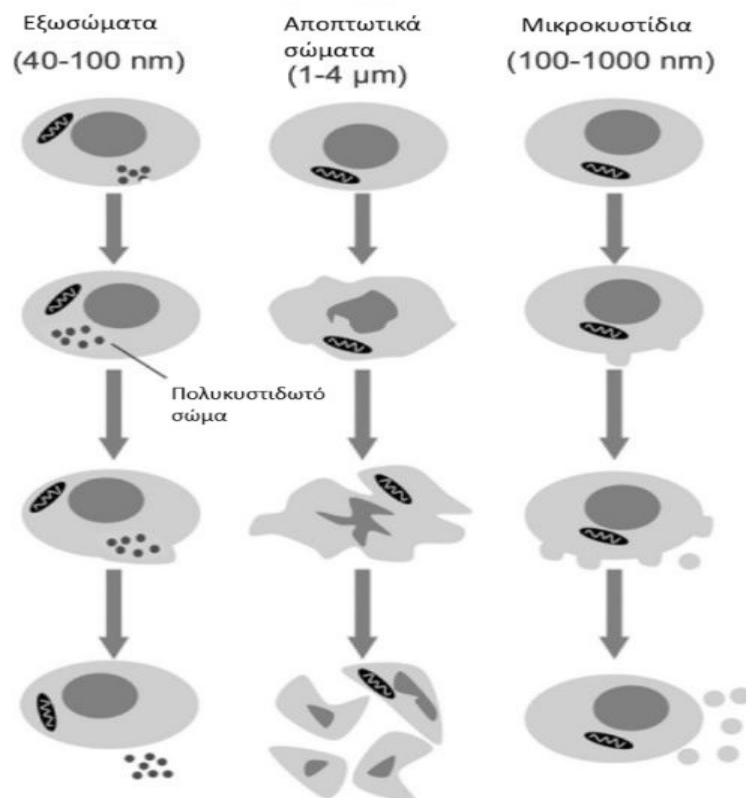
Μέσα στον μυελό των οστών, τα πρώιμα πρόδρομα κύτταρα των ερυθροκυττάρων εμφανίζουν κενोटόπια όταν ο οργανισμός έχει λάβει μεγάλη ποσότητα

αλκοόλ. Τα κενοτόπια δεν είναι μόνιμα μέσα στον οργανισμό καθώς εμφανίζονται λίγες μέρες μετά τη χρήση και εξαφανίζονται αν υπάρξει αποχή από το αλκοόλ για λίγες εβδομάδες. Όσο μεγαλύτερη είναι η επαφή αυτών των κυττάρων με το αλκοόλ, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των κενοτοπίων μέσα τους και ο λόγος που τους συμβαίνει αυτό είναι γιατί τα κύτταρα αυτά προσπαθούν να προσαρμοστούν στην παρουσία της αλκοόλης η οποία επιδεινώνει την κατάσταση διαταράσσοντας της παραγωγή πρωτεϊνών, αναστέλλοντας λειτουργίες τους και αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες (24). Η εμφάνιση προβληματικών ερυθροκυττάρων στη κυκλοφορία του αίματος είναι άλλο ένα σύμπτωμα της βλάβης στην ερυθροποίηση. Αυτά τα προβληματικά κύτταρα μπορεί να είναι μακροκύτταρα ή να έχουν κάποιο σχήμα που τα καθιστά ευάλωτα σε καταστροφή οδηγώντας τους αλκοολικούς σε αναιμία. Άλλο ένα πρόβλημα που δημιουργεί ο αλκοολισμός είναι η απώλεια φωσφορικού άλατος με την ούρηση. Λόγο αυτής της απώλειας, τα επίπεδα ATP στα ερυθροκύτταρα πέφτουν και οι μεμβράνες τους αποδυναμώνονται και τα κύτταρα αυτά τραυματίζονται (23). Ένα ερυθροκύτταρο που έχει τραυματιστεί μπορεί να βρεθεί σε μια κατάσταση, παρόμοια με την απόπτωση, την ερυθρόπτωση. Σε αυτή τη διαδικασία, τα ελαττωματικά κύτταρα καταστρέφονται χωρίς όμως να καταστρέφουν και την μεμβράνη τους ή να απελευθερώνουν κυτοσόλιο στον εξωτερικό χώρο (24).

1.3.1 Χαρακτηριστικά μικροκυστιδίων

Η επικοινωνία των κυττάρων του οργανισμού είναι απαραίτητη για την εύρυθμη λειτουργία του. Για να μπορέσουν λοιπόν τα κύτταρα να επικοινωνήσουν μεταξύ τους, χρησιμοποιούν διάφορους τρόπους. Αν ακουμπάει το ένα το άλλο τότε στέλνουν άμεσα τα μηνύματά τους, αλλιώς μπορούν να εκκρίνουν ουσίες οι οποίες θα μεταφέρουν το μήνυμα ή χρησιμοποιούν τα εξωκυττάρια μικροκυστίδια (EV). Αυτά τα εξωκυττάρια μικροκυστίδια μεταφέρονται μέσω του αίματος σε όλο τον οργανισμό και παράγονται από φυσιολογικά αλλά και παθολογικά κύτταρα. Η δουλειά τους είναι να μεταφέρουν ή να μετατρέπουν σήματα και επειδή κινούνται μέσω του αίματος, μπορούν να δράσουν σε μεγάλη απόσταση από το κύτταρο που τα δημιούργησε. Μπορούν όμως να επιτελέσουν και άλλη λειτουργία καθώς έχουν την ικανότητα να αφαιρούν μοριακό υλικό ή κυτταρικά απόβλητα τα οποία δεν πρέπει να υπάρχουν (25).

Τα κυστίδια χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες αναλόγως με το μέγεθος τους. Τα μικρότερα από όλα είναι τα εξωσώματα με μέγεθος 30 – 100 nm που απελευθερώνονται όταν συντήκονται πολυκυστιδικά σώματα που περιέχουν ενδοαυλικά κυστίδια με την πλασματική μεμβράνη. Τα επόμενα σε μέγεθος είναι τα μικροκυστίδια με μέγεθος 0,1 – 1,0 μm και έχουν φυσαλιδώδη δομή. Αυτά απορρίπτονται από την εξωτερική φυσαλίδα της πλασματικής μεμβράνης. Τέλος, τα μεγαλύτερα, είναι τα αποπτωτικά σώματα με μέγεθος 1 – 5 μm και δημιουργούνται κατά την διάρκεια της απόπτωσης των κυττάρων (25).



Εικόνα 5: (Μεταφρασμένο) Δημιουργία εξωσωμάτων, αποπτωτικών σωμάτων και μικροκυστιδίων. Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC564996>
1/

Η δημιουργία μικροκυστιδίων ξεκινάει με την ενεργοποίηση της όξινης σφιγγομυελινάσης και την δημιουργία κεραμιδίων (ceramide). Η δημιουργία τους κατορθώνεται και με τη συσσωμάτωση λιπιδίων και ασυμμετρία με φωσφατιδυλοσερίνη αλλά και με πρωτεΐνες καμπυλότητας μεμβράνης οι οποίες αναγκάζουν την μεμβράνη να καμφθεί (7). Ακόμη ένας τρόπος για να σχηματιστεί ένα μικροκυστίδιο είναι αρχικώς να ενεργοποιείται η καλπαΐνη και η γελσολίνη με αύξηση του ενδοκυττάριου κυτταροσωμικού ασβεστίου. Η καλπαΐνη είναι μια πρωτεάση που αποσπά τις πρωτεΐνες της μεμβράνης από τον κυτταρο-

σκελετό ενώ η γελσολίνη συμβάλλει στην διάσπαση του δικτύου ακτίνης και έτσι πλέον μπορούν να εμφανιστούν φυσαλίδες. Τα μικροκυστίδια τότε φεύγουν από μικροτομές της πλασματικής μεμβράνης (25).

Αντίστοιχα, για να απομακρυνθεί ένα μικροκυστίδιο από την κυκλοφορία, η πιο συχνή διαδικασία είναι η ενδοκύττωσή του από το κύτταρο δέκτη όπου το μικροκυστίδιο θα καταρροφιθεί από αυτό. Όμως υπάρχουν και άλλοι τρόποι ανάλογα με το φορτίο και την διακυτταρική επικοινωνία των μικροκυστιδίων όπως είναι και η σύντηξη η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση των μικροκυστιδίων. Σε αυτή τη διαδικασία το μικροκυστίδιο συγχωνεύεται με τη μεμβράνη του κυττάρου και το εσωτερικό του μικροκυστιδίου μπαίνει μέσα στο κύτταρο στόχο. Αν η σύντηξη γίνει σε όξινο περιβάλλον, τότε είναι πιο αποδοτική. Υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ της παραγωγής και της κατανάλωσης των μικροκυστιδίων. Τα μικροκυστίδια της κυκλοφορίας έχουν ένα χρόνο ημιζωής που κυμαίνεται από μερικά λεπτά μέχρι μερικές ώρες. Σε περιπτώσεις που λόγω κάποιας βλάβης αυξηθούν τα μικροκυστίδια, τα επίπεδά τους επιστρέφουν στα φυσιολογικά σε σύντομο σχετικά χρονικό διάστημα (25). Η ισορροπία στην παραγωγή και στη κάθαρση των μικροκυστιδίων φαίνεται από το ότι υπάρχει μια σταθερή κατάσταση στον αριθμό τους (26).

