



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

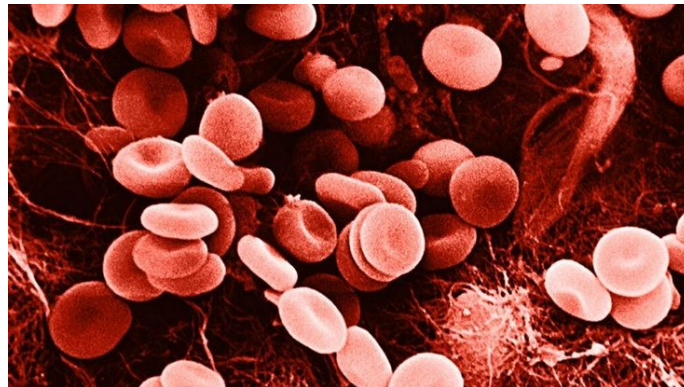


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Οξειδωτικό στρες και δείκτες γήρανσης σε ερυθροκύτταρα  
ασθενών με ηπατική νόσο**

POST GRADUATE THESIS

**Oxidative stress and senescence biomarkers in red blood cells of  
patients with liver disease**



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

**Ειρήνη Μοσχονά**  
Eirini Moschona

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  
**Oxidative stress and senescence biomarkers in red blood cells of patients  
with liver disease**

EIRINI MOSCHONA  
22017  
dml22017@uniwa.gr

FIRST SUPERVISOR  
ALKMINI ANASTASIADI

SECOND SUPERVISOR  
SOTIRIOS FORTIS

AIGALEO 2024

## Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 01/10/2024

Ονόματα εξεταστών

Υπογραφή

1<sup>ος</sup> Εξεταστής Αλκμήνη Αναστασιάδη



2<sup>ος</sup> Εξεταστής Σωτήριος Φόρτης

## **Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας**

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Ειρήνη Μοσχονά του Γεωργίου, με αριθμό μητρώου 22017 φοιτήτρια 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».

Η Δηλούσα

Ειρήνη Μοσχονά



## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας τους επιβλέποντες καθηγητές μου, κυρία Αλκμήνη Αναστασιάδη και κύριο Σωτήριο Φόρτη για την πολύτιμη καθοδήγηση και στήριξη τους από την αρχή μέχρι το τέλος της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Αναστάσιο Κριεμπάρδη, υπεύθυνο του ΠΜΣ 'Βιοϊατρικές Επιστήμες και Τεχνολογία στη Διάγνωση' και την ομάδα του για τις γνώσεις και την άψογη συνεργασία στο ερευνητικό κομμάτι της εργασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα κοντινά μου πρόσωπα που στάθηκαν δίπλα μου σε κάθε μου βήμα, με συμβούλεψαν και με ενθάρρυναν.

## **Αφιερώσεις**

Θα ήθελα να αφιέρωσω την εργασία αυτή στους γονείς μου.

## Περίληψη

**Εισαγωγή:** Η παρούσα ερευνητική εργασία με τίτλο "Οξειδωτικό στρες και δείκτες γήρανσης σε ερυθροκύτταρα ασθενών με ηπατική νόσο" περιλαμβάνει ανάλυση των ευρημάτων της μελέτης για την επίδραση του οξειδωτικού στρες και των βιοδεικτών γήρανσης στα ερυθροκύτταρα ασθενών με ηπατική νόσο.

**Σκοπός:** Η μελέτη διερευνά τη σχέση ανάμεσα στο οξειδωτικό στρες και τη διαδικασία γήρανσης των ερυθροκυττάρων σε ασθενείς με ηπατική νόσο, προσδιορίζοντας παράλληλα βιοδείκτες που σχετίζονται με τη φθορά και την καταστροφή αυτών των κυττάρων.

**Μέθοδος:** Η διαδικασία περιλαμβάνει δείγματα ερυθροκυττάρων από ασθενείς με ηπατική νόσο, τα οποία αναλύθηκαν για την παρουσία οξειδωτικών ριζών, την εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης και την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με το στρες και τη γήρανση των κυττάρων.

**Αποτελέσματα:** Τα αποτελέσματα δείχνουν αυξημένο οξειδωτικό στρες στα ερυθροκύτταρα των ασθενών με ηπατική νόσο, το οποίο επιταχύνει τη διαδικασία γήρανσης των κυττάρων και επηρεάζει την ακεραιότητά τους. Υπάρχει αυξημένη εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης και αύξηση των βιοδεικτών γήρανσης.

**Συμπεράσματα:** Η ηπατική νόσος οδηγεί σε αυξημένο οξειδωτικό στρες και επιτάχυνση της γήρανσης των ερυθροκυττάρων, γεγονός που συνδέεται με τη φθορά και την καταστροφή των κυττάρων αυτών. Οι βιοδείκτες γήρανσης μπορούν να χρησιμεύσουν ως δείκτες για την αξιολόγηση της βλάβης που προκαλείται από την ηπατική δυσλειτουργία.

Λέξεις κλειδιά: ήπαρ, οξειδωτικό στρες, γήρανση, ηπατική νόσος, αλκοολική ηπατική νόσος, αιθανόλη, ερυθροκύτταρα

## **Abstract**

**Introduction:** The present research paper titled "Oxidative stress and senescence biomarkers in red blood cells of patients with liver disease" includes analysis of study findings on the effect of oxidative stress and biomarkers of aging in erythrocytes of patients with liver disease.

**Purpose:** The study investigates the relationship between oxidative stress and the aging process of erythrocytes in patients with liver disease, while identifying biomarkers associated with the damage and destruction of these cells.

**Method:** The procedure involves samples of erythrocytes from patients with liver disease, which are analyzed for the presence of oxidant radicals, phosphatidylserine externalization and the expression of proteins related to cellular stress and aging.

**Results:** The results show increased oxidative stress in the erythrocytes of patients with liver disease, which accelerates the aging process of the cells and affects their integrity. There is increased externalization of phosphatidylserine and an increase in biomarkers of aging.

**Discussion:** Liver disease leads to increased oxidative stress and accelerated aging of erythrocytes, which is associated with wear and tear and destruction of these cells. Biomarkers of aging can serve as markers to assess damage caused by liver dysfunction.

**Key words:** liver, oxidative stress, senescence, liver disease, alcoholic liver disease, ethanol, red blood cells



## Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	iv
Ευχαριστίες.....	v
Αφιερώσεις.....	vi
Περίληψη.....	vii
Abstract.....	viii
Συνομογραφίες.....	xi
Πρόλογος.....	1
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	3
Το ήπαρ.....	3
Κεφάλαιο 2: Τα ερυθρά αιμοσφαίρια.....	8
Κεφάλαιο 3: Αλκοολική ηπατική νόσος.....	12
3.1 Γενικά.....	12
3.2 Περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες.....	12
3.3 Φάσμα εκδήλωσης αλκοολικής ηπατικής νόσου.....	13
3.4 Παθογενετικοί μηχανισμοί αλκοολικής ηπατικής νόσου.....	15
3.5 Εργαστηριακά ευρήματα.....	18
3.6 Απεικονιστικές μέθοδοι.....	18
3.7 Ιστολογικά ευρήματα.....	19
3.8 Επιδημιολογία.....	19
3.9 Αλκοόλ και ηπατικός μεταβολισμός των λιπιδίων.....	20
3.10 Μικροβίωμα του ήπατος σε αλκοολική νόσο.....	21
3.11 Επίδραση αιθανόλης στο αίμα.....	21
3.12 Διαγνωστικοί βιοδείκτες.....	23
Κεφάλαιο 4: Το οξειδωτικό στρες.....	24
4.1 Τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε οξειδωτικό στρες.....	24
4.2 Παθοφυσιολογία οξειδωτικού στρες.....	24
4.3 Οξειδωτικό στρες και ήπαρ.....	26
4.4 Οξειδωτικό στρες και κυτταρικά οργανίδια.....	28
4.5 Παθοφυσιολογία οξειδωτικού στρες στις ηπατικές νόσους.....	29
4.6 Βιοδείκτες οξειδωτικού στρες.....	31
4.7 Οξείδωση αιμοσφαιρίνης.....	31

4.8 Φθορίδιο και οξειδωτικό στρες.....	.32
4.9 Προστασία έναντι στο οξειδωτικό στρες.....	.33
4.10 Οξειδωτικό στρες και ιογενής ηπατίτιδα.....	.33
Κεφάλαιο 5: Το οξειδωτικό στρες στην αλκοολική ηπατική νόσο.....	.34
5.1 Μεταβολισμός αιθανόλης.....	.34
5.2 Οξειδωτικό στρες στην αλκοολική ηπατική νόσο και φλεγμονή.....	.35
5.3 Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στην αλκοολική ηπατική νόσο.....	.36
5.4 L-NAME και οξειδωτικό στρες στην αλκοολική ηπατική νόσο.....	.36
5.5 Παθογένεια αλκοολικής ηπατικής νόσου και οξειδωτικό στρες.....	.37
5.6 Οξειδωτικό στρες και ερυθροκύτταρα σε επίδραση αιθανόλης.....	.38
Κεφάλαιο 6: Κυτταρική γήρανση.....	.39
6.1 Ακετυλοχολινεστεράση και γήρανση ερυθρών κυττάρων.....	.40
6.2 Κυτταρική γήρανση και ερυθροκύτταρα.....	.41
6.3 Βιοδείκτες γήρανσης ερυθροκυττάρων.....	.43
Κεφάλαιο 7: Δείκτες γήρανσης και αλκοολική ηπατική νόσος.....	.45
7.1 Αίτια κυτταρικής γήρανσης.....	.46
7.2 Παράγοντας ZNF281 και γήρανση κυττάρων.....	.56
Κεφάλαιο 8: Πειραματικό μέρος.....	.59
8.1 Δειγματοληψία.....	.59
8.2 Υλικά και εξοπλισμός.....	.59
8.3 Μεθοδολογία.....	.60
8.4 Αποτελέσματα.....	.63
8.5 Συζήτηση.....	.68
Αναφορές.....	.70

## Συντομογραφίες

	<b>Αγγλική ορολογία</b>	<b>Ελληνική ορολογία</b>
ROS	Radical Oxygen Species	Δραστικές Μορφές Οξυγόνου
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ
MCV	Mean Corpuscular Volume	Μέσος Όγκος Ερυθρών
AST	Aspartate Aminotransferase	Ασπαρτική Αμινοτρανσφεράση
ALT	Alanine Aminotransferase	Αμινοτρανσφεράση Αλανίνης
ADH	Alcohol Dehydrogenase	Αλκοολική Αφυδρογονάση
ALDH	Acetaldehyde Dehydrogenase	Ακεταλδεϋδική Αφυδρογονάση
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (+H)	Δινουκλεοτίδιο Νικοτιναμίδης Αδενίνης(+H)
LD	Lipid Droplets	Λιπιδικά Σώματα
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns	Μοριακά Μοτίβα Σχετιζόμενα με Παθογόνο
DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns	Μοριακά Μοτίβα Σχετιζόμενα με Βλάβη
G6PD	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase	Αφυδρογονάση της 6-Φωσφορικής Γλυκόζης

## Πρόλογος

Το ήπαρ αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά όργανα του ανθρώπινου οργανισμού καθώς επιτελεί πολυάριθμες βιολογικές διαδικασίες. Αυτές περιλαμβάνουν τον μεταβολισμό θρεπτικών συστατικών, τη ρύθμιση του όγκου του αίματος, τη στήριξη του ανοσοποιητικού συστήματος, τον ενδοκρινικό έλεγχο των οδών πυροδότησης της ανάπτυξης, την ομοιοστάση των λιπιδίων και της χοληστερόλης και τέλος της αποδόμησης διαφόρων χημικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των φαρμάκων.