Τα μικροκυστίδια κουβαλούν πάνω τους, τους υποδοχής της μεμβράνης από την οποία έχουν προέλθει. Καθώς κυκλοφορούν μέσα στα υγρά του σώματος, όπως είναι και το αίμα, τα μικροκυστίδια που προέρχονται από διάφορα σημεία του σώματος, έρχονται σε επαφή με ένζυμα τα οποία ενδεχομένως να διασπάσουν το εσωτερικό τους (25). Για να προστατευτούν από τυχόν ζημιά που μπορεί να τους προκληθεί, τα μικροκυστίδια έχουν την λιπιδική μεμβράνη τους η οποία ενθυλακώνει και προστατεύει το εσωτερικό τους (26). Μερικά μικροκυστίδια φέρουν και φωσφατιδυλοσερίνη στο εξωτερικό τους (25). Ακόμα, στο εσωτερικό τους, έχουν πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και γενετικό υλικό όπως mRNAs, microRNAs και άλλα μη κωδικοποιητικά RNA (7,25). Τα μικροκυστίδια κουβαλούν μέσα τους όμως και υλικά αντίστοιχα με εκείνα που έχει το κύτταρο που τα δημιούργησε (25). Επειδή χρησιμοποιούν τόσα διαφορετικά στοιχεία, μπορούν και μεταφέρουν πολλαπλά διαφορετικά μηνύματα σε όλο τον οργανισμό (26).

Ακόμη, το εσωτερικό τους, επηρεάζεται και από το μικροπεριβάλλον και τους ερεθισμούς που δέχτηκαν τα μικροκυστίδια κατά την απελευθέρωσή τους. Επιπλέον όταν τα μικροκυστίδια αποβάλλονται, περνάνε από μια επιλεκτική διαδικασία που πολλές φορές τα κάνει να μεταφέρουν διαφορετικά συστατικά από το μητρικό τους κύτταρο. Έτσι,

υπάρχει διαφορά μεταξύ των μικροκυστιδίων που έχουν προέλθει από αποπτωτικά κύτταρα και από εκείνα που προήλθαν από κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία. Όλα αυτά που κουβαλούν ενδέχεται να δημιουργήσουν αλλαγές στον φαινότυπο του κυττάρου που θα τα δεχτεί. Επειδή μεταφέρουν πολλαπλούς μεσολαβητές και συνδυασμούς τους, θεωρούνται πιο ισχυρά στο να μεταφέρουν διακυτταρικά μηνύματα από τα μεμονωμένα μόρια. Τα μικροκυστίδια που μετακινούνται, έχουν προέλευση κυρίως από αιμοπετάλια, ερυθροκύτταρα, λευκά κύτταρα και κύτταρα ενδοθηλίου. Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα μικροκυστίδια, απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της κυτταρικής ανάπτυξης (25).

Όπως αναφέραμε, τα μικροκυστίδια μπορούν να προκληθούν σε φυσιολογικές αλλά και σε παθολογικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, η υποξία, το οξειδωτικό στρες, η γήρανση αλλά και η απόπτωση μπορούν να τα προκαλέσουν. Ακόμα, η διέγερση πουρινεργικών υποδοχέων, η διατμητική πίεση, οι προφλεγμονώδεις μεσολαβητές ορθρομβίνης, παράγοντες βακτηριακής μόλυσματικότητας, οι λιποπολυσακχαρίτες καθώς και οι ουραιμικές τοξίνες μπορούν να έχουν το ίδιο αποτέλεσμα. Τα κύρια μέρη στα οποία μπορούν να βρεθούν τα μικροκυστίδια είναι το αίμα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και τα ούρα αλλά υπάρχουν και στο αρθρικό υγρό, στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης, στο μητρικό γάλα, στη χολή, στο σάλιο και στο μητρικό υγρό. Αναλόγως από που προέρχονται τα ευρήματα, μας δείχνουν τι συμβαίνει στα κύτταρα από όπου προήλθαν (25). Επομένως ο εντοπισμός τους στο αίμα θα μπορούσε να μας δώσει πολύτιμες πληροφορίες για τις τυχόν ασθένειες του οργανισμού. Ο εντοπισμός και η μελέτη τους είναι δύσκολο να γίνουν καθώς, λόγω του μικρού μεγέθους των μικροκυστιδίων, χρειαζόμαστε τεχνικές που μπορούν να δουν τα κυστίδια με μέγεθος μικρότερο του 1 μm. Μια τέτοια τεχνική είναι η ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων (NTA). Το NTA περνάει τα μικροκυστίδια σε υγρή φάση και με τη χρήση δέσμης λέιζερ, καθορίζει το μέγεθος και τη συγκέντρωση κινηματογραφώντας τη σκέδαση του φωτός καθώς τα σωματίδια κινούνται υπό την κίνηση Brown. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε φθορισμένα σωματίδια για να δοθούν ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες (25).

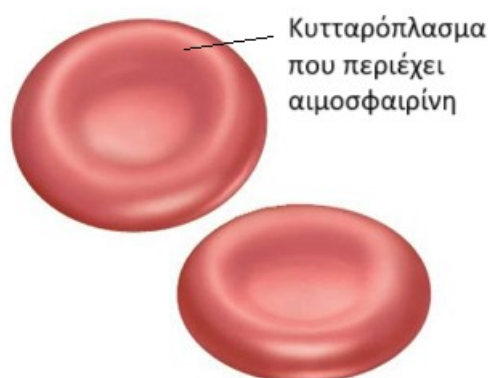
1.3.2 Φυσιολογικά μικροκυστίδια ερυθροκυττάρων και λειτουργίες τους.

Το ερυθροκύτταρο, καθώς ωριμάζει, διώχνει ορισμένα στοιχεία του που δεν χρειάζεται, όπως υποδοχείς και ένζυμα της μεμβράνης. Για να τα διώξει αυτά, χρησιμοποιεί τα

μικροκυστίδια τα οποία θα πάρουν τα στοιχεία που δεν χρειάζεται το ερυθροκύτταρο και θα τα βγάλουν έξω από το κύτταρο (27). Ακόμα, όταν το ερυθροκύτταρο βρεθεί σε μια κατάσταση στην οποία η μεμβράνη του εμφανίσει ελαττώματα, όπως όταν λείπουν σκελετικά συστατικά ή σε καταστάσεις κάποιων ασθενειών, τότε του είναι πιο εύκολο να δημιουργήσει μικροκυστίδια (28). Κατά την δημιουργία τους, τα μικροκυστίδια, πραγματοποιούν σύντηξη με την πλασματική μεμβράνη και στη συνέχεια απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο μαζί με τα στοιχεία που θέλει το κύτταρο να αποβάλει. Όμως, για να δημιουργηθούν τα μικροκυστίδια, κόβουν ένα κομμάτι της μεμβράνης του κυττάρου τους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, τα ερυθροκύτταρα να χάνουν περίπου το 20% της επιφάνειας της μεμβράνης τους καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Κατά μέσο όρο, 2,71 μικροκυστίδια απελευθερώνονται κάθε μέρα από κάθε ερυθροκύτταρο, κατά τη διάρκεια της ζωής τους (27). Τα περισσότερα μικροκυστίδια στην κυκλοφορία του αίματος οφείλονται στα ερυθροκύτταρα και όσο ωριμάζουν τα ερυθροκύτταρα, τόσο περισσότερο παράγουν μικροκυστίδια με σκοπό την έγκαιρη απομάκρυνση ουσιών που διαφορετικά θα προκαλούσαν πρόβλημα, όμως όσο ζουν, αλλάζει το προφίλ του φορτίου της μεμβράνης τους. Αυτό οδηγεί τα μικροκυστίδια, αναλόγως από ποιο στάδιο της ζωής του ερυθροκυττάρου έχουν παραχθεί, να έχουν και εκείνα διαφορετικό προφίλ (27,29). Το αποτέλεσμα της μείωσης του μεγέθους του ερυθροκυττάρου, είναι η αύξηση της ενδοερυθροκυτταρικής αιμοσφαιρίνης κατά περίπου 14% (30). Για την δημιουργία τους, τα μικροκυστίδια, χρησιμοποιούν τα αποδυναμωμένα σημεία της κυτταρικής μεμβράνης, δηλαδή σημεία όπου δεν υπάρχουν τα συστατικά του κυτταροσκελετού (27).

Τα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα φτάνουν σε διάμετρο τα 7,5 με 8,7 μm και σε πάχος 1,7 με 2,2 μm. Έχουν το χαρακτηριστικό σχήμα του αμφίκιουλου δίσκου. Το μεγαλύτερο μέρος της μεμβράνης το αποτελούν τα φωσφολιπίδια κατά 60% ενώ το 30% είναι η χοληστερόλη και το τελευταίο 10% είναι τα γλυκολιπίδια. Μέρος της μεμβράνης όμως αποτελούν και ορισμένες πρωτεΐνες που επιτελούν λειτουργίες για το κύτταρο. Αυτές μπορεί να είναι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, ενσωματωμένες πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες αγκύρωσης. Τα μικροκυστίδια προερχόμενα από ερυθροκύτταρα φέρουν συστατικά των ερυθροκυττάρων όπως φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες, χοληστερόλη, λιπιδικές σχεδίες, αιμοσφαιρίνη και ακετυλοχολινεστεράση. Παρόλο που η προέλευσή τους είναι από την κυτταρική μεμβράνη των ερυθροκυττάρων, η σύστασή τους δεν είναι

πανομοιότυπη με εκείνη των μητρικών κυττάρων. Η διαφορά τους είναι ότι δεν έχουν μόρια συνδεδεμένα με κυτταροσκελετό και έχουν λιγότερες πρωτεΐνες στην μεμβράνη τους (29).



Εικόνα 6: (Μεταφρασμένο). Φυσιολογικό ερυθροκύτταρο.
Πηγή: <https://biology-igcse.weebly.com/blood-cells---structure-and-functions.html>

Για να δημιουργηθούν τα μικροκυστίδια χρειάζεται να εκτεθούν σε παράγοντες που προάγουν κυστιδιοποίηση ειδικά για τα ερυθροκύτταρα, δηλαδή να διαταραχθεί η φυσιολογική ασυμμετρία της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων ώστε να υπάρξει μεγαλύτερη πυκνότητα φορτισμένων φωσφολιπιδίων στην εξωτερική μεμβράνη (30,31). Οι βλάβες στην μεμβράνη τους που προκαλούν παραμόρφωση είναι ικανές να παράξουν μικροκυστίδια. Η εξάντληση του ATP, υπερβολικό ασβέστιο τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά, η έκθεση σε λυσοφωσφατιδικό οξύ, η διαταραχή πρωτεΐνης μεμβράνης υπό pH 5,4 ή θέρμανση και η διασύνδεση με διαμίδιο είναι μερικά παραδείγματα που μπορούν να οδηγήσουν τα ερυθροκύτταρα να παράξουν μικροκυστίδια (29).