Η παθολογική ηπατική λειτουργία που έχει προκληθεί από αίτια όπως ιογενής λοίμωξη, κακές διατροφικές συνήθειες και δημιουργία όγκων αποτελεί ένα θέμα δημόσιας υγείας (1). Οι τύποι ηπατικών παθήσεων περιλαμβάνουν αλκοολική και μη αλκοολική ηπατική νόσο, ηπατίτιδα Β και C, στεάτωση, ίνωση, κίρρωση και ηπατικό καρκίνο (2,3). Τελευταίες έρευνες δείχνουν συσχέτιση του ιού covid-19, που εμφανίστηκε το 2019 και προκάλεσε πανδημία, με διάφορες επιπλοκές στη λειτουργία του ήπατος (4).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το ήπαρ μεταβολίζει διάφορα χημικά μόρια-συστατικά με αποτέλεσμα να παράγονται δραστικές μορφές οξυγόνου ή αλλιώς Reactive Oxygen Species (ROS). Τα προοξειδωτικά είναι δραστικές μορφές οξυγόνου που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στον ηπατικό ιστό. Τα επίπεδά τους αυξάνονται σε λοίμωξη, συγκεκριμένη θεραπευτική αγωγή, τραυματισμό του ιστού και έκθεση σε ποικίλους εξωγενείς παράγοντες. Το οξειδωτικό στρες προκαλείται από έλλειψη εξισσορόπησης μεταξύ οξειδωτικών παραγόντων, δηλαδή είτε με αύξηση των προοξειδωτικών είτε με μείωση των αντιοξειδωτικών παραγόντων (5). Η παρουσία αυξημένων δραστικών μορφών οξυγόνου επηρεάζει αρνητικά τις ηπατικές πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA με αποτέλεσμα την δυσλειτουργία του ήπατος. Επομένως αξίζει να διερευνηθεί το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες για δύο λόγους. Πρώτον, θα διευκάνει την παθογένεση μιας πληθώρας ηπατικών νόσων και δεύτερον, μέσω των οξειδωτικών δεικτών μπορούμε να συμπεράνουμε το βαθμό της ηπατικής βλάβης και έτσι να εκτιμήσουμε ευκολότερα την απόκριση σε στοχευμένες θεραπείες (6).

Καθώς λοιπόν τα κύτταρα έχουν υποστεί οξειδωτικό στρες και γενικότερα βλάβη από ενδογενή ή εξωγενή παράγοντα τότε μπορούν να αντιδράσουν με πολλούς τρόπους που κυμαίνονται από ολοκληρωτική ίαση μέχρι και κυτταρικό θάνατο (7). Στην δεύτερη περίπτωση τα κύτταρα εμφανίζουν κάποιους δείκτες, όπως είναι οι δείκτες γήρανσης,

προκειμένους να φαγοκυτταρωθούν από μακροφάγα και στη συνέχεια να διασπαστούν και να απομακρυνθούν από τον οργανισμό (8).

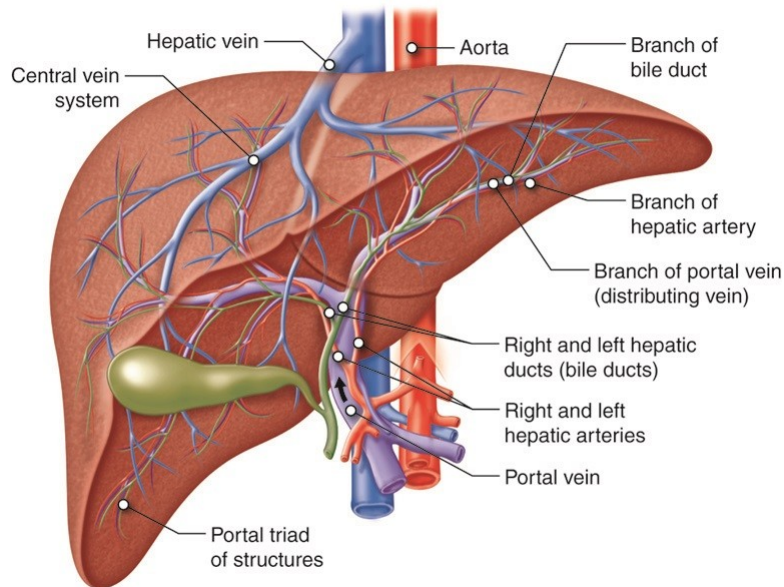
Στην έρευνα που θα πραγματοποιηθεί θα μελετηθούν κύτταρα και συγκεκριμένα ερυθρά αιμοσφαίρια ασθενών με ηπατική νόσο. Οι παράμετροι που θα αναλυθούν είναι οι οξειδωτικές ρίζες και οι δείκτες γήρανσης των ερυθροκυττάρων. Η μελέτη θα πραγματοποιηθεί με μέτρηση συσσώρευσης δραστικών ριζών οξυγόνου με και χωρίς εξωγενές ερέθισμα, συσσώρευσης ασβεστίου, εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης, προσκόλλησης IGG αντισωμάτων στο ερυθροκύτταρο, ανοσοεντόπισης πρωτεϊνών δεικτών στρες/γήρανσης με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Η κυτταρομετρία ροής επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών παραμέτρων μεμονωμένων κυττάρων τα οποία ρέουν διαμέσου μιας συσκευής οπτικής και ηλεκτρονικής ανίχνευσης.

# Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

## Το ήπαρ

Το ήπαρ είναι ένα κρίσιμο όργανο του ανθρώπινου οργανισμού καθώς συμμετέχει σε ένα πρίσμα λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων του μεταβολισμού, της πέψης, της ανοσίας, της απομάκρυνσης τοξικών παραγόντων και της αποθήκευσης βιταμινών. Αποτελεί το 2% του σωματικού μας βάρους και μοναδικό του χαρακτηριστικό είναι η διπλή παροχή του με αίμα από την πυλαία φλέβα (75%) και η ηπατική αρτηρία (25%).

Σε κυτταρικό επίπεδο το ήπαρ έχει ως λειτουργική μονάδα τον λοβό. Ο κάθε λοβός έχει σχήμα εξαγωνικό και σε κάθε μία από τις γωνίες υπάρχει η πυλαία τριάδα που απαρτίζεται από την πυλαία φλέβα, την ηπατική αρτηρία και τον χοληφόρο πόρο. Η βάση του λοβού σχηματίζεται από ηπατοκύτταρα, τα οποία έχουν φυσιολογικά διακριτές κορυφαίες και βασοπλάγιες μεμβράνες. Με βάση τη λειτουργία και την αιμάτωση, τα ηπατοκύτταρα χωρίζονται σε 3 ζώνες. Η ζώνη I αποτελεί την περιοχή γύρω από την πυλαία φλέβα και τα ηπατοκύτταρα της περιοχής αυτής επωφελούνται με προτεραιότητα εξαιτίας της έντονης αιμάτωσης, η ζώνη I συμμετέχει ενεργά σε οξειδωτικούς μεταβολισμούς. Η ζώνη II ορίζεται ως η περικεντρική περιοχή των ηπατοκυττάρων και παρεμβάλλεται μεταξύ των ζωνών I και III. Η ζώνη III αιματώνεται με τη λιγότερη ένταση λόγω της απόστασής της από την πυλαία τριάδα. Παίζει τον μεγαλύτερο ρόλο στην απομάκρυνση τοξικών μεταβολιτών, στον βιομετασχηματισμό φαρμάκων, στην κετογένεση, στη γλυκόλυση, στη λιπογένεση, στη σύνθεση γλυκογόνου και στο σχηματισμό γλουταμίνης. Μεγάλο ρόλο έχει επίσης μια περιοχή που ονομάζεται χώρος του Disse, ο οποίος βρίσκεται ανάμεσα σε τριχοειδές αγγείο και στην βασοπλευρική μεμβράνη των ηπατοκυττάρων και έχει ως σκοπό την αιμάτωση αυτών μέσω μικρολαχνών που βρίσκονται σε αυτόν το χώρο. Ο χώρος του Disse είναι σημαντικός επιπλέον για το λόγο πως στηρίζει και περιβάλλει τα ηπατοκύτταρα με ένα στρώμα πλούσιο σε πρωτεΐνες όπως το κολλαγόνο και οι πρωτεογλυκάνες. Στο χώρο αυτό βρίσκονται και τα γνωστά κύτταρα Kupffer, μακροφάγα που έχουν ως ρόλο την απομάκρυνση παθογόνων ουσιών καθώς και τα Ito κύτταρα, ένα σύνολο αστροκυττάρων για την αποθήκευση λίπους.



Εικόνα 1: Ανατομία ήπατος. Πηγή: <https://peptiko.gr/en/liver-anatomy-function-common-diseases-and-foods/>

Οι λειτουργίες του ήπατος είναι πολυάριθμες. Μία από αυτές είναι η παραγωγή χολικού υγρού. Τα κύτταρα του ήπατος παράγουν ένα πολύ σημαντικό υγρό που περιέχει χοληστερόλη, χολικά άλατα, χολερυθρίνη, χολική χρωστική ουσία, φωσφολιπίδια και κυρίως νερό και ηλεκτρολύτες. Το υγρό αυτό αποτελεί τη χολή και συμβάλλει στην διάσπαση και απορρόφηση λιπιδίων με την έκκριση χολικών αλάτων και οξέων (9).

Άλλη λειτουργία είναι ο μεταβολισμός της γλυκόζης. Με την πρόσληψη τροφής παρατηρείται αλλαγή στην κατάσταση του ήπατος καθώς μεταβαίνει από την παραγωγή στην απορρόφηση. Αυτή η αλλαγή προϋποθέτει αύξηση στα επίπεδα ινσουλίνης με ταυτόχρονη μείωση στα επίπεδα γλυκαγόνου. Αυτό καταλήγει σε μειωμένη έκκριση αποθηκευμένης γλυκόζης και γλυκονεογένεση. Στη συνέχεια αυξάνεται η γλυκόλυση και η αποθήκευση γλυκογόνου στα ηπατοκύτταρα κα επέρχεται ισορροπία στα αποθέματα γλυκαγόνου με τη συγκεκριμένη γλυκαγονική απόκριση. Με το τέλος της πρόσληψης τροφής το γλυκαγόνο αυξάνεται ξανά και μειώνεται η ινσουλίνη δηλώνοντας τον δυναμικό χαρακτήρα της διαδικασίας παραγωγής της γλυκόζης.