Πίο συγκεκριμένα για το ασβέστιο, όταν το κύτταρο βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας, τα επίπεδα ασβεστίου του είναι χαμηλά και η λιπιδική ασυμμετρία της μεμβράνης τους διατηρείται από ένζυμα που μεταφέρουν φωσφολιπίδια. Σε αυτή τη κατάσταση οι φλιπάσες εσωτερικεύουν αρνητικά φορτισμένη φωσφατιδιλοσερίνη ενώ η φλοπάση και η σκραμπλάση είναι ανενεργές. Αν οξειδωθεί το ασβέστιο ή εισέρθει μεγάλη ποσότητά του στο κύτταρο, τότε ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για μεταφορά φωσφολιπιδίων και πραγματοποιείται κυστιδιοποίηση. Αν

υπάρξει αύξηση του ασβεστίου αλλά και απενεργοποίηση της φλιπάσης, που εξωτερικεύει την φωσφατιδυλοσερίνη, τότε δεν πραγματοποιείται κυστιδιοποίηση. Όμως αν αυξηθεί το ενδοκυττάριο ασβέστιο που οδηγεί σε εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης, τότε πραγματοποιείται κυστιδιοποίηση στο ερυθροκύτταρο. Σε περίπτωση που το ερυθροκύτταρο επωαστεί με έναν ειδικό αναστολέα της σκραμπλάσης, τότε δεν γίνεται εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης και μειώνονται τα παραγόμενα μικροκυστίδια. Εκτός από μικροκυστίδια, με την αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, ελευθερώνονται και νανοκυστίδια, μικρότερα σε μέγεθος από τα μικροκυστίδια. Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες προάγει την κυστιδιοποίηση. Αν σε αποθηκευμένο αίμα προστεθούν αντιοξειδωτικά μόρια, τότε η απελευθέρωση μικροκυστιδίων μειώνεται. Τέλος, αλλαγές στις πρωτεΐνες της ζώνης 3 και στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων μπορούν να οδηγήσουν στην δημιουργία μικροκυστιδίων (31). Από την μεγάλη ετερογένεια των τρόπων παραγωγής των μικροκυστιδίων, φαίνεται πως οι αλλαγές της οργάνωσης των λιπιδίων συμβάλουν και διευκολύνουν τον σχηματισμό τους αλλά δεν είναι πλήρως υπεύθυνες για τη δημιουργία τους (32).

Για να μπορούν να αντέξουν την οξείδωση, τα ερυθροκύτταρα φέρουν πολλά αντιοξειδωτικά ένζυμα που τα προστατεύουν. Κάποια από τα ένζυμα αυτά είναι το σύστημα αναγωγάσης θειορεδοξίνης/υπεροξειρεδοξίνης, η δισμουτάση υπεροξειδίου, η καταλάση, η υπεροξειδάση γλουταθειόνης, η αναγωγάση γλουταθειόνης και τα αναγωγικά ισοδύναμα καθώς και τα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά: γλουταθειόνη, ασκορβικό οξύ, ατοξίνη. Αν όμως βρεθούν σε καταστάσεις όπου το οξειδωτικό στρες αυξάνεται μέσα στο κύτταρο λόγω διεργασιών του όπως σε περιπτώσεις μετάγγισης ή αποθήκευσης, τότε το ερυθροκύτταρο παράγει μικροκυστίδια για να αντεπεξέλθει σε αυτή την αλλαγή (31).

Μια λειτουργία των μικροκυστιδίων των ερυθρών είναι να απομακρύνουν τη φωσφατιδυλοσερίνη που έχει εκτεθεί εξωτερικά της μεμβράνης του κυττάρου. Ο λόγος που θέλουν τα ερυθροκύτταρα να τη διώξουν είναι γιατί όταν η φωσφατιδυλοσερίνη βρεθεί στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης, οδηγεί σε φαγοκυττάρωση και πήξη. Φυσιολογικά βρίσκεται στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης (27). Η παρουσία φωσφατιδυλοσερίνης είναι ένα πολύ κοινό εύρημα στα περισσότερα μικροκυστίδια από ερυθροκύτταρα, είτε αυτά έχουν προέλθει από υγιείς είτε από ασθενείς δότες. Παρόλο που τα περισσότερα εμφανίζουν φωσφατιδυλοσερίνη, πολλά μικροκυστίδια που έχουν προέλθει λόγω αλλοιωμένης μορφολογίας ερυθροκυττάρων, δεν φέρουν πάνω τους αυτή

την ουσία. Υπάρχουν όμως κάποιες περιπτώσεις όπου η συγκέντρωση φωσφατιδυλοσερίνης δεν είναι ανιχνεύσιμη (32).

Επιπλέον, συστάδες CD59 και στοματίνης εμφανίστηκαν στα ερυθροκύτταρα όταν τους δόθηκε θεραπεία με σφιγγομυελινάση. Η σφιγγομυελινάση συμβάλει στην παραγωγή μικροκυστιδίων με το να διασπά συστατικά της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Όμως αυτά τα κύτταρα είχαν πολλές διαφορές στην περιεκτικότητά τους σε γλυκοφορίνη A καθώς και στην έκθεσή τους σε φωσφατιδυλοσερίνη (32). Ένα ακόμα στοιχείο που φέρουν στην επιφάνειά τους τα μικροκυστίδια των ερυθροκυττάρων είναι το CD47. Το CD47 τους επιτρέπει να αναστέλλουν την φαγοκυττάρωση τους αλληλεπιδρώντας με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη σήματος του ανασταλτικού υποδοχέα των μακροφάγων (29). Η διαφορά στη δομή και το μέγεθος μεταξύ ερυθροκυττάρων και των μικροκυστιδίων τους, οδηγεί τα μικροκυστίδια να έχουν διαφορετική πορεία μέσα στη κυκλοφορία του αίματος και να κατευθύνονται πιο κοντά στα ενδοθηλιακά κύτταρα στην “ελεύθερη από κύτταρα” ζώνη της μικροκυκλοφορίας (30). Επιπλέον, η αιμοσφαιρίνη που εσωκλείουν τα μικροκυστίδια είναι πιο όμοια με την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη που έχει φύγει από τα κύτταρα ή με εκείνη που εντοπίζεται σε γηραιά ερυθροκύτταρα παρά με εκείνη που έχει προέλθει απευθείας από τα υγιή ερυθροκύτταρα (30,31).

Στο εσωτερικό των μικροκυστιδίων μπορούν να βρεθούν κοντά στα 78 miRNA που έχουν προέλθει από το μητρικό αποθηκευμένο ερυθροκύτταρο. Κάποια από αυτά ανευρίσκονται πιο συχνά από τα υπόλοιπα, όπως τα miR-125-b-5p, 4454 και 451, ενώ τα δύο από αυτά αυξάνονταν σε αριθμό με τη πάροδο του χρόνου αποθήκευσης, τα miR-4454 και miR-451a. Έχει παρατηρηθεί να βρίσκονται διαφορετικά επίπεδα miRNA στα μικροκυστίδια του αίματος των δοτών αναλόγως με το υψόμετρο που ζουν όπως συνέβη στα miRNA-144-5p και miR-30b-5p όπου εντοπίστηκε αυξημένη έκφραση. Τα μικροκυστίδια από ερυθροκύτταρα μεταφέρουν πρωτεΐνες, λιπίδια και miRNA που χρησιμεύουν στην μεταφορά μηνυμάτων με το ενδοθήλιο, βοηθούν στην ρύθμιση του επιπέδου του οξυγόνου και του μονοξειδίου του αζώτου καθώς και συνεισφέρουν στην διατήρηση της ισορροπίας της οξειδοαναγωγής και της ανοσοτροποποίησης. Κάποια από αυτά τα ένζυμα που βοηθούν στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση είναι η τρανσφεράση S της γλουταθειόνης, η θειορεδοξίνη και η υπεροξειδοξίνη 1 και 2. Πάνω στη μεμβράνη των μικροκυστιδίων μπορούν να εντοπιστούν και σήματα αφαίρεσης όπως η φωσφατιδυλοσερίνη και οι ανοσοσφαιρί-

νες. Ακόμα, τα μικροκυστίδια, επηρεάζουν την απορρύθμιση της αιμόστασης και έχουν προπηκτικές αντιδράσεις σε πολλές παθολογικές καταστάσεις (31).

Μικροκυστίδια από ερυθροκύτταρα έχουν πηκτικές ικανότητες αλλά όχι τόσο ικανές όσο εκείνα που έχουν προέλθει από αιμοπετάλια, ενδοθηλιακά κύτταρα και λευκοκύτταρα. Η φωσφατιδιλοσερίνη που φέρουν στην επιφάνειά τους τα μικροκυστίδια είναι εκείνη που τους επιτρέπει να έχουν προπηκτική δράση. Επειδή είναι αρνητικά φορτισμένο, αλληλεπιδρά με περιοχές παραγόντων πήξης που έχουν έντονη παρουσία του γ-καρβοξυγλουταμινικού οξέως. Αυτή η σύνδεση γίνεται παρουσία ασβεστίου και επιτρέπει τη δημιουργία συμπλόκων τενάσης και προθρομβινάσης. Έτσι, η ενεργοποίηση της πήξης με μικροκυστίδια πραγματοποιείται χωρίς την ανάγκη παρουσίας ιστικών παραγόντων καθώς ακολουθεί την ενδογενή οδό πήξης. Τα μικροκυστίδια έχουν επίσης την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη S. Ακόμα, η παρουσία πλασμινογόνου στην επιφάνειά τους, τους επιτρέπει να βοηθούν στην αντιπηκτική αντίδραση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C και της ινωδολυτικής δραστηριότητας (31).

Σε περιπτώσεις δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, έχουν εντοπιστεί αυξημένα ποσά τέτοιων μικροκυστιδίων αυξάνοντας την πηκτικότητα του αίματος αυτών των ασθενών σε σύγκριση με υγιή άτομα. Ακόμα, σε περίπτωση κρίσης λόγω της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, υπάρχει περαιτέρω αύξηση των μικροκυστιδίων. Παρόλα αυτά, κάποιες έρευνες έδειξαν ότι δεν υπήρχε αύξηση των μικροκυστιδίων σε περιπτώσεις δρεπανοκυτταρικής αναιμίας και όπου υπήρχε αύξηση, αυτά τα μικροκυστίδια είχαν προέλθει από διαφορετικές πηγές. Οι κύριοι παράγοντες που επιταχύνουν τον χρόνο παραγωγής της θρομβίνης στο πλάσμα ατόμου με δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι τα μικροκυστίδια από ερυθροκύτταρα που εκφράζουν φωσφατιδιλοσερίνη. Τα μικροκυστίδια από ερυθροκύτταρα εμφανίζουν αύξηση σε δρεπανοκυτταρικές αναιμίες με αποτέλεσμα να συμβάλουν στην πηκτικότητα αλλά και στην παθοφυσιολογία της ασθένειας αυτής. Σε περιπτώσεις σπληνεκτομίας από βακτηριακή μόλυνση, τα επίπεδα αυτών των μικροκυστιδίων εντοπίστηκαν ανεβασμένα ενώ όσοι δεν είχαν υποβληθεί στην σπληνεκτομή, δεν είχαν παρουσιάσει τέτοια αύξηση. Μια ακόμα ασθένεια στην οποία εμφανίζεται αύξηση των μικροκυστιδίων από ερυθροκύτταρα είναι η παροξυσμική νυχτερινή αιμοσφαιρινουρία. Σε αυτή την ασθένεια όμως τα πιο σημαντικά για την προθρομβωτική κατάσταση, δεν είναι τα μικροκυστίδια των ερυθροκυττάρων αλλά των αιμοπεταλίων (31).

Τα μικροκυστίδια βρίσκουν θεραπευτικές εφαρμογές σε μια πληθώρα οργάνων και για διαφορετικές ασθένειες. Η ικανότητά τους να μεταφέρουν miRNA ή siRNA σε παρεγχυματικά και καρκινικά κύτταρα τα καθιστά ικανά μέσα για θεραπεία. Όργανα όπως το ήπαρ, οι πνεύμονες καθώς και τα νεφρά μπορούν να επωφεληθούν αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και εναντίων παθήσεων του κεντρικού νευρικού συστήματος, καρδιαγγειακές παθήσεις και σε περιπτώσεις καρκίνου. Τα μικροκυστίδια δεν προκαλούν έντονη ανοσολογική απόκριση με αποτέλεσμα να έχουν ένα πλεονέκτημα απέναντι στα λιποσώματα για μεταφορά ουσιών. Επίσης, αν τα ερυθροκύτταρα διεγερθούν θα μπορούν να παράξουν τέτοια μικροκυστίδια με κατάλληλο RNA για τη θεραπεία που χρειάζεται (31).

1.3.3 Αλλαγές τους από τη χρήση αλκοόλ και την ηπατική ανεπάρκεια

Έχει παρατηρηθεί αύξηση στη συγκέντρωση των μικροκυστιδίων σε ασθενείς με ηπατική νόσο που οφείλεται σε αλκοόλ αλλά και σε ασθενείς με αλκοολική ηπατίτιδα όπου οι συγκεντρώσεις τους είναι ακόμα υψηλότερες. Ο αριθμός των μικροκυστιδίων, συσχετίζεται με τη βαθμολογία MELD του κάθε ασθενούς (7,8,33). Το ίδιο παρατηρείται και σε εκείνους που καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες αλκοόλ ακόμα και αν δεν έχουν κάποιο νόσημα. Τα μικροκυστίδια που προέρχονται από τα ηπατοκύτταρα και μονοκύτταρα από αλκοολική ηπατίτιδα, έχουν την ικανότητα να προκαλούν έμμεσα φλεγμονή. Το καταφέρνουν με το να διεγείρουν τα μακροφάγα, που με τη σειρά τους είναι αυτά που θα προκαλέσουν την φλεγμονή. Τα μικροκυστίδια το καταφέρνουν αυτό πιθανών χρησιμοποιώντας miRNAs όπως τα miR-122 και miR-155 (7,8). Απότομη ή χρόνια χρήση αλκοόλ, οδήγησε στη δημιουργία μικροκυστιδίων που περιείχαν μεγάλες ποσότητες miR-122 και φαίνεται πως αυτή η παραγωγή είναι σχετική με το ποσό της αλκοόλης που καταναλώνεται. Το miR-122 είναι ικανό να προκαλέσει αναστολή της οξυγενάσης-1, με το να τα κάνει πιο ευαίσθητα στη διέγερση του LPS τα μονοκύτταρα, και την έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών σε αυτά. Σε περίπτωση όμως όπου προστεθούν στον οργανισμό εξωσώματα τα οποία φέρουν αναστολέα miR-122, τότε αποτρέπουν την παραγωγή φλεγμονής από αυτή την οδό. Αυτό μας δείχνει ότι τα εξωσώματα και γενικά τα μικροκυστίδια, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε θεραπείες (34). Ακόμα, τα μακροφάγα,

τα διέγειραν και οι πρωτεΐνες των μικροκυστιδίων των ηπατοκυττάρων. Οι πρωτεΐνες αυτές, όταν εκτέθηκαν στην αιθανόλη, ενεργοποίησαν τα μακροφάγα τα οποία παρήγαγαν προφλεγμονώδη κυτοκίνες. Επιπλέον, σε παρουσία αλκοόλ, και τα μακροφάγα απελευθερώνουν μικροκυστίδια. Τα μικροκυστίδια που απελευθερώθηκαν κατά την επαφή των ηπατοκυττάρων με το αλκοόλ περιείχαν CD40 εξαρτώμενο από την κασπάση (7).

Για την ενεργοποίηση της κασπάσης ευθύνεται και το αλκοόλ το οποίο με αυτόν τον τρόπο παράγει μικροκυστίδια από τα ηπατοκύτταρα. Ακόμα, τα μικροκυστίδια αυτά φαίνεται πως έφεραν CD40L το οποίο προκαλεί την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών. Φαίνεται πως το CD40L είναι μια σύνδεση μεταξύ ηπατοκυττάρων και ανοσοκυττάρων κατά την παρουσία αλκοόλ. Μικροκυστίδια παραγόμενα σε άτομα με αλκοολική ηπατική νόσο είναι διαφορετικά ως προς τη πρωτεΐνη που βρίσκεται στο περιεχόμενό τους από εκείνα που προήλθαν από εκείνα που δεν είχαν κάποια νόσο. Τα μικροκυστίδια από ηπατική νόσο περιέχουν μέσα την πρωτεΐνη Hsp90 η οποία εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των μακροφάγων από τον αντικαρκινικό παράγοντα Taxol και από το βακτηριακό LPS (34).

Άλλο ένα παράδειγμα για την ρυθμιστική θέση των μικροκυστιδίων είναι ότι τα ηπατοκύτταρα και τα μακροφάγα Kupffer του ήπατος σε ποντίκια, αν τους δοθούν μικροκυστίδια που παράγονται σε καταστάσεις αλκοολικής ηπατοπάθειας, τα προσλαμβάνουν. Αυτό τα οδηγεί να παράγουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως MCP-1 και TNF- α ενώ ταυτόχρονα να έχουν μειωμένες ποσότητες αντιφλεγμονωδών κυτοκινών και φαίνεται πως η πρωτεΐνη υπεύθυνη για την ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων ήταν η Hsp90 (7). Μια ακόμα λειτουργία του αλκοόλ είναι το να προκαλεί την απελευθέρωση μικροκυστιδίων από τα ηπατοκύτταρα τα οποία περιέχουν το κυτόχρωμα P450 CYP2E1. Η λειτουργία αυτού του ενζύμου είναι ο μεταβολισμός της αλκοόλης. Όμως τα μικροκυστίδια που το περιέχουν συμμετέχουν στην τοξικότητα προς τα μονοκύτταρα. Επιπλέον, επειδή απελευθερώνονται μικροκυστίδια από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, πραγματοποιείται συσσώρευση λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα από τον άξονα εντέρου-ήπατος (8).

Όταν τα μικροκυστίδια του ήπατος που κυκλοφορούν, έρθουν σε επαφή με αλκοόλ, μπορεί να υποστούν κάποιες αλλαγές στο περιεχόμενό τους. Αν αυτά τα μικροκυστίδια μεταφερθούν σε άλλα κύτταρα, μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονώδεις καταστάσεις ή να επιδεινώσουν την φλεγμονή που προκαλείται από το αλκοόλ (34).