Η μεταβολή λιπιδίων είναι μία από τις κρίσιμες ηπατικές λειτουργίες. Κατά τη διαδικασία της πέψης απποροφούνται λιπίδια μέσω του ήπατος. Αρχικά έχουμε συγκέντρωση χυλομικρών στο έντερο που προκύπτουν από λιποπρωτεΐνες και λιπίδια πριν περάσουν στην κυκλοφορία από το λεμφικό σύστημα. Στη συνέχεια στο ήπαρ η λιποπρωτεϊνική λιπάση δημιουργεί τα λιπαρά οξέα από κομμάτια των χυλομικρών τα οποία μετα-

φέρονται με ειδικές πρωτεΐνες-μεταφορείς στα ηπατοκύτταρα όπου αξιοποιούνται ως ενδογενής οδός ενέργειας μέσω οξειδωτικών διαδικασιών ή εφοδιάζει με ενέργεια άλλα όργανα από κετογενή προϊόντα. Η παραγωγή αυτή των κετονών προστατεύει το ήπαρ από το σχηματισμό αυξημένου αριθμού ενδιάμεσων προϊόντων του κύκλου τρικαρβοξυλικού οξέος που προκαλούν οξείδωση. Το ήπαρ μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσει γλυκερόλη και λιπαρά οξέα για να σχηματίσει τριγλυκερίδια τα οποία μέσω της κυκλοφορίας φτάνουν σε όργανα-στόχους για αποθήκευση ή στους σκελετικούς μύες για χρήση ως πηγή ενέργειας. Επιπρόσθετα η σωστή διαχείριση των λιπιδίων από το ήπαρ εξυπηρετεί τη σωστή απορρόφηση λιποδιαλυτών βιταμινών που είναι απαραίτητες για τη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Τέλος, το ήπαρ είναι υπεύθυνο για την ομοιόσταση της χοληστερόλης η οποία απορροφάται από το έντερο και συντίθεται *de novo* στα ηπατοκύτταρα.

Στη συνέχεια αναλύεται η σύνθεση πρωτεϊνών. Το ήπαρ σαν πρωτεϊνοσυνθετικό όργανο συμβάλλει στο ποσοστό ως και 90% του όγκου των πρωτεϊνών που κυκλοφορούν στο σώμα μας. Το 55% των πρωτεϊνών του πλάσματος αποτελεί η αλβουμίνη, απαραίτητη για τη διατήρηση του όγκου του αίματος και της μεταφοράς συστατικών όπως ορμόνες και λιπίδια. Στο υπόλοιπο ποσοστό των πρωτεϊνών του ήπατος βρίσκονται διάφορα πεπτικά, αυξητικοί παράγοντες και πρωτεΐνες οξείας φάσης. Τα ηπατοκύτταρα εξασφαλίζουν την απαραίτητη ενέργεια από τον καταβολισμό των αμινοξέων των πρωτεϊνών με προϋπόθεση όμως την απόρριψη των αζωτούχων αποβλήτων μέσω του κύκλου της ουρίας που αποβάλλει επιβλαβή δραστικά μόρια αζώτου. Τέλος μερικά αμινοξέα ενσωματώνονται στον τρικαρβοξυλικό κύκλο ως γλυκονεογενικά υποστρώματα ώστε να παραχθεί γλυκόζη (1).

Το ήπαρ μπορεί να υποστεί ποικίλων μορφών αλλοιώσεις όπως τραυματισμό, φλεγμονή, ίνωση και νέκρωση. Όλα τα παραπάνω οδηγούν σε μία πάθηση που ονομάζεται κίρρωση του ήπατος. Η προαναφερόμενη πάθηση είναι καταστροφική για το ήπαρ καθώς το καθιστά δυσλειτουργικό στην παραγωγή πρωτεϊνών και στην ικανότητα διάκρισης και απομάκρυνσης τοξικών προϊόντων. Μερικά από τα συμπτώματα είναι πυλαία υπέρταση, υπεροστρινισμός και μειωμένες τιμές λευκωματίνης στο αίμα μαζί με χαμηλά επίπεδα παραγόντων της πήξης. Οι πιο συχνές αιτίες της ηπατικής κίρρωσης είναι ο αλκοολισμός, η μη αλκοολική λιπώδης ηπατίτιδα και η χρόνια ηπατίτιδα Β και C με την τελευταία να αποτελεί την πιο επιθετική προς το ήπαρ. Ενώ παρατηρούμε πως οι ιοί της



ηπατίτιδας Β και C προκαλούν αρχικά οξεία ηπατίτιδα που στη συνέχεια μετατρέπεται σε χρόνια, οι ηπατικοί ιοί Α και Ε προκαλούν κυρίως οξείες ηπατίτιδες (9) .

Οι χρόνιες ηπατοπάθειες πολύ συχνά συνδέονται με αναιμίες. Η αναιμία προκύπτει κυρίως από γαστρεντερική αιμορραγία ή έλλειψη θρεπτικών μικρομορίων όπως φολικό οξύ και βιταμίνη Β12 και δευτερογενή υπερσπληνισμό λόγω πυλαίας υπέρτασης παρά λόγω αιμολυτικής ή απλαστικής αναιμίας. Τα κατεστραμμένα ηπατοκύτταρα δεν διαθέτουν παράγοντες πήξης και χαρακτηρίζονται από θρομβοπενία με αποτέλεσμα να προωθείται η αιμορραγία. Την βαριά ηπατοπάθεια, κυρίως προερχόμενη από ιούς, συχνά ακολουθεί η εμφάνιση απλαστικής αναιμίας όπου χαρακτηρίζεται από πανκυτταροπενία και εκδηλώνεται με προοδευτική αναιμία και αιμορραγικά επεισόδια (10). Η αιμολυτική αναιμία πλήττει ως και το 14% των ατόμων με ηπατοπάθεια όμως μπορεί να είναι πιο επικρατής σε συγκεκριμένα κλινικά περιστατικά. Συνοδεύεται από αυτοάνοσες ηπατίτιδες, PBC και PSC. Η αιμολυτική αναιμία που δεν εξαρτάται από αυτοάνοσο νόσημα μπορεί να εμφανιστεί ως επίκτητη μεμβρανοπάθεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων και σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να συνδέσει την ηπατοπάθεια με το αλκοόλ (11).

Οι ηπατικές νόσοι όπως φαίνεται επηρεάζουν και του πληθυσμούς λεμφοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα έρευνες έδειξαν μείωση στα επίπεδα ώριμων Τ λεμφοκυττάρων, αύξηση null cells με φυσιολογικές συγκεντρώσεις λεμφοκυττάρων που φέρουν υποδοχέα Fc σε άτομα με χρόνια ηπατική ή χολοστατική νόσο (12).

Εκτός από τις αιτίες κίρρωσης που αναφέρθηκαν παραπάνω υπάρχει και ένα ποσοστό ασθενών που καθορίζονται από γενετικούς παράγοντες. Η βράχυνση των τελομερών έχει συσχετιστεί με κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα τελομερή αποτελούν συγκεκριμένες περιοχές DNA στο τέλος των χρωμοσωμάτων, οι οποίες έχουν ως στόχο να προστατεύσουν και να μονώσουν τα χρωμοσώματα από φθορές κατά τη διάρκεια των κυτταρικών διαιρέσεων ή λόγω παθολογικών καταστάσεων καθώς και το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων μεταξύ του. Τα τελομερή και η ρύθμιση της τελομεράσης αποτελούν σημαντικό παράγοντα στη διαδικασία της γήρανσης, των χρόνιων ασθενειών και του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα στην χρόνια ηπατική νόσο όπου υπάρχει μεγάλη ανακύκλωση ηπατοκυττάρων, το μήκος των τελομερών υπόκειται συνεχώς σε βράχυνση με αποτέλεσμα την αδυναμία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και εν τέλει της κυτταρικής γήρανσης όταν τα τελομερή αποδειχθούν εξαιρετικά βραχέα. Σύνολο μελετών

έχει αποδείξει πως η βράχυνση των τελομερών αποτελεί δείκτη σχηματισμού κίρρωσης που συνδέεται με τη συσσώρευση γηρασμένων ηπατικών κυττάρων. Τα πορίσματα έδειξαν πως η μεγαλύτερη βράχυνση τελομερών βρίσκεται σε ήπαρ με κίρρωση, μετά σε ήπαρ με χρόνια ηπατίτιδα και τέλος η βράχυνση ελαττώθηκε ραγδαία σε ιστό φυσιολογικού ήπατος. Νεότερες μελέτες έδειξαν πως τα βραχέα τελομερή σχετίζονται με το βαθμό ίνωσης και επομένως γίνονται δείκτες κίρρωσης του ήπατος. Συμπερασματικά στη χρόνια ηπατική νόσο τα ηπατοκύτταρα περιορίζουν την ικανότητα αναγέννησης, υποβάλλονται σε ίνωση και σχηματισμό κίρρωσης εξαιτίας της βράχυνσης των τελομερών τα οποία αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου με μόνη θετική ιδιότητα τον περιορισμό της εξέλιξής του (13).