Τα μικροκυστίδια συμβάλουν και στην προώθηση της αλκοολικής ηπατοπάθειας με το να απελευθερώνονται σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες από τα ηπατοκύτταρα. Καθώς φεύγουν από τα κύτταρα που τα απέβαλαν, κουβαλούν και ουσίες που είναι τοξικές για τα ηπατοκύτταρα που θα τα δεχτούν, προκαλώντας, ενδεχομένως, τον κυτταρικό τους θάνατο (7). Ακόμα, τα τραυματισμένα από αλκοόλ ηπατοκύτταρα, ελευθερώνουν μικροκυστίδια που είναι εμπλουτισμένα με mtDNA το οποίο προκαλεί ηπατοτοξικότητα και κάνει τα ουδετερόφιλα να συσσωρευτούν στο ήπαρ με αποτέλεσμα την αλκοολική στεατοηπατίτιδα (8). Αν κάποιο άτομο καταναλώσει μεγάλες ποσότητες αλκοόλ, τότε απελευθερώνονται πολλά μικροκυστίδια, πιο πολλά από ότι συμβαίνει σε υγιείς ή σε χρόνιους χρήστες αλκοόλ (7). Από όλα αυτά φαίνεται πως τα μικροκυστίδια είναι ρυθμιστές και υπεύθυνα για την φλεγμονώδη αντίδραση στην αλκοολική ηπατοπάθεια (7).

Κεφάλαιο 2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά

I. Μηχανήματα

- A. Φυγόκεντρος
- B. Ψυχώμενη φυγόκεντρος
- C. Κλίβανος
- D. Φωτόμετρο
- E. Vortex
- F. Ηλεκτρονική ζυγαριά
- G. Αναδευτήρας ρόδα
- H. Μικροσκόπιο

II. Υλικά και εξοπλισμός

- A. Πιπέτες
- B. Σωληνάκια
- C. Eppendorf
- D. Κωνικές φιάλες
- E. Πουάρ
- F. Κυψελίδες
- G. Αποσταγμένο νερό
- H. Water for injection

III. Υλικά πειραμάτων

- A. Διάλυμα NaCl 0,9%
- B. dH₂O
- C. PBS 310 mosm
- D. Sucrose Buffer 0,7M
- E. Φαιλυδραζίνη PHZ 17mM
- F. Μπίλιες Rocked
- G. Αντικειμενοφόρες πλάκες
- H. Καλυπτρίδες

2.2 Μέθοδοι

Αιμόλυση

Η αιμόλυση μετρήθηκε με τα επίπεδα της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στον πλάσμα των ασθενών. Χρησιμοποιήθηκε ολικό αίμα σε EDTA το οποίο φυγοκεντρήθηκε στα 1000g για 10 λεπτά. Στην συνέχεια αφαιρέθηκε το πλάσμα για να αραιωθεί. Η αραιώση έγινε 1:10 με W.F.I.. 1350 μλ και 150μl πλάσματος. Έπειτα αναδεύτηκε σε vortex για μερικά δευτερόλεπτα και αφέθηκε να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Τέλος, το αραιωμένο πλάσμα, φωτομετρήθηκε με χρήση θολής κυψελίδας στα 380, 415 και 450 nm. Για τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε νερό σε θολή κυψελίδα.

Οσμωτική Αιμόλυση

Για την μέτρηση του ποσοστού της οσμωτικής αιμόλυσης χρησιμοποιήθηκε ολικό αίμα. 20 μl ολικού αίματος τοποθετήθηκαν μέσα σε κάθε σωληνάριο το οποίο περιείχε 2ml διάλυμα NaCl αυξανόμενης συγκέντρωσης. Οι συγκεντρώσεις % NaCl των σωληναρίων ήταν: 0, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5 και 0,55. Τα σωληνάρια με το ολικό αίμα αναδεύονται με vortex με ήπιο και ομοιόμορφο τρόπο. Επωάζονται, έπειτα, σε θερμοκρασία δωματίου για

15 λεπτά. Μετά φυγοκεντρώνται στις 1500 στροφές για 5 λεπτά και τέλος φωτομετρούνται στα 540 nm χρησιμοποιώντας νερό για τυφλό.

Μηχανική ευθραυστότητας

Το δείγμα είναι 1050μl ολικό αίμα το οποίο φυγοκεντρείται στα 1000g για 10 λεπτά. Στην συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο ώστε να έχει το δείγμα αιματοκρίτη ίσο με 80%. Έπειτα το δείγμα αραιώνεται στο 1/4 για να γίνει ο αιματοκρίτης του 20% προσθέτοντας PBS 310 mosm ίσο με τα 3/4 του δείγματος.

Για την ενδοκυττάρια Hb κατά Harbae χρησιμοποιείται το δείγμα Hct 20%: Πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος ώστε να έχει τελική αραιώση 1/2.500. Για να αραιωθεί 1/10 προσθέτονται σε 90μl dH₂O, 10μl δείγματος με Hct 20%. Η ανάδευση γίνεται με vortex και το επωάζεται πάνω στον πάγκο για 5 λεπτά. Μετά φυγοκεντρείται στα 1000g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και λαμβάνονται 5 μl από το υπερκείμενο ώστε να τα προστεθούν σε 1245 μl dH₂O για να γίνει η αραιώση 1/2.500. Η ανάδευση γίνεται πάλι με vortex και επωάζεται για 5 λεπτά πάνω στον πάγκο. Τέλος, η φωτομέτρηση πραγματοποιείται σε 380, 415, 450 nm στο τελικό δείγμα(1/2.500)

Για την Rocked και NON Rocked χρησιμοποιείται το δείγμα με 20% Hct. Σε ένα erpendorf που περιέχει 550μl από το δείγμα, προσθέτονται 2 μπίλιες Rocked. Τοποθετείται στην ρόδα ανάδευσης για μια ώρα ώστε να χτυπηθεί το δείγμα με τη μπίλια. Σε erpendorf χωρίς μπίλια προσθέτονται 450 μl δείγματος το οποίο επωάζεται μετά στον πάγκο για μια ώρα. Μετά την μία ώρα που έχει το erpendorf στη ρόδα, 450 μl του μεταφέρονται του σε άλλο erpendorf. Τα δύο erpendorf, το ένα με το υλικό που είχε τη μπίλια και το άλλο που δεν την είχε, φυγοκεντρώνται σε 2750g στους 4°C για 15 λεπτά. 200 μl από το υπερκείμενο μεταφέρονται στα αντίστοιχα erpendorfs. Τα καινούργια erpendorfs φυγοκεντρώνται σε 2800g στους 4°C για 20 λεπτά. Μεταφέρονται μετά 100μl υπερκείμενο σε erpendorfs με 900μl dH₂O. Τέλος, φωτομετρούνται στα 380, 415, 450 nm.

Οξειδωτική αιμόλυση

Αρχικός το δείγμα φυγοκεντρείται σε 1000g για 10 λεπτά και χρησιμοποιούνται 50μl πακεταρισμένων ερυθρών του. Τα πακεταρισμένα ερυθροκύτταρα αραιώνονται 1:10 προσθέτοντας τα σε 450 μl PBS 310mosm. Έπειτα προσθέτονται 24,23μl φαινυλδραζίνη PHZ

17mM και το επώζονται για 1 ώρα σε 37°C. Στην συνέχεια φυγοκεντρούνται σε 1000g για 10 λεπτά και μετά 100μl μεταφέρονται από το υπερκείμενο σε ένα erpendorf που έχει 900μl dH₂O. Η ανάδευση πραγματοποιείται με vortex και η επώαση κρατάει 5 λεπτά στον πάγκο. Τέλος, η φωτομέτρηση πραγματοποιείται στα 380, 415 και 450 nm με χρήση θολής κυψελίδα.

Κρυσταλλοποίηση

Η προετοιμασία του δείγματος απαιτεί να πραγματοποιηθούν τρεις πλύσεις στα ερυθρά. 0,5ml αίματος τοποθετούνται μέσα σε ένα erpendorf το οποίο στη συνέχεια το συμπληρώνεται με 0,9% διάλυμα NaCl έως ότου γεμίσει. Η φυγοκέντρηση γίνεται στις 3000 rpm για 10 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο και μετά πραγματοποιείται αφαίρεση του υπερκείμενου. Για κάθε επόμενη πλύση, το διάλυμα NaCl συμπληρώνεται έως ότου γεμίσει και επαναλαμβάνεται τη φυγοκέντρηση. Σε σωληνάρια τοποθετούνται 2ml Sucrose Buffer 0,7M για κάθε δείγμα για το duplicate. Τα σωληνάρια αφήνονται για 10 λεπτά στους 37°C. Έπειτα προσθέτονται 50 μl πλυμένων ερυθρών στα 2 σωληνάρια με Sucrose Buffer και σε δύο σωληνάρια που περιέχουν 2ml W.F.I.. Η ανάδευση γίνεται με χρήση vortex για 10 με 15 δευτερόλεπτα και μετά επώζονται για 10 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε πάγο για 10 λεπτά και μετά αναδεύονται με vortex για λίγα δευτερόλεπτα. Φυγοκεντρούνται σε θερμοκρασία δωματίου στις 3000rpm για 10 λεπτά και τέλος μετρούνται στο φωτόμετρο στα 540 nm. Αν η τιμή της φωτομέτρησης είναι πολύ υψηλή, πραγματοποιείται αραιώση 200μl δείγματος στα σωληνάρια σε 4ml W.F.I.. Τέλος, για το αποτέλεσμα, χρησιμοποιείται ο τύπος %κρυσταλλοποίηση= απορρόφηση_{540test}/ απορρόφηση_{540αιμόλυση}100%.