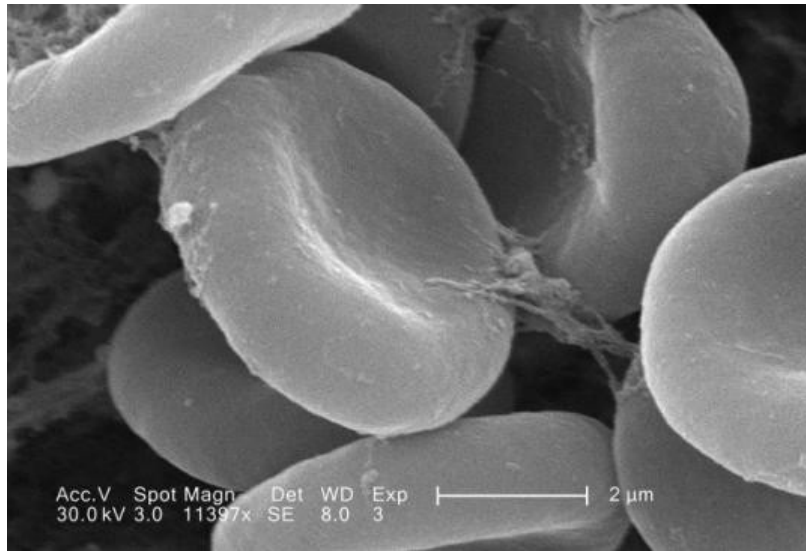
Σχετικά με την πρόσφατη επιδημιολογική κατάσταση σύγχρονες μελέτες έχουν αποδείξει πως ο ιός SARS-CoV2 έχει άμεση σχέση με ηπατική βλάβη. Υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί αυτών των βλαβών. Ένας από αυτούς είναι η συστηματική φλεγμονώδης απόκριση. Σε αυτή η φλεγμονή που προκαλείται στους πνεύμονες από τον ιό ενεργοποιεί μακροφάγα και επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα να εκκρίνουν κυτοκίνες όπως οι ιντερλευκίνη IL-6 και IL-1β καθώς και τον παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF οι οποίες περνούν στη συστηματική κυκλοφορία και έτσι στα υπόλοιπα όργανα άρα και στο ήπαρ. Δεύτερον η υποξία που προκαλείται από πνευμονική ανεπάρκεια λόγω βλάβης που προκάλεσε ο ιός φτάνει στα ηπατοκύτταρα σε μορφή έλλειψης οξυγόνου και συσσώρευσης λιπιδίων δημιουργώντας υποξικό σοκ με αποτέλεσμα να αυξηθούν οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και άλλα δραστικά παράγωγα τα οποία οδηγούν και γήρανση και θάνατο των ηπατοκυττάρων. Τρίτον, οι διάφορες φαρμακευτικές αγωγές που δόθηκαν σε ασθενείς με covid-19, συμπεριλαμβανομένων αντιπυρετικών, αντιφλεγμονωδών και αντιικών φαρμάκων έχουν ηπατοτοξικό χαρακτήρα προκαλώντας βλάβη στο ήπαρ. Τέταρτον, ο ίδιος ο ιός SARS-COV2 μπορεί να δρα στα ηπατοκύτταρα και να τα βλάπτει ή ήδη υπάρχοντα ηπατικά σύνδρομα όπως αλκοολική και μη αλκοολική ηπατική νόσος, ηπατίτιδα Β ή C ακόμα και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα επιβαρύνονται με την παρουσία του ιού αυτού αποδεικνύοντας καταστροφικό χαρακτήρα σε ένα ήδη επιβαρυσμένο ανοσοποιητικό σύστημα (14).

## Κεφάλαιο 2: Τα ερυθρά αιμοσφαίρια

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι το κρίσιμο στοιχείο του αίματος υπεύθυνο για την ανταλλαγή αερίων δηλαδή του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα και τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών από την κυκλοφορία σε όλα τα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού και το αντίστροφο.

Η μοναδική του δομή, αυτή του αμφίκιουλου δίσκου επιτρέπει σε κάθε ερυθροκύτταρο να διασχίζει το εσωτερικό του καρδιαγγειακού συστήματος, ακόμα και των πιο λεπτών τριχοειδών αγγείων έχοντας την απαραίτητη ευλυγισία καθώς και την πιο μεγάλη πιθανή επιφάνεια για την ανταλλαγή αερίων και συστατικών. Αποτελείται από διπλοστοιβάδα λιπιδίων που διακρίνει το περίγραμμά του και στο εσωτερικό στηρίζεται από δίκτυο πρωτεϊνών που απαρτίζουν τον κυτταροσκελετό. Ο κυτταροσκελετός είναι ένα σύνολο από ακτίνη, σπεκτρίνη ζώνη 3, πρωτεΐνη 4.1 και ανκυρίνη που προσδίδουν συνοχή αλλά και ελαστικότητα.

Κάθε ερυθρό αιμοσφαίριο ζει 120 μέρες μέσα στον οργανισμό μας. Σε αυτό το χρονικό διάστημα μεταφέρει οξυγονωμένο αίμα από τους πνεύμονες και να συλλέξει αίμα πλούσιο σε διοξείδιο του άνθρακα ώστε να αποβληθεί το διοξείδιο με επιτυχία από τους ιστούς πριν προκαλέσει βλάβη. Η πορεία ξεκινάει στους πνεύμονες όπου το αποξυγονωμένο αίμα που περιέχει αιμοσφαιρίνη όπου περιέχει αίμη με συγγένεια με το οξυγόνο. Όταν το αίμα αυτό φτάσει στους ιστούς που είναι έτοιμοι να δεχτούν οξυγόνο, η χαμηλή πίεση του οξυγόνου και το μειωμένο pH κάνουν την αίμη να χάσει τη συγγένεια της με το οξυγόνο και έτσι μεταφέρεται εύκολα στον ιστό. Ύστερα το διοξείδιο του άνθρακα εισέρχεται στο ερυθροκύτταρο και ενώνεται με το νερό σχηματίζοντας διττανθρακικό και υδρογόνο με τη βοήθεια της ανθρακικής ανυδράσης. Τέλος το αίμα πλούσιο σε διοξείδιο θα επιστρέψει στους πνεύμονες με τη μορφή διττανθρακικών και θα αποβληθεί με την εκπνοή.



Εικόνα 2: Το ερυθροκύτταρο στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.  
Πηγή: <https://nisenet.org/catalog/scientific-image-human-red-blood-cells-sem>

Τα ερυθροκύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο μετά από χρώση όπως η May-Gruwald Giemsa. Υπό κανονικές συνθήκες τα ερυθρά αιμοσφαίρια παρατηρούνται ως κυκλικά σε σχήμα και ανάλογα με το μέγεθος χαρακτηρίζονται νορμοκυτταρικά, μακροκυτταρικά όταν έχουν αυξημένο μέγεθος και μικροκυτταρικά όταν έχουν μικρότερο μέγεθος. Όταν υπάρχει διαφορά στο μέγεθος των ερυθροκυττάρων σε ένα οπτικό πεδίο κατά την παράτηρηση, έχουμε ανισοκυττάρωση. Όσων αφορά το χρώμα το οποίο μπορεί να είναι υπερχρωμικό ή υποχρωμικό, η διαφορά αυτή σε ερυθροκύτταρα ίδιου πεδίου ονομάζεται ανισοχρωμία η οποία δεν πρέπει να συγχέεται με την πολυχρωμασία όπου εννοούμε ποικιλία χρωμάτων μεταξύ των ερυθρών αιμοσφαιρίων και όχι της κεντρικής ωχρότητας τους. Το σχήμα τους μπορεί να διαφέρει σημαντικά και να έχει διάφορες μορφές. Μερικά παραδείγματα αποτελούν τα ακανθοκύτταρα με τις χαρακτηριστικές προεξοχές, τα δρεπανοκύτταρα με το σχήμα δρεπάνου, τα σφαιροκύτταρα δεν έχουν κεντρική ωχρότητα αλλά έχουν ομοιόμορφο χρώμα παντού, τα στοματοκύτταρα έχουν γραμμικό μακρόστενο σχήμα παρά κυκλικό, τα σχιστοκύτταρα αποτελούν θραύσματα ερυθροκυττάρων, τα στοχοκύτταρα έχουν ένα κόκκινο κέντρο με κεντρικό διάκενο και τα δακρυοκύτταρα στενεύουν στην άκρη τους.

Όλες οι παραπάνω παράμετροι, δηλαδή το μέγεθος, το σχήμα και η κατανομή μας δίνουν πληροφορίες για πιθανές νόσους και έχουν έτσι κλινική σημασία. Παραδείγματος χάριν, η αυξημένη παρουσία ακανθοκυττάρων μπορεί να σημαίνει αναιμία και αυξημένα επίπεδα ασβεστίου καθώς αποτελούν παραπροϊόν διάσπασης ή κυτταρικού θανάτου. Από την άλλη η συγκόλληση αιμοσφαιρίων μπορεί να δείχνει υπερπηκτική κατάσταση και η μικροκυττάρωση συνδέεται με αναιμίες όπως ανεπάρκεια σιδήρου και η θαλασσαιμία. Άλλος παράγοντας όπως το σχήμα των ερυθρών μπορεί να μας ειδοποιήσει για την κρισιμότητα της νόσου όπως στη δρεπανοκυτταρική αναιμία που το έντονο σχήμα ημιφέγγαρου είναι αντιπροσωπευτικό της παρουσίας της αιμοσφαιρίνης S που χαρακτηρίζει αυτή τη νόσο. Άτυπα ή μη δισκοειδή ερυθροκύτταρα απαντώνται και σε καταστάσεις φλεγμονοδών νοσημάτων όπως είναι ο συστηματικός ερυθρελαιώδης λύκος και άλλες χρόνιες παθήσεις φλεγμονής. Τα εμπύρνα ερυθρά σημαίνουν αιμόλυση, αιμορραγία ή υποξία και μπορεί να δηλώνουν ακόμα και κάποιο τύπο καρκίνου όπως λαιμοεμφιμά. Τέλος τα ερυθροκύτταρα δίνουν πληροφορίες για τη γενική εικόνα της υγείας ενός ασθενούς και για τις φυσιολογικές διεργασίες που συμβαίνουν στον οργανισμό του (15).

Τα ερυθροκύτταρα πλέον αλκοολική ηπατική νόσο έχουν μελετηθεί διεξοδικά. Σε κίρρωση του ήπατος λόγω αλκοολισμού οι ασθενείς εμφανίζουν μέτρια ως σημαντική αναιμία με εργαστηριακά ευρήματα που δείχνουν αιμορραγία, έλλειψη σιδήρου και φολικού οξέος καθώς και προβλήματα παραγωγής του μυελού των οστών. Τα ερυθροκύτταρα έχουν μειωμένη διάρκεια ζωής και μειωμένη απόκριση από τον μυελό των οστών. Η μορφή των ερυθρών είναι συνήθως σαν εκείνη των στοχοκυττάρων αλλά δεν λείπουν και τα σφαιροκύτταρα (16).

Μελέτες έχουν δείξει πως σε άτομα με αλκοολισμό τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης είναι ευδιακρίτως αυξημένα και στα δύο φύλα με λίγο περισσότερο να επηρεάζονται οι γυναίκες(17). Σε διαφορετικές μελέτες παρατηρήθηκε σε γκρουπ υγιών ατόμων που κατανάλωναν συστηματικά αλκοόλ αυξημένο MCV ερυθρών χωρίς όμως αναιμία και διαφορά στην τιμή του αιματοκρίτη (18).

Σπουδαία ευρήματα έχουν διατυπωθεί σχετικά με τη μεμβράνη ερυθροκυττάρων και αλκοόλ. Παρατηρήθηκαν τρεις παράμετροι της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, δηλαδή η ρευστότητα, η ελαστικότητα και η σταθερότητα σε σχέση με τη συγκέντρωση αλκοόλης. Τα αποτελέσματα έδειξαν μέσω της εκτατομετρίας και

φασματοσκοπίας ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού μείωση της ελαστικότητας και της ρευστότητας των λιπιδίων της μεμβράνης αναλόγως της συγκέντρωσης της αλκοόλης. Σημειώθηκε επίσης αιμόλυση και παρουσία εχινοκυττάρωσης αναλόγως της τιμής της συγκέντρωσης (19). Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που εκτείθονται σε αλκοόλη έχουν μικρότερες επιφάνειες άρα μεγαλύτερη σφαιρικότητα και μειωμένη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης. Η επίδραση αιθανόλης *in vitro* έδειξε μειωμένο MCV σε αντίθεση με την κοινή γνώση πως σε χρόνιους αλκοολικούς το MCV είναι αυξημένο αλλά αυτό δεν οφείλεται τόσο στην άμεση επίδραση αιθανόλης αλλά κυρίως στην χρόνια έλλειψη φολλικού οξέους. Γενικότερα οι επίδραση της αλκοόλης στα ερυθροκύτταρα σχετίζεται με τη συγκέντρωση της και έχει σημαντικές διαφορές από τα δείγματα control (20). Σε πιο λεπτομερή ανάλυση σε μελέτη του 2016 σημειώθηκε αύξηση σε πρωτεϊνικά καρβονύλια της μεμβράνης ερυθροκυττάρων αλκοολικών ασθενών, στην ολική χοληστερόλη, στα φωσφολιπίδια και στην αναλογία χοληστερόλη/φωσφολιπίδια καθώς και αυξημένη πυκνότητα στη ζώνη 3, πρωτεΐνη 4.2, 4.9, ακτίνη και γλυκοφορίνες σε ανάλυση τύπου SDS-PAGE. Η αυξημένη αιμόλυση σε αλκοολικούς ασθενείς έδειξε θετική συσχέτιση με λιπιδική οξείδωση και πρωτεϊνικά καρβονύλια. Συμπερασματικά σχηματίζεται η εικόνα ενός ερυθροκυττάρου με αυξημένη λιπιδική και πρωτεϊνική οξείδωση, διαφορετική αναλογία C/P και αυξημένη πρωτεΐνη κυτταροσκελετικής μεμβράνης ίσως να ευθύνεται για την έντονη αιμόλυση σε αλκοολικούς ασθενείς (21).

## **Κεφάλαιο 3: Αλκοολική ηπατική νόσος**

### **3.1 Γενικά**

Η αλκοολική ηπατική νόσος αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες χρόνιας ηπατοπάθειας παγκοσμίως και είναι υπεύθυνη για έως και το 48% των θανάτων που σχετίζονται με κίρρωση του ήπατος στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής. Η κατανάλωση αλκοόλ αποτελεί έναν παράγοντα που συχνά συνυπάρχει με άλλους παράγοντες που προκαλούν ηπατοπάθεια όπως ο ιός της ηπατίτιδας C, ο οποίος επιδεινώνει την ηπατική ίνωση. Άτομα που καταναλώνουν χρόνια μεγάλες ποσότητες αλκοόλ βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο διαφόρων ηπατοπαθειών με εμφάνιση αλκοολικής στεατοηπατίτιδας, κίρρωσης και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Οι περισσότεροι ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια εισάγονται στο νοσοκομείο με την εκδήλωση ίκτερου ή επιπλοκών της κίρρωσης (22). Μετά την τον ιό της ηπατίτιδας C το αλκοόλ θεωρείται η κύρια αιτία για την εμφάνιση χρόνιας ηπατοπάθειας στις περισσότερες αναπτυγμένες πόλεις. Πάνω από το 25% των περιπτώσεων της κίρρωσης έχουν προκληθεί από την μακροχρόνια και υπέρμετρη κατανάλωση αλκοολούχων ποτών. Πιο συγκεκριμένα για τους άνδρες ημερήσια κατανάλωση 60-80 g/d αλκοόλης για 10 χρόνια και 20 g/d για τις γυναίκες οδηγεί σε σοβαρή μορφή ηπατικής νόσου (23).

### **3.2 Περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες**

Περίπου το 10 με 20% των ατόμων και χρόνια και υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ θα αναπτύξουν κίρρωση του ήπατος ή κάποια ηπατοπάθεια. Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη νόσου διαδραματίζουν παράγοντες που σχετίζονται με το γενετικό υπόβαθρο, τον τρόπο ζωής και του εξωτερικού περιβάλλοντος του ανθρώπου. Για παράδειγμα οι γυναίκες έχουν χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης αλκοολικής ηπατικής νόσου χάρη στο γεγονός ότι έχουν περισσότερη περιεκτικότητα λίπους στο σώμα τους και μειωμένη δράση της κάτω γαστρικής δεϋδρογονάσης. Άλλος σημαντικός παράγοντας είναι η παχυσαρκία η οποία οδηγεί σε κίρρωση όταν συνδυάζεται με βαριά κατανάλωση αλκοόλ. Η παρουσία ιών όπως εκείνους της ηπατίτιδας B και C αυξάνει τον τραυματισμό του ηπατικού ιστού συνεισφέροντας στην γρηγορότερη και και συχνότερη εμφάνιση κίρρωσης. Η συσσώρευση σιδήρου αποτελεί ένα συχνό εύρημα σε προχωρημένου σταδίου αλκοολική

ηπατική νόσο και έχει αποδειχθεί πως οδηγεί σε ηπατική ίνωση και αυξημένη θνητότητα. Τέλος το κάπνισμα σε αλκοολικούς ασθενείς διογκώνει της βλάβες που προκαλεί η αλκοόλη και οδηγεί μέχρι και σε εμφάνιση ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε πάσχοντες από αλκοολική κίρρωση.

Όσων αφορά του γενετικούς παράγοντες μελέτες έχουν δείξει πως τα μονοζυγωτικά δίδυμα έχουν μεγαλύτερη επιρρέπεια σε κίρρωση σχετιζόμενη με το αλκοόλ από τα διζυγωτικά δίδυμα. Τα γονίδια που αφορούν την επιρρέπεια στον αλκοολισμό περιλαμβάνουν νευροδιαβιβαστές όπως γ-αμινοβουτυρικό οξύ και διαβιβαστές του μεταβολισμού της αλκοόλης όπως αλκοολική δεϋδρογονάση και ένζυμα ακεταλδεϋδικής δεϋδρογονάσης. Ο πολυμορφισμός σε αυτά τα γονίδια ίσως ευθύνεται σε αυτή την επιρρέπεια με μεγάλο εύρος αλληλόμορφων μεταξύ ομάδων διαφορετικών εθνικοτήτων όμως περαιτέρω διερεύνηση απαιτείται ώστε να εδραιωθεί η συγκεκριμένη θεωρία. Νέες μελέτες εστιάζουν στον πολυμορφισμό γονιδίων που κωδικοποιούν διαβιβαστές φλεγμονής, αντιδράσεις ενδοτοξινών και οξειδωτικού στρες. Πιο διαδεδομένες και σύγχρονες μελέτες όπου μελετήθηκε ολόκληρο το γονιδίωμα έδειξαν πως η πρωτεΐνη 3 που εμπεριέχεται στον τομέα της φωσφολιπάσης τύπου πλατίνης φαίνεται πως είναι ο κύριος παράγοντας κινδύνου για εκδήλωση αλκοολικής ηπατικής νόσου καθώς επίσης και της μη αλκοολικής λιπώδης νόσου του ήπατος και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος με το αλληλόμορφο που ευθύνεται για αρνητική πρόγνωση να είναι πιο συχνό στους ισπανικούς λαούς.

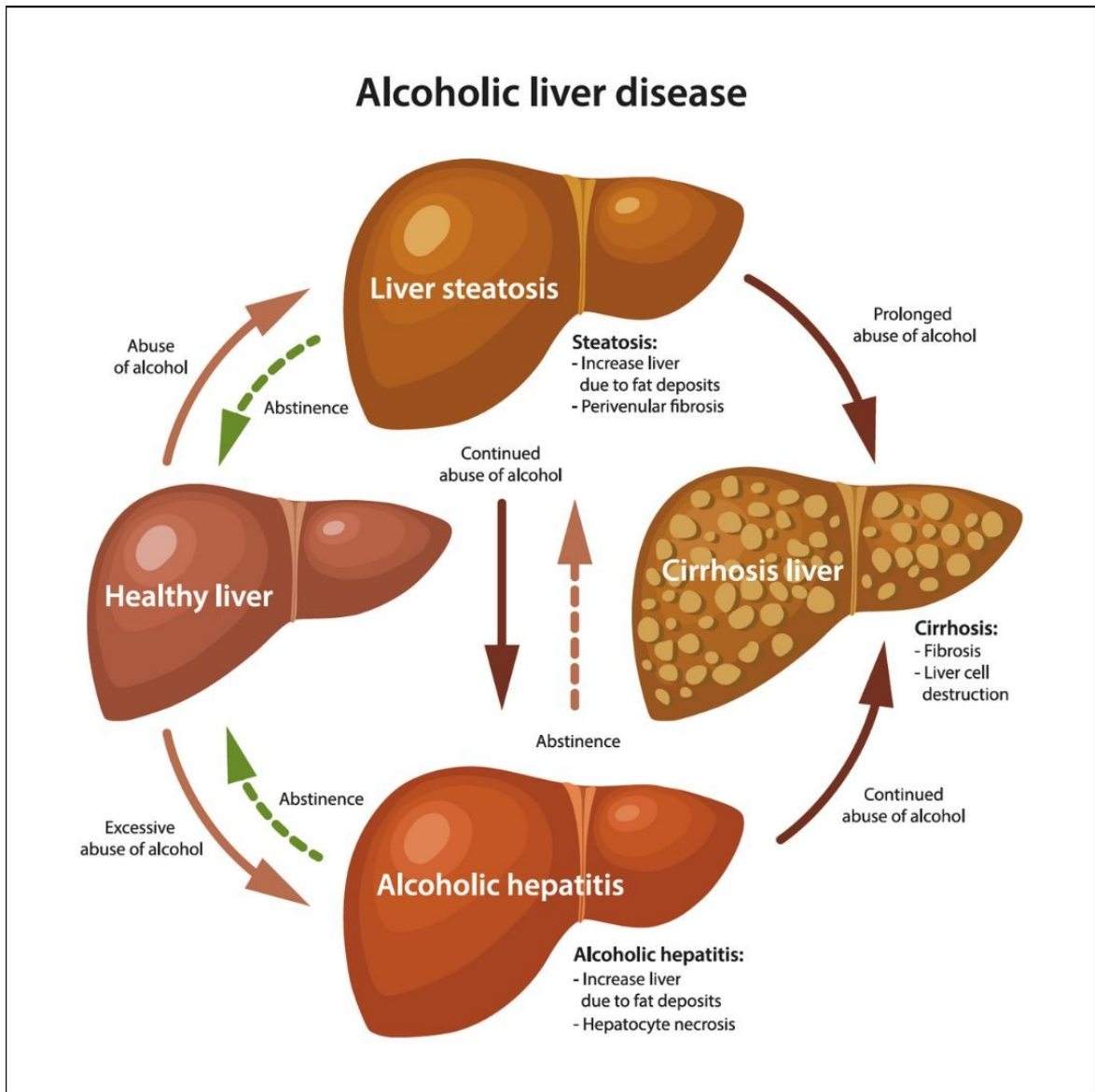
### **3.3 Φάσμα εκδήλωσης αλκοολικής ηπατικής νόσου**