Μικροσκόπηση αποτελεσμάτων

Η προετοιμασία του δείγματος απαιτεί την επίστρωση αίματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα και στην συνέχεια την χρώση της με χρώση May-Grunwald-Giemsa. Αρχικός, το στεγνό επιστρωμένο πλακάκι καλύπτεται με μεθανόλη για 5 λεπτά. Μετά αφαιρείται από την μεθανόλη και απορρίπτεται η περίσσειά της. Στην συνέχεια καλύπτεται με τη χρώση May-Grunwald για 4 λεπτά. Μετά αφαιρείται από τη χρώση και απορρίπτεται η περίσσειά της. Στην συνέχεια, καλύπτεται με χρώση Giemsa για 15 λεπτά. Μετά αφαιρείται από τη χρώση και

απορρίπτεται η περίσσειά της. Τέλος πραγματοποιείται ξέπλυμα με άφθονο νερό βρύσης και το αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

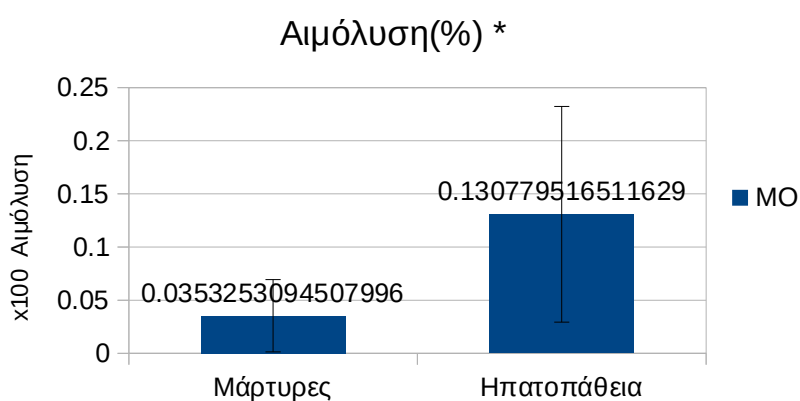
Αφού η χρώση ολοκληρωθεί και τα πλακάκια είναι έτοιμα για χρήση, μικροσκοπούνται με καταδυτικό φακό x1000 και μετρούνται οι μη φυσιολογικές μορφές που μπορεί να έχουν τα ερυθροκύτταρα, όπως τα εχिनοκύτταρα και τα σφαιροκύτταρα, σε δέκα οπτικά πεδία τα οποία περιέχουν τουλάχιστον 100 ερυθρά. Τέλος, γίνεται υπολογισμός του μέσου όρου που έχει κάθε δείγμα. Για διευκόλυνση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Infinity Capture το οποίο επέτρεψε την λήψη φωτογραφιών και μετρήσεων από το κάθε δείγμα.

Η προετοιμασία του δείγματος για τη μέτρηση της διαμέτρου των κυττάρων είναι παρόμοια με εκείνη για τον υπολογισμό των παθολογικών μορφών των ερυθροκυττάρων. Χρησιμοποιήθηκαν ο ίδιο φακός και τα πεδία με την προηγούμενη εξέταση αλλά μετρήθηκε η διάμετρος των κυττάρων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Infinity Capture για τις εικόνες και τις μετρήσεις. Δεν μετρήθηκε η διάμετρος σε κύτταρα που είχαν παραμορφωθεί από την επίστρωση.

Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα

Αιμόλυση

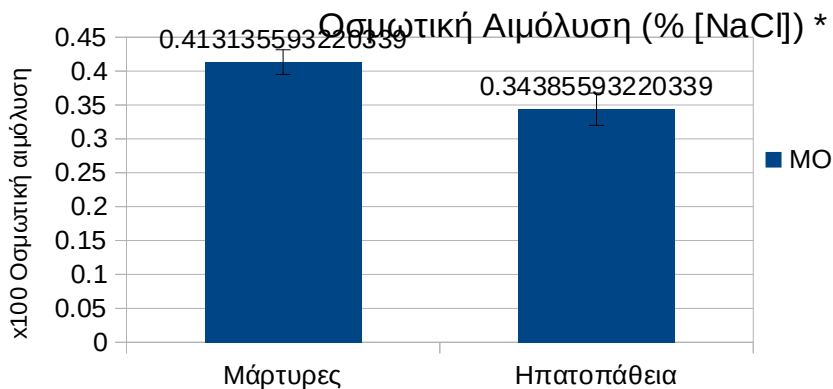
Οι μάρτυρες εμφάνισαν φυσιολογικές τιμές αιμόλυσης ενώ στους ασθενείς που είχαν ηπατοπάθεια εμφανίστηκε αύξηση στον μέσο όρο με στατιστική σημασία. Ο μέσος όρος των μαρτύρων που βρέθηκε ήταν 3,5% με τυπική απόκλιση 3%. Αντίστοιχα στους ασθενείς με ηπατοπάθεια ο μέσος όρος που βρέθηκε να είναι 13% με τυπική απόκλιση 10%.



Διάγραμμα 1: Αιμόλυση(%). Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατοπάθεια. *=στατιστική σημασία $p < 0,05$

Οσμωτική αιμόλυση

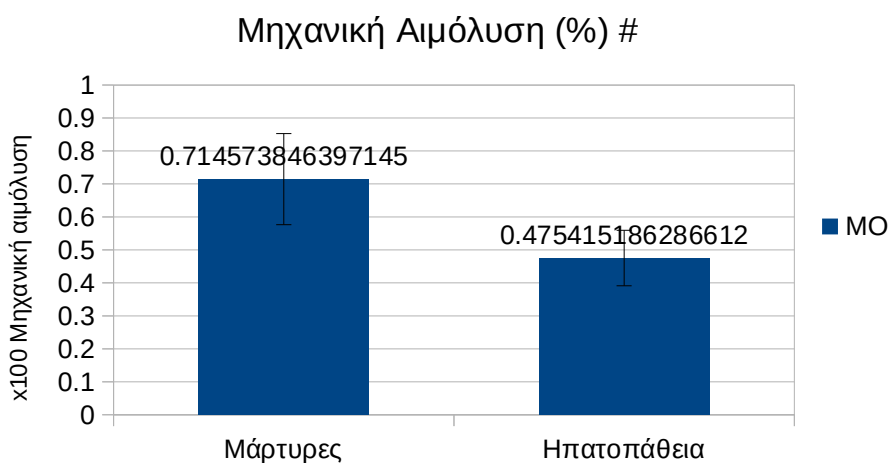
Οι μάρτυρες είχαν μέσο όρο 41% g/L NaCl για 50% αιμόλυση ενώ στους ασθενείς με ηπατοπάθεια βρέθηκε ο μέσος όρος 34% g/L NaCl για 50% αιμόλυση. Η τυπική απόκλιση και στις δύο περιπτώσεις ήταν 2% g/L NaCl. Η διαφορά μεταξύ των μαρτύρων και των ασθενών με ηπατοπάθεια είναι στατιστικής σημασίας και φαίνεται πως τα ερυθρά των ασθενών είναι πιο ανθεκτικά στην οσμωτική αιμόλυση.



Διάγραμμα 2: Οσμωτική αιμόλυση%. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατοπάθεια. *=στατιστική σημασία $p < 0,05$

Μηχανική αιμόλυση

Οι μάρτυρες είχαν 71% αιμόλυση μέσο όρο και 14% τυπική απόκλιση ενώ οι ασθενείς με ηπατοπάθεια είχαν 48% αιμόλυση μέσο όρο με 8% τυπική απόκλιση. Παρατηρείται ότι υπάρχει μια στατιστική τάση, οι ασθενείς να έχουν πιο ανθεκτικά ερυθροκύτταρα απέναντι στην μηχανική καταπόνηση σε αντίθεση με τα υγιή άτομα.

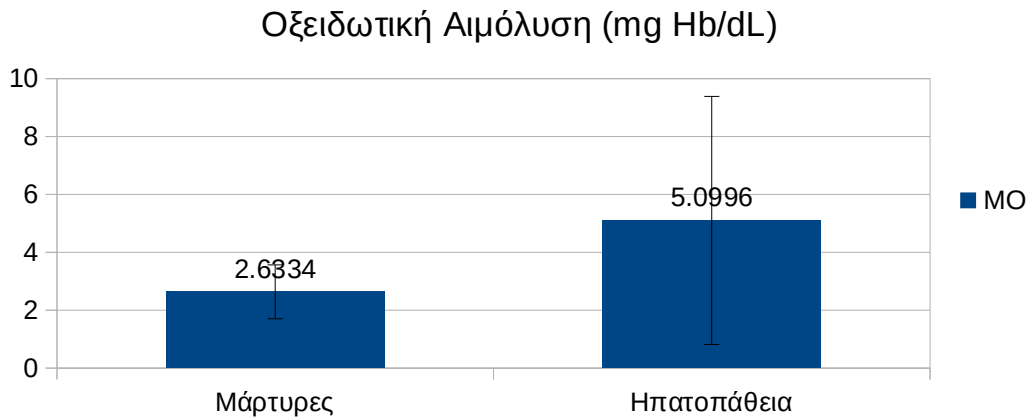


Διάγραμμα 3: Μηχανική αιμόλυση. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατοπάθεια. # =στατιστική τάση $0,05 < p < 0,100$

Οξειδωτική αιμόλυση

Δε φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση ανάμεσα στους μάρτυρες και στους ασθενείς με ηπατοπάθεια. Ο μέσος όρος των μαρτύρων ήταν 2,63 mg Hb/dL με τυπική απόκλιση 0,93 mg Hb/dL ενώ στους ασθενείς με ηπατοπάθεια ο μέσος όρος ήταν 5,10 mg Hb/dL και η τυ-

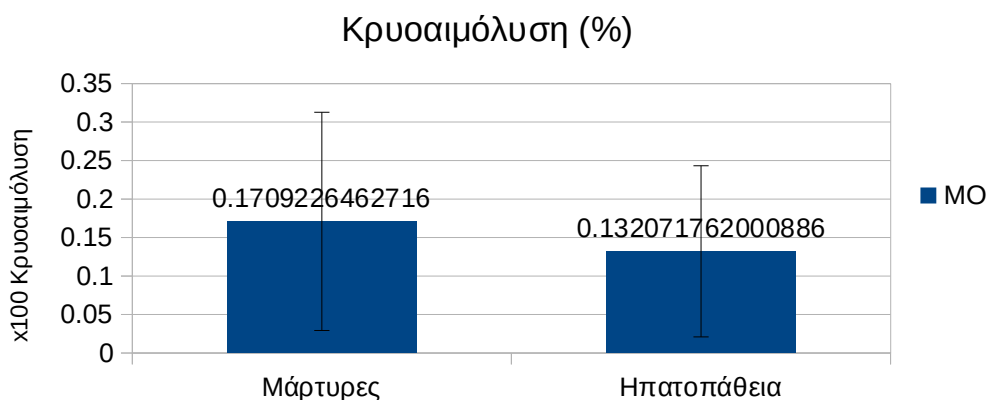
πική απόκλιση 4,28 mg Hb/dL . Ενδέχεται να εμφανιστεί διαφορά σε μεγαλύτερο πληθυσμό δειγμάτων.