Η αλκοολική ηπατική νόσος αποτελείται από δύο στάδια. Το πρώτο λέγεται ασυμπτωματική ή αρχική αλκοολική ηπατική νόσος και εκδηλώνεται ως λιπώδες ήπαρ ή αλκοολική στεάτωση. Το δεύτερο είναι η προχωρημένη αλκοολική ηπατική νόσος που εμφανίζεται ως κίρρωση του ήπατος συμπεριλαμβανομένων και των επιπλοκών της. Πιο αναλυτικά, στο πρώτο στάδιο έχουμε κλινικά ευρήματα όπως εμφανή ηπατική στεάτωση στο υπερηχογράφημα με ταυτόχρονη ύπαρξη αυξημένων ηπατικών ενζύμων AST και ALT με τα επίπεδα της AST να είναι μεγαλύτερα της ALT, χολερυθρίνη του ορού μικρότερη των 3 mg/dL και έλλειψη άλλων αιτιών ηπατικής νόσου. Η εκδήλωση του πρώτου σταδίου εμφανίζεται ως απλή στεάτωση, συνήθως μακροφυσαλώδης, παρουσιάζεται στο 90% των καταναλωτών υψηλών ποσοτήτων αλκοόλ σε καθημερινή βάση η οποία όμως μπορεί να



υποχωρήσει εντελώς και σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα ύστερα από πλήρη αποχή από τα αλκοολούχα ποτά. Σε αυτό το στάδιο οι περισσότεροι πάσχοντες δεν εμφανίζουν σοβαρά συμπτώματα πέραν της περιστασιακής ναυτίας, μειωμένης όρεξης και στομαχικών ενοχλήσεων. Σε ιστολογικό επίπεδο το ένα τρίτο των ασθενών με στεάτωση έχουν ενδείξεις φλεγμονής, βλάβης ή ίνωσης στη βιοψία ήπατος και ειδικότερο το 50% των ασθενών να είναι σε προχωρημένη παθολογική κατάσταση. Ασθενείς με στεατοηπατίτιδα έχουν κίνδυνο να εμφανίσουν ίνωση σε ποσοστό 20-40% και κίρρωση σε ποσοστό 8-20%. Εξωτερικά σε σωματική εξέταση γίνεται ψηλαφητή ελαφριά ηπατομεγαλία η οποία και εκείνη υποχωρεί μετά από αποχή από το αλκοόλ. Γενικότερα οι ασθενείς με αλκοολική ηπατική νόσο μπορούν να αναστρέψουν την κλινική τους εικόνα εφόσον σταματήσουν παντελώς την κατανάλωση αλκοόλ. Ακόμα και τότε όμως κινδυνεύουν να αποκτήσουν μη αλκοολική λιπώδη ηπατική νόσο καθώς συχνά αντικαθιστούν το ποτό με την κατανάλωση φαγητού που αυξάνει το σωματικό τους βάρος.

Η προχωρημένη αλκοολική ηπατική νόσος εκδηλώνεται με την εμφάνιση ίκτερου και σχετίζεται με επιπλοκές του ήπατος όπως ασκίτης, αιμορραγία λόγω υπέρτασης της πυλαίας φλέβας, εγκεφαλοπάθεια και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Η αλκοολική ηπατίτιδα και η κίρρωση ήπατος μπορεί να εκδηλωθεί σε οποιοδήποτε στάδιο της ηπατικής νόσου με αυξημένο κίνδυνο σε εκείνους που έχουν ήδη νοσηλευτεί λόγω αλκοολισμού (22).



Εικόνα 3: Το ήπαρ στην αλκοολική ηπατική νόσο. Πηγή:  
<https://continentalhospitals.com/diseases/alcoholic-liver-disease/>

### 3.4 Παθογενετικοί μηχανισμοί αλκοολικής ηπατικής νόσου

Το ήπαρ όπως είναι γνωστό αποτελεί το κύριο όργανο μεταβολισμού της αιθανόλης (αλκοόλη). Η αιθανόλη και οι μεταβολίτες της, δηλαδή ακεταλδεΐδη, αιθανολεστέρες λιπαρών οξέων, πρόσθετα αιθανόλης- πρωτεΐνης ασκούν άμεση κυτταροτοξική δράση δρώντας σαν ηπατοτοξίνες. Ο μεταβολισμός της αιθανόλης περιλαμβάνει οξειδωτικές και μη οξειδωτικές οδούς. Η οξειδωτική οδός προωθείται από την αλκοολική αφυδρογονάση ADH και ακεταλδεΐδική αφυδρογονάση ALDH που μετατρέπουν την αιθανόλη σε

ακεταλδεΰδη και την ακεταλδεΰδη σε οξικό ιόν αντίστοιχα. Τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης είναι η ακεταλδεΰδη, το οξικό ιόν και υψηλά επίπεδα NADH. Η ακεταλδεΰδη βλάπτει το ήπαρ απευθείας καθώς ενεργοποιεί τους μηχανισμούς φλεγμονής, την αναδιαμόρφωση του εξωκυτταρικού στρώματος και της ινογένεση και προσδένεται σε πρωτεΐνες και DNA οδηγώντας σε παραγωγή ανοσογόνων προϊόντων στα ηπατοκύτταρα και τέλος ενεργοποιεί τον τροποποιητικό παράγοντα TGF- $\beta$  σε ηπατοκύτταρα που κατέχουν προ-ινογονική και προ-φλεγμονώδη τάσεις. Ηλεκτρόνια μεταφέρονται από την αλκοόλη στο NADP<sup>+</sup> μέσω ADH. Αλλαγές στο ισοζύγιο NADH/NAD<sup>+</sup> μπορεί να επηρεάζουν βιοχημικές αντιδράσεις εντός των μιτοχονδρίων και την έκφραση των γονιδίων στον πυρήνα. Η καύση του NADH απαιτεί επιπλέον ποσότητα οξυγόνου στα μιτοχόνδρια και έτσι τα ηπατοκύτταρα κατά μήκος του ηπατικού ιστού δεν αιματώνονται όλα σωστά και επαρκώς οδηγώντας σε υποξεία, η πρώτη ένδειξη βλάβης στο ήπαρ.

Η αλκοόλη μετατρέπεται σε ακεταλδεΰδη με τη συνεισφορά του ADH το οποίο με τη σειρά του υποβοηθάται από το κυτοχρωμόσωμα P450 και πιο συγκεκριμένα το P450 2E1 που φαίνεται πως υπερεκφράζεται στην χρόνια και υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ. Το κυτόχρωμα P450 2E1 προάγει την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου όπως ιόντα υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου τα οποία είναι παρόντα σε προ-φλεγμονώδεις καταστάσεις σε τραυματισμένους ηπατικούς ιστούς. Οι μηχανισμοί δράσεις είναι ξεκινούν με την ενεργοποίηση μεταγραφικούς παράγοντες ευαίσθητους στην οξειδοαναγωγή όπως είναι ο πυρηνικός παράγοντας B (NF- $\kappa$ B). Στη συνέχεια συγκεντρώνουν ουδετερόφιλα και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και αυξάνοντας το επίπεδο των κυτοκινών που βρίσκονται στην κυκλοφορία κυρίως σε προ-φλεγμονώδες στάδιο. Τέλος συμβάλλουν στην υπεροξειδωση των λιπιδίων που σχετίζεται με τραυματισμό του ήπατος από την αλκοόλη.

Άλλη μία ουσία που αποτελεί βιοδείκτη της χρόνιας κατανάλωσης αλκοόλ και που τα τελικά προϊόντα της είναι υπεύθυνα για την αλκοολική στεάτωση είναι η καταλάση, ένα υπεροξειδωτικό ένζυμο που χαρακτηρίζεται ως κύριος ρυθμιστής του μεταβολισμού της αλκοόλης.

Άλλο ένα μόριο που είναι καθοριστικό στην ηπατική στεάτωση, φλεγμονή και ίνωση είναι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) που προέρχονται από το έντερο και κυρίως gram-αρνητικά βακτήρια που εισέρχονται την πυλαία κυκλοφορία για να απομακρυνθούν από τα κύτταρα Kupffer τα οποία είναι μακροφάγα του συγκεκριμένου σημείου και

ηπατοκύτταρα που διαθέτουν βιολογικά συστήματα αναγνώρισης λιποπολυσακχαριτών σε παθολογικές καταστάσεις. Η αλκοόλη διαταράσσει το εντερικό τείχος οδηγώντας σε αυξημένο επίπεδο ενδοτοξινών στην κυκλοφορία του αίματος οι οποίες προσδένονται στον προσδέτη CD14 στην επιφάνεια των κυττάρων Kupffer μέσω της πρωτεΐνης πρόσδεσης λιποπολυσακχαριτών LBP. Το σύμπλοκο CD14-LBPLPS μέσω της οξειδάσης NADPH παράγει δραστικές ρίζες οξυγόνου που με τη σειρά τους ενεργοποιούν τον υποδοχέα TLR4 σηματοδοτώντας την απενεργοποίηση του NF-κΒ και την απελευθέρωση των κυτοκινών φλεγμονής και κυρίως του TNF-α. Στη συνέχεια ο TNF-α διατηρεί την ηπατική βλάβη αυξάνοντας την εντερική διαπερατότητα και συνεχίζει την νεκρωτικο-φλεγμονώδη βλάβη στο ήπαρ (23).

Σύγχρονες μελέτες αποκάλυψαν επίσης το αλκοόλ είναι υπεύθυνο για την διαταραχή και την ενεργοποίηση των αποπτωτικών οδών των κυττάρων του ήπατος. Το στρες που προκαλείται από το αλκοόλ στο ενδοπλασματικό δίκτυο ενεργοποιεί τον διεγέρτη των γονιδίων ιντερφερόνης οδηγώντας στη φωσφορυλίωση του IRF3, παράγοντα ρύθμισης ιντερφερονών που συνεργάζεται και ενεργοποιεί τις οδούς απόπτωσης των μιτοχονδρίων. Τα κατεστραμμένα ηπατοκύτταρα απελευθερώνουν DAMPs δηλαδή μοριακά σχήματα σχετιζόμενα με βλάβη που αναγνωρίζονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στο ήπαρ ως κίνδυνος ώστε να ξεκινήσει η προφλεγμονώδης απόκριση. Κάποια από αυτά τα σημάδια κινδύνου περιλαμβάνουν το ουρικό οξύ και το ATP.

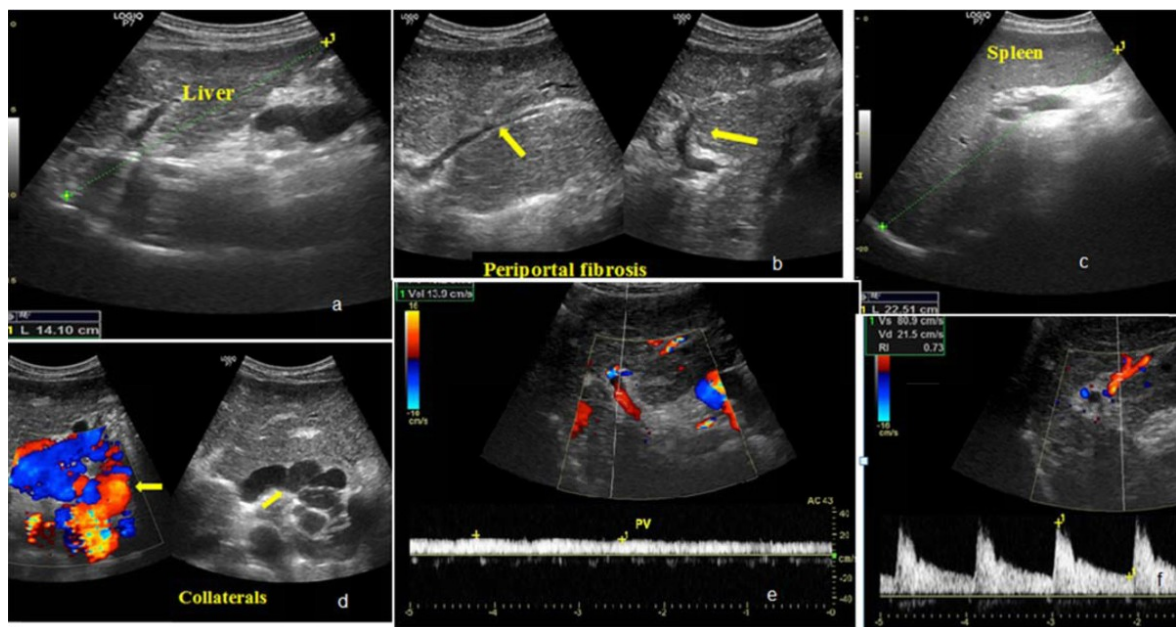
Η παρουσία των φλεγμονοδών κυττάρων στον ηπατικό ιστό ενεργοποιεί τα αστροκύτταρα που χαρακτηρίζονται από την απώλεια του ρετινοϊκού οξέος και την επαγωγή των ινογονικών γονιδίων όπως το άλφα-1 ακτίνη των λείων μυών και το κολλαγόνο-1. Τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα πολλαπλασιάζονται και παράγουν κολλαγόνο που προκαλεί ηπατική ίνωση. Παρατεταμένη και επίμονη ενεργοποίηση των ηπατικών αστροκυττάρων και μυοϊνωβλαστών οδηγεί σε σταδιακή συσσώρευση κολλαγόνου, ηπατικής ίνωσης και σε προχωρημένα στάδια ακόμα και κίρρωση του ήπατος.

### 3.5 Εργαστηριακά ευρήματα

Οι τυπικές εργαστηριακές εξετάσεις για τη διάγνωση αλκοολικής ηπατικής νόσου περιλαμβάνουν τις CBC, INR, LFTs, GGT, τρανσφερίνη με έλλειψη υδατανθράκων, ορολογικές εξετάσεις και τις AST και ALT συνήθως κάτω από 300 iu/L και σπάνια πάνω από 500 iu/L και με αναλογία AST/ALT πάνω από 1.5 στο 70% των ασθενών. Άλλα εργαστηριακά αποτελέσματα δείχνουν αυξημένη χολερυθρίνη, συνήθως πάνω από 5 mg/dL, χαμηλή αλβουμίνη και προαλβουμίνη, αναιμία, μακροκυττάρωση, λευκοπενία, λεμφοκυτταροπενία και θρομβοκυτταροπενία.

### 3.6 Απεικονιστικές μέθοδοι

Μέθοδοι απεικόνισης της κοιλιακής χώρας περιλαμβάνουν υπέρηχο, αξονική και μαγνητική τομογραφία που δείχνουν συνήθως ηπατομεγαλία, συσσώρευση λίπους στο ήπαρ, υποβόσκουσα κίρρωση και ασκίτη. Μελέτες με ροή Doppler στην ηπατική αρτηρία μπορεί να δείξουν αυξημένη μέγιστη ταχύτητα συστολής ή αυξημένη διάμετρο του αγγείου.



Εικόνα 4: Κίρρωση του ήπατος σε υπέρηχο Doppler. Πηγή:

<https://ejrnm.springeropen.com/articles/10.1186/s43055-020-00344-6>

### **3.7 Ιστολογικά ευρήματα**

Ανάλογα με το στάδιο της νόσου αναμένουμε να βρούμε διαφορετικά ιστολογικά χαρακτηριστικά όμως κάποια από τα πιο συνήθη περιλαμβάνουν τη στεάτωση, τη συρρέουσα παρεγχυματική νέκρωση, το ενδοκολλικό και περικεντρικό κολλαγόνο, τον εκφυλισμό με μπαλονάκι, τη φλεγμονή των λοβίων που επηρεάζει τις περικοιλιακές περιοχές στα αρχικά στάδια, τα σώματα Mallory τα οποία είναι άμορφα ηωσινοφιλικά σωμάτια εγκλεισμού, ο αποτροπιασμός, η νεφρίτιδα και η χολόσταση. Μελλοντική κίρρωση μπορεί να προβλεφθεί ιδιαίτερα σε άτομα που ήδη έχουν εμφανίσει ηπατίτιδα C ή συνεχίζουν την υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ με την εύρεση περιφλοειδικής και περικυτταρικής ίνωσης. Τέλος σε ηπιότερες μορφές αλκοολικής ηπατοπάθειας συναντάμε μεγαμιτοχόνδρια που υποδηλώνουν καλύτερη πρόγνωση και μειωμένη εμφάνιση επιπλοκών. Όσων αφορά το βαθμό φλεγμονής υπάρχει συσχέτιση με την απόκριση στη θεραπεία με στεροειδή αλλά και με τον χαρακτήρα της πρόγνωσης (24).

### **3.8 Επιδημιολογία**

Ο Οργανισμός Παγκόσμιας Υγείας υπέδειξε πως 3.3 εκατομμύρια θανάτων έχουν προκληθεί από την κατάχρηση αλκοόλ και ότι το αλκοόλ αποτελεί παράγοντα κινδύνου για σχεδόν το 50% των περιπτώσεων κίρρωσης. Η μέτρια ως βαριά κατανάλωση αλκοολούχων ποτών έχουν άμεση συσχέτιση με τον θάνατο λόγω ηπατικών προβλημάτων ρίχνοντας το βάρος πλέον σε χώρες της Ασίας όπως η Κίνα, η Κορέα και η Ινδία αλλά και σε χώρες της Ευρώπης και κυρίως την Ανατολικής πλευράς της. Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Αλκοολισμού και Επιτήρησης Κατάχρησης του Αλκοόλ της Αμερικής σε αναφορά στην θνησιμότητα το 2013 ανέδειξε την κίρρωση την δωδέκατη αιτία θανάτου στην Αμερική, με συχνότητα των θανάτων λόγω κίρρωσης να αποδίδονται στο αλκοόλ να είναι 12 θάνατοι ανά 100000 πληθυσμού που σημειώνει μεγάλη άνοδο σε σχέση με τα νούμερα που σημειώθηκαν το 2012 (22).

Το αλκοόλ αποτελεί την έβδομη παγκοσμίως αιτία για πρόωρο θάνατο και αναπηρίες με σοβαρές επιπτώσεις στο γαστρεντερικό και καρδιαγγειακό σύστημα καθώς και στην εμφάνιση καρκίνου. Το μεγαλύτερο ποσοστό κατανάλωσης αλκοόλ εντοπίζεται στην Ευρώπη με την Αμερική να ακολουθεί στην δεύτερη θέση με ιδιαίτερη έμφαση στην λατινική περιοχή της (25).

Στην Φινλανδία το 87% των θανάτων λόγω ηπατικών νόσων αποδίδεται στο αλκοόλ. Γενικότερα στην Ευρώπη το ποσοστό της θνησιμότητας που σχετίζεται με ηπατοπάθειες λόγω αλκοολισμού κυμαίνονται από 60 έως 80%. Η κίρρωση του ήπατος είναι υπεύθυνη για το 70 με 80% των θανάτων προερχομένων από το αλκοόλ. Εκτός από τα δεδομένα θνησιμότητας η κατάχρηση των αλκοολούχων ποτών είναι η δεύτερη πιο κοινή ένδειξη για μεταμόσχευση ήπατος με ποσοστό 40% των ηπατικών μεταμοσχεύσεων στην Ευρώπη και το 25% στην Αμερική. Τέλος σε οικονομικό επίπεδο η αλκοολική νόσος μετρά 125 εκατομμύρια ευρώ αντίκτυπο Ευρωπαϊκώς δηλαδή το 1.3% του κατά κεφαλήν ακαθάριστου εγχώριου προϊόντος (26).

### **3.9 Αλκοόλ και ηπατικός μεταβολισμός των λιπιδίων**

Είναι γεγονός πως σχεδόν δύο εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως καταναλώνουν αλκοολούχα ποτά και πως η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ σχετίζεται με ένα μεγάλο εύρος επιπλοκών. Στο ήπαρ η πιο συχνή παθολογική κατάσταση που παρατηρείται σχεδόν σε όλους τους καταναλωτές μεγάλων ποσοτήτων αλκοόλ είναι η συσσώρευση λίπους στον ηπατικό ιστό, γνωστή και ως στεάτωση. Για να γίνει η διάγνωση της στεάτωσης απαραίτητη προϋπόθεση είναι η παρουσία πάνω από 5% λίπους στο συνολικό βάρος του ήπατος. Πιο συγκεκριμένα έχουν μελετηθεί σημαντικές αλλαγές σε παραμέτρους του ηπατικού μεταβολισμού των λιπιδίων λόγω της υπέρμετρης παρουσίας της αλκοόλης που περιλαμβάνει την αυξημένη πρόσληψη λιπαρών οξέων, την βλάβη της οξειδωσης λιπαρών οξέων, την αυξημένη σύνθεση de novo λιπιδίων και αποθήκευση ουδέτερων λιπιδίων, δηλαδή των τριγλυκεριδίων και των εστέρων χοληστερόλης και απαγόρευση εξωτερίκευσης λιπιδίων και καταβολισμό των Lipid Droplets (LD). Τα LD είναι λιπιδικά σώματα τα οποία λειτουργούν ως αποθήκες ουδέτερων λιπιδίων, τα οποία περιβάλλονται στον πυρήνα των LD από φωσφολιπιδική μονοστιβάδα πρωτεϊνών, με πιο συχνή την ομάδα πρωτεϊνών περιλιπίνη (PLIN), που συνεισφέρει στην ομοιόσταση των λιπιδίων και της γλυκόζης. Όλα αυτά αποτελούν παράγοντες και μηχανισμούς που εν τέλει οδηγούν σε ηπατοκυτταρική συσσώρευση των LD. Σε αντίθεση με τα ουδέτερα λιπίδια που δεν έχουν φορτίο και δεν συμμετέχουν σε μηχανισμούς σηματοδότησης υπάρχουν τα βιοενεργά λιπίδια που έχουν τον ρόλο των λιπιδικών μεσολαβητών σηματοδότησης και επηρεάζουν σημαντικά την κυτταρική ομοιόσταση και τους μηχανισμούς ανοσοποίησης.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών των λιπιδίων που εμφανίζονται σε αλκοολική ηπατική νόσο είναι τα λιπαρά οξέα, τα κεραμίδια και τα φωσφολιπίδια. Βιοενεργά λιπίδια όπως τα σφινγκολιπίδια και ορισμένα γονίδια φαίνεται πως στο μέλλον έχουν προοπτικές να γίνουν βιοδείκτες και να συνεισφέρουν έτσι σε θεραπευτικές μεθόδους για εκείνους που πάσχουν από σοβαρή ηπατική νόσο (27).