Διάγραμμα 4: Οξειδωτική αιμόλυση (mg Hb/dL). Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατοπάθεια.

Κρυσαιμόλυση

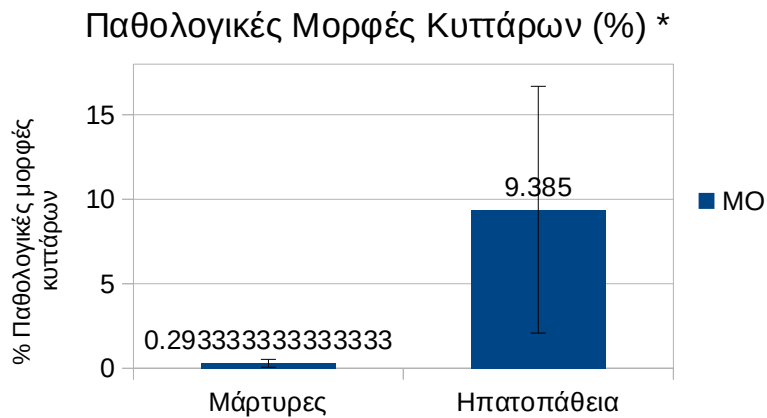
Οι ασθενείς με ηπατοπάθεια βρέθηκε να έχουν μέσο όρο 13% αιμόλυση με τυπική απόκλιση ίση με 11% ενώ οι μάρτυρες είχαν μέσο όρο 17% αιμόλυση με τυπική απόκλιση ίση με 14%. Από τα αποτελέσματα δε φαίνεται να υπάρχει κάποια διαφορά μεταξύ αυτών των δύο ομάδων.



Διάγραμμα 5: Κρυσαιμόλυση%. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατοπάθεια.

Παθολογικές μορφές κυττάρων

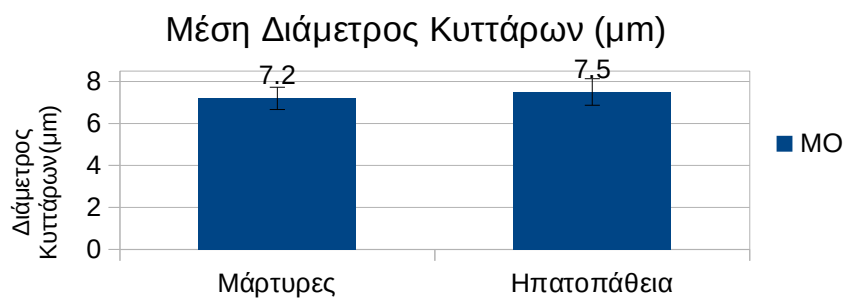
Από τις παρατηρήσεις βρέθηκε πως οι παθολογικές μορφές των ερυθροκυττάρων των μαρτύρων ήταν 0,3 στα 100 ερυθροκύτταρα με τυπική απόκλιση 0,23 ενώ οι παθολογικές μορφές ερυθροκυττάρων στους ασθενείς ήταν 9,39 στα 100 ερυθροκύτταρα με τυπική απόκλιση 7,30. Αυτό δείχνει μια αύξηση στατιστικής σημασίας στις παθολογικές μορφές των ερυθροκυττάρων στους ασθενείς με αλκοολική ηπατική νόσο.



Διάγραμμα 6: Παθολογικές μορφές κυττάρων. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατοπάθεια. *=στατιστική σημασία $p < 0,05$

Μέση διάμετρος κυττάρων

Οι παρατηρήσεις δείχνουν πως δεν υπάρχει κάποια στατιστική διαφορά στη διάμετρο των ερυθροκυττάρων καθώς η μέση διάμετρος των ερυθροκυττάρων των μαρτύρων ήταν 7,20μm με τυπική απόκλιση 0,53μm ενώ στους ασθενείς ήταν 7,50μm με τυπική απόκλιση 0,63μm.



Διάγραμμα 7: Μέση διάμετρος κυττάρων. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατοπάθεια

Κεφάλαιο 4. Συζήτηση

Το ήπαρ είναι υπεύθυνο για σημαντικές, για τον οργανισμό, λειτουργίες. Όμως το αλκοόλ που μπορεί να καταναλώνει ένας άνθρωπος ενδέχεται να το τραυματίσει και να μειώσει την λειτουργικότητά του. Κατά την διάρκεια του μεταβολισμού του παράγονται τοξικά μόρια που καταστρέφουν κύτταρα και ένζυμα όπως είναι η ακεταλδεΐδη. Όσο το ήπαρ έρχεται σε επαφή με αυτή την ουσία, τα ηπατοκύτταρά του δέχονται ζημιά και χάνουν την λειτουργικότητά τους (1,2,16,17). Ακόμα, το αλκοόλ, μπορεί να αυξήσει τη συγκέντρωση λίπους στο ήπαρ με το να χρησιμοποιεί τα NAD και NADH που χρειάζεται η διαδικασία του μεταβολισμού των λιπιδίων για να πραγματοποιηθεί (10). Τα ερυθροκύτταρα βασίζονται όμως στο ήπαρ καθώς παράγει την εψιδίνη η οποία είναι μια πρωτεΐνη που ρυθμίζει την ομοιόσταση του σιδήρου. Υπερέκφραση εψιδίνης μπορεί να οδηγήσει σε σιδηροπενική αναιμία και προβλήματα στην παραγωγή ερυθροκυττάρων ενώ μια έλλειψη της έκφρασής της ενδέχεται να προκαλέσει υπερφόρτωση σιδήρου (19).

Μια ακόμα λειτουργία του ήπατος είναι να απομακρύνει τα γηρασμένα και προβληματικά ερυθροκύτταρα από την κυκλοφορία του αίματος. Το καταφέρνει αυτό με τη βοήθεια των μακροφάγων του, τα κύτταρα Korfer (20). Τα κύτταρα Korfer μπορούν και να παράγουν προσταγλανδίνη E2 για να αυξάνουν την ποσότητα οξυγόνου που λαμβάνουν τα ηπατοκύτταρα όταν την χρειάζονται, όπως γίνεται σε στιγμές που πρέπει να χρησιμοποιήσει μεγαλύτερες ποσότητες NAD και NADH και σε περίπτωση κατανάλωσης μεγάλης ποσότητας αλκοόλ (18).

Η παραγωγή των ερυθροκυττάρων εμφανίζει προβλήματα και από την παρατεταμένη παρουσία αλκοόλ στον οργανισμό. Οι χρόνιοι αλκοολικοί έχουν συνήθως έλλειψη σε φολικό οξύ και σε βιταμίνες λόγω της διατροφής τους και της δυσκολίας απορρόφησης φολικού οξέως από τη παρουσία της αιθανόλης. Επιπλέον, το αλκοόλ βλάπτει και το μυελό των οστών, μειώνοντας την ικανότητά του στην ερυθροποίηση. Αυτό οφείλεται στο ότι και ο μυελός πραγματοποιεί μέρος του μεταβολισμού της αιθανόλης, όπως και το ήπαρ. Η έλλειψη σε φολικό οξύ μαζί με τον τραυματισμό του μυελού των οστών από τον μεταβολισμό της αιθανόλης, κάνουν τα πρώιμα πρόδρομα κύτταρα των ερυθροκυττάρων να μην έχουν σωστό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση (23,24).

Όταν το ήπαρ πλέον δεν είναι πλήρως λειτουργικό και ο μυελός των οστών αδυνατεί να λειτουργήσει σωστά, τα ερυθροκύτταρα που εξαρτώνται από αυτά χάνουν

μέρος της φυσιολογικής τους δομής (22,23) και πολλά από αυτά αποκτούν μη φυσιολογικές δομές όπως φάνηκε και στις μικροσκοπήσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της εργασίας.

Επιπλέον, εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσά αιμόλυσης στον οργανισμό (5,23) αλλά και αυξημένη αντοχή σε ορισμένες συνθήκες όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της εργασίας. Η αιμόλυση των ασθενών ήταν μεγαλύτερη από την αιμόλυση των μαρτύρων αλλά τα κύτταρα βρέθηκαν ότι είχαν αντοχή σε μηχανική, οσμωτική και λύση λόγω ψύχους. Για την αιμόλυση ενδέχεται να ευθύνεται η αιμόλυση από οξειδωτικό στρες αλλά δεν γίνεται να επιβεβαιωθεί λόγω χαμηλού αριθμού δειγμάτων. Εκτός από οξειδωτικό στρες, μπορεί να ευθύνεται και κάποια λύση ερυθροκυττάρων ανοσολογικής αιτίας.

Ακόμη μια επίδραση του αλκοόλ στα κύτταρα του οργανισμού είναι ως προς τη μεμβράνη τους (23,24). Τόσο τα κύτταρα, όσο και τα μικροκυστίδιά τους, αλλάζουν από τη παρουσία του αλκοόλ. Όταν ένα κύτταρο έχει τραυματισμένη μεμβράνη και παράξει ένα μικροκυστίδιο, τότε και αυτό θα φέρει παρόμοια βλάβη. Μικροκυστίδια παράγουν και τα κύτταρα εκείνα που οδηγούνται σε απόπτωση (25). Επιπλέον, όσο βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος, το αλκοόλ συνεχίζει να επηρεάζει τα μικροκυστίδια (6). Τέλος, η εκτεταμένη χρήση του αλκοόλ φαίνεται πως έχει αρνητικές επιδράσεις σε όλο τον οργανισμό που μπορούν, μακροχρόνια, να φανούν καταστροφικές (12,13).