### **3.10 Μικροβίωμα του ήπατος σε αλκοολική νόσο**

Στη γαστρεντερική οδό υπάρχουν πάνω από τρία εκατομμύρια μικροοργανισμοί που έχουν ως πρωτεύοντα ρόλο τον μεταβολισμό ουσιών, την ανοσία και την ενδογενή παραγωγή αλκοόλης. Οι κατηγορίες μικροοργανισμών που συναντώνται εδώ είναι κυρίως τα βακτήρια αλλά επίσης και διάφοροι ιοί, μύκητες, πρωτόζωα και αρχαία. Κάθε περιοχή της γαστρεντερικής οδού περιέχει διαφορετικά είδη και αριθμό μικροοργανισμών με το παχύ έντερο να περιλαμβάνει το πιο πλούσιο μικροβίωμα. Δύο μεγάλες ομάδες βακτηρίων απαρτίζουν το γαστρεντερικό μικροβίωμα. Η πρώτη είναι οι βάκιλλοι, Gram θετικά βακτήρια και η δεύτερη είναι τα βακτηροειδή που είναι Gram αρνητικά. Η υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ παρεμβαίνει σε αυτές τις ομάδες μικροοργανισμών και τις καθιστά εμφανώς λιγότερο ποικιλόμορφες, ενισχύοντας τα βακτήρια που έχουν επιβλαβή δράση όπως τα Gram αρνητικά βακτήρια και μειώνοντας εκείνα που είναι ωφέλιμα όπως οι λακτοβάκιλλοι. Επιπλέον η αλκοόλη αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης ειδών του μύκητα *Candida*. Λόγω της ιδιαίτερης σημασίας του μικροβιώματος στην ηπατική αλκοολική νόσο έχει αποδειχθεί πως η χρήση προβιοτικών, μεταβιοτικών και συμβιωτικών μπορεί να συμβάλλει στη βελτίωση και θεραπεία χρόνιων ηπατικών νόσων, αλκοολικής ηπατικής νόσου και της ηπατικής κίρρωσης (28).

### **3.11 Επίδραση αιθανόλης στο αίμα**

Η αιθανόλη που βρίσκεται στα αλκοολούχα ποτά έχει αποδειχθεί πως συνδέεται με αλλαγές στους μεσολαβητές της φλεγμονής, της αιμόλυσης και των αντισωμάτων ενάντια σε μεταβολήτες της αιθανόλης. Το ανοσοποιητικό σύστημα δρα με δύο τρόπους στην αλκοολική ηπατική νόσο, αρχικά απομακρύνει ξένους μικροοργανισμούς και τα προϊόντα τους μέσω ειδικών μορίων που βρίσκονται σε περιοχές της επιφάνειας των



μικροοργανισμών αυτών και λέγονται PAMPs και δεύτερον ανταποκρίνεται σε κατεστραμμένο ιστό και σε νεκρά κύτταρα μέσω μορίων προερχόμενων από το ενδοκυτταρικό περιβάλλον που αναδεικνύουν αυτά τα κύτταρα όταν είναι έτοιμα να απομακρυνθούν από τον οργανισμό και λέγονται DAMPs. Τα PAMPs και τα DAMPs είναι εκείνα που ενεργοποιούν τις ανοσοποιητικές οδούς και τους μηχανισμούς ανοσοποίησης όπου στη συνέχεια σηματοδοτούν την απελευθέρωση διαφόρων κυτοκινών και χημειοκινών όπου και εκείνες με τη σειρά τους θα προσελκύσουν ουδετερόφιλα στις προσβεβλημένες περιοχές και άλλα λευκοκύτταρα που συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Τα αντιγονοπαρουσιαστικά λευκοκύτταρα όπως τα δενδριτικά και τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα κύτταρα εμποδίζονται από την αιθανόλη και δεν καταφέρνουν να επιτελέσουν τη προστατευτική τους δράση ως πρώτη γραμμή ανοσολογικά κύτταρα. Η μεγάλη συγκέντρωση αιθανόλης προκαλεί φαινόμενα παρόμοια με φλεγμονή καθώς αυξάνει τα λευκοκύτταρα και την καλπροτεκτίνη, έναν δείκτη ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, μαζί με αύξηση σε πρωτεΐνες οξείας φάσης όπως η απτοσφαιρίνη που αφορά τη σύνδεση με την αιμοσφαιρίνη στο πλάσμα. Εδώ έρχονται παλαιότερες μελέτες να συμπληρώσουν πως τα Β- λεμφοκύτταρα που ενεργοποιούνται στο έντερο από την αιθανόλη που έχει επιδράσει σε επιθηλιακούς ιστούς και προκαλούν ανοσολογικές αποκρίσεις έχουν σημαντικό ρόλο στις ηπατικές βλάβες λόγω κατανάλωσης αλκοόλ. Επιπλέον, αλλαγές παρατηρήθηκαν στα επίπεδα suPAR και CD163, βιοδείκτες που είναι έντονα παρόντες σε ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα και μακροφάγα και μονοκύτταρα αντίστοιχα σε καταστάσεις φλεγμονής. Αυτές οι αλλαγές στην κατάσταση φλεγμονής που δεν βρίσκονται σε ισορροπία δείχνουν πως η αύξηση στον αριθμό των ουδετερόφιλων σε αλκοολικούς ασθενείς οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας στο ηπατικό πλάσμα και έντονη ενεργοποίηση προ-φλεγμονοδών κυτοκινών με σημαντικότερες τις TNF- $\alpha$ , IL-1,IL-4,IL-6,IL-10,IL-12,IL-17,IL-22,IFN- $\gamma$ ,TGF- $\beta$  και C-αντιδρώσα πρωτεΐνη. Συσσώρευση ουδετερόφιλων τα οποία είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση νεκρών κυττάρων αλλά σε φλεγμονώδεις καταστάσεις παρατηρείται σε αλκοολικές νόσους και σχετίζονται με βλάβη ηπατικού ιστού. Όλες οι παραπάνω καταστάσεις μπορούν να επανέλθουν σε φυσιολογικούς ρυθμούς μετά από απόλυτη αποχή από το αλκοόλ (29,30).

### **3.12 Διαγνωστικοί βιοδείκτες**

Υπάρχουν συγκεκριμένοι βιοδείκτες που είναι παρόντες σε αλκοολική ηπατική νόσο και είναι πολύ εύκολο να εντοπιστούν και να μετρηθούν σε δείγματα ορού, πλάσματος, ούρων, κοπράνων, αναπνοής και σε κυτταρικές αναλύσεις. Οι βιοδείκτες που μετρήθηκαν περιλαμβάνουν αρχικά τους πολυμορφισμούς του γονιδίου PNPLA3 που σχετίζονται με οξεία εμφάνιση αλκοολικής ηπατικής νόσου, την αλλαγή των ηπατικών μακροφάγων στον M1 φαινότυπό τους, αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων πάνω από 11.000 και των αιμοπεταλίων πάνω από 148.000 δείχνει προδιάθεση για ηπατική νόσο, τα επίπεδα τριμεθυλαμίνης(TMA) της αναπνοής συνεισφέρουν στη διάγνωση αλκοολικής νόσου, αυξημένα επίπεδα CCL-20 και CK-18 με μειωμένη αναλογία M30/M65 και τέλος βιοενέργεια μονοκυττάρων με μειωμένη βασική, ATP και συνδεδεμένη με διαρροή πρωτονίων κατανάλωση οξυγόνου (30).

## Κεφάλαιο 4: Το οξειδωτικό στρες

### 4.1 Τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε οξειδωτικό στρες

Σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση συσκευών μικροκυκλοφορίας με μικροκανάλια μεγάλος αριθμός ερυθροκυττάρων υπό οξειδωτικό στρες χωρίστηκε σε δύο κατηγορίες, σε κανονικά και σε αργά κύτταρα λόγω από αλλαγές που έγιναν στα ερυθρά αιμοσφαίρια σε παραμέτρους όπως το σχήμα και το μέγεθος όπως έδειξαν οι αιματολογικές αναλύσεις. Τα κύτταρα με οξειδωτικό στρες φάνηκε πως βρήκαν δυσκολία να διαβούν τα μικροκανάλια καθώς παρατηρήθηκε μειωμένη ταχύτητα διέλευσης. Το γεγονός αυτό μας δείχνει την άμεση επίδραση του οξειδωτικού στρες σε ερυθροκύτταρα και την παρεμπόδιση της μικροκυκλοφορίας (32).

### 4.2 Παθοφυσιολογία οξειδωτικού στρες

Όπως προαναφέρθηκε το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται λόγω υπερπαραγωγής προ-οξειδωτικών μορίων και μειωμένων επιπέδων αντιοξειδωτικών παραγόντων. Στη σύγχρονη βιολογία και ιατρική έχουν μελετηθεί διάφορα δραστικά είδη με την ταυτοποίηση τεσσάρων από αυτά να αποτελεί στόχο ιδιαίτερης έρευνας. Τα κύρια δραστικά είδη λοιπόν είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS), οι δραστικές μορφές θείου (RSS) και τέλος οι δραστικές μορφές καρβονυλίου (RCS).

Αρχικά ας μελετήσουμε τις δραστικές μορφές οξυγόνου. Σχηματίζονται από μερική αναγωγή του οξυγόνου και περιλαμβάνουν κυρίως ανιόντα υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), ρίζες υδροξυλίου ( $-OH$ ) και υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Οι πρώτες δύο κατηγορίες χαρακτηρίζονται από πολύ ασταθή ασύζευκτα ηλεκτρόνια, ενώ η κατηγορία του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι μία μη δραστική μορφή ενός μορίου χημικά σταθερού, μακρόβιου με ικανότητα ελεύθερης διάχυσης. Σχετικά με το ROS θα ήταν εύλογο να τονίσουμε τον ρόλο του υπεροξειδίου του υδρογόνου ως κύριο παράγοντα της οξειδοαναγωγικής ρύθμισης όπου η παραγωγή του σηματοδοτείται από μεταβολικούς παράγοντες, χημειοκίνες, κυτοκίνες με κίνδυνο όμως σε πολύ υψηλές ποσότητες  $H_2O_2$  να γίνεται μη ειδική οξείδωση πρωτεϊνών με αποτέλεσμα κυτταρικό θάνατο. Όσον