Κεφάλαιο 5. Βιβλιογραφία

1. Gao E, Hercun J, Heller T, Vilarinho S. Undiagnosed liver diseases. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2021 Apr 5;6:28.
2. Osna NA, Rasineni K, Ganesan M, Donohue TM, Kharbanda KK. Pathogenesis of Alcohol-Associated Liver Disease. *J Clin Exp Hepatol*. 2022;12(6):1492–513.
3. Alcohol and the Human Body | National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) [Internet]. [cited 2024 Mar 20]. Available from: <https://www.niaaa.nih.gov/alcohols-effects-health/alcohol-topics/alcohol-facts-and-statistics/alcohol-and-human-body>
4. Thursz M, Gual A, Lackner C, Mathurin P, Moreno C, Spahr L, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of alcohol-related liver disease. *Journal of Hepatology*. 2018 Jul 1;69(1):154–81.
5. Bulle S, Reddy VD, Padmavathi P, Maturu P, Puvvada PK, Nallanchakravarthula V. Association between alcohol-induced erythrocyte membrane alterations and hemolysis in chronic alcoholics. *J Clin Biochem Nutr*. 2017 Jan;60(1):63–9.
6. Tóth ME, Vigh L, Sántha M. Alcohol stress, membranes, and chaperones. *Cell Stress Chaperones*. 2014 May;19(3):299–309.
7. Cho YE, Song BJ, Akbar M, Baek MC. Extracellular vesicles as potential biomarkers for alcohol- and drug-induced liver injury and their therapeutic applications. *Pharmacol Ther*. 2018 Jul;187:180–94.
8. Kostallari E, Valainathan S, Biquard L, Shah VH, Rautou PE. Role of extracellular vesicles in liver diseases and their therapeutic potential. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021 Aug;175:113816.
9. Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, Tuma F. Physiology, Liver. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Apr 2]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>
10. Ha Y, Jeong I, Kim TH. Alcohol-Related Liver Disease: An Overview on Pathophysiology, Diagnosis and Therapeutic Perspectives. *Biomedicines*. 2022 Oct 10;10(10):2530.
11. Stickel F, Datz C, Hampe J, Bataller R. Pathophysiology and Management of Alcoholic Liver Disease: Update 2016. *Gut Liver*. 2017 Mar;11(2):173–88.
12. Liu SY, Tsai IT, Hsu YC. Alcohol-Related Liver Disease: Basic Mechanisms and Clinical Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2021 May 13;22(10):5170.
13. Ballester MP, Sittner R, Jalan R. Alcohol and Acute-on-Chronic Liver Failure. *J Clin Exp Hepatol*. 2022;12(5):1360–70.

14. Idalsoaga F, Kulkarni AV, Mousa OY, Arrese M, Arab JP. Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Alcohol-Related Liver Disease: Two Intertwined Entities. *Front Med (Lausanne)*. 2020 Aug 20;7:448.
15. Zhu L, Li HD, Xu JJ, Li JJ, Cheng M, Meng XM, et al. Advancements in the Alcohol-Associated Liver Disease Model. *Biomolecules*. 2022 Jul 27;12(8):1035.
16. Hyun J, Han J, Lee C, Yoon M, Jung Y. Pathophysiological Aspects of Alcohol Metabolism in the Liver. *Int J Mol Sci*. 2021 May 27;22(11):5717.
17. Teschke R. Alcoholic Liver Disease: Alcohol Metabolism, Cascade of Molecular Mechanisms, Cellular Targets, and Clinical Aspects. *Biomedicines*. 2018 Nov 12;6(4):106.
18. Zhong Z, Lemasters JJ. A Unifying Hypothesis Linking Hepatic Adaptations for Ethanol Metabolism to the Proinflammatory and Profibrotic Events of Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2018 Nov;42(11):2072–89.
19. Wang CY, Babitt JL. Liver iron sensing and body iron homeostasis. *Blood*. 2019 Jan 3;133(1):18–29.
20. Toboz P, Amiri M, Tabatabaei N, Dufour CR, Kim SH, Fillebeen C, et al. The amino acid sensor GCN2 controls red blood cell clearance and iron metabolism through regulation of liver macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Aug 30;119(35):e2121251119.
21. Nogueira-Pedro A, Santos GG dos, Oliveira DC, Hastreiter AA, Fock RA. Erythropoiesis in vertebrates: from ontogeny to clinical relevance. *FBE*. 2016 Jan 1;8(1):100–12.
22. Niemelä O, Halkola AS, Bloigu A, Bloigu R, Nivukoski U, Pohjasniemi H, et al. Blood Cell Responses Following Heavy Alcohol Consumption Coincide with Changes in Acute Phase Reactants of Inflammation, Indices of Hemolysis and Immune Responses to Ethanol Metabolites. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 22;23(21):12738.
23. Ballard HS. The Hematological Complications of Alcoholism. *Alcohol Health Res World*. 1997;21(1):42–52.
24. Mueller S, Chen C, Mueller J, Wang S. Novel Insights into Alcoholic Liver Disease: Iron Overload, Iron Sensing and Hemolysis. *J Transl Int Med*. 2022 Jul 10;10(2):92–124.
25. Ståhl A lie, Johansson K, Mossberg M, Kahn R, Karpman D. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatr Nephrol*. 2019;34(1):11–30.
26. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015 May 14;4:10.3402/jev.v4.27066.

27. Ma SR, Xia HF, Gong P, Yu ZL. Red Blood Cell-Derived Extracellular Vesicles: An Overview of Current Research Progress, Challenges, and Opportunities. *Biomedicines*. 2023 Oct 16;11(10):2798.
28. Asaro RJ, Cabrales P. Red Blood Cells: Tethering, Vesiculation, and Disease in Micro-Vascular Flow. *Diagnostics (Basel)*. 2021 May 27;11(6):971.
29. Chiangjong W, Netsirisawan P, Hongeng S, Chutipongtanate S. Red Blood Cell Extracellular Vesicle-Based Drug Delivery: Challenges and Opportunities. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Dec 24;8:761362.
30. Said AS, Doctor A. Influence of red blood cell-derived microparticles upon vasoregulation. *Blood Transfus*. 2017 Nov;15(6):522–34.
31. Thangaraju K, Neerukonda SN, Katneni U, Buehler PW. Extracellular Vesicles from Red Blood Cells and Their Evolving Roles in Health, Coagulopathy and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Jan;22(1):153.
32. Leal JKF, Adjobo-Hermans MJW, Bosman GJCGM. Red Blood Cell Homeostasis: Mechanisms and Effects of Microvesicle Generation in Health and Disease. *Front Physiol*. 2018 Jun 8;9:703.
33. Parthasarathy G, Hirsova P, Kostallari E, Sidhu GS, Ibrahim SH, Malhi H. Extracellular Vesicles in Hepatobiliary Health and Disease. *Compr Physiol*. 2023 Jun 26;13(3):4631–58.
34. Rahman MA, Patters BJ, Kodidela S, Kumar S. Extracellular vesicles: intercellular mediators in alcohol-induced pathologies. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2020 Sep;15(3):409–21.

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: (Μεταφρασμένο) Ερυθροκύτταρα σε απουσία και παρουσία αλκοόλ. Πηγή: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5281527/	2
Εικόνα 2: (Μεταφρασμένο) Η μεγάλη κατανάλωση αλκοόλ προκαλεί ένα ευρύ φάσμα ηπατικών βλαβών. Η στεάτωση (λιπώδες ήπαρ) είναι η πιο πρώιμη, πιο κοινή απόκριση που αναπτύσσεται σε περισσότερο από το 90 τοις εκατό των προβληματικών πότων που καταναλώνουν 4 έως 5 ποτά την ημέρα. Με τη συνεχή κατανάλωση αλκοόλ, η ηπατική νόσος που σχετίζεται με το αλκοόλ (ALD) μπορεί να εξελιχθεί σε φλεγμονή του ήπατος (δηλαδή στεατοηπατίτιδα), ίνωση, κίρρωση και καρκίνο του ήπατος (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα). Πηγή: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9630031/	6
Εικόνα 3: (Μεταφρασμένο) Πορεία μη αλκοολικής ηπατικής κίρρωσης. Πηγή: https://www.lecturio.com/concepts/nonalcoholic-fatty-liver-disease/	9
Εικόνα 4: (Μεταφρασμένο) Αντιδράσεις μετατροπής της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη. Πηγή: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6316574/	13
Εικόνα 5: (Μεταφρασμένο) Δημιουργία εξωσωμάτων, αποπτωτικών σωμάτων και μικροκυστιδίων. Πηγή: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5649961/	19
Εικόνα 6: (Μεταφρασμένο). Φυσιολογικό ερυθροκύτταρο. Πηγή: https://biology-igcse.weebly.com/blood-cells---structure-and-functions.html	23

Περιεχόμενα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Αιμόλυση(%). Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατοπάθεια. *=στατιστική σημασία $p<0,05$	33
Διάγραμμα 2: Οσμωτική αιμόλυση%. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατοπάθεια. *=στατιστική σημασία $p<0,05$	34
Διάγραμμα 3: Μηχανική αιμόλυση. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατοπάθεια. #=στατιστική τάση $0,05<p<0,100$	34
Διάγραμμα 4: Οξειδωτική αιμόλυση (mg Hb/dL). Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατοπάθεια.....	35
Διάγραμμα 5: Κρυσταλλοποίηση%. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατοπάθεια.....	35
Διάγραμμα 6: Παθολογικές μορφές κυττάρων. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατοπάθεια. *=στατιστική σημασία $p<0,05$	36
Διάγραμμα 7: Μέση διάμετρος κυττάρων. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατοπάθεια.....	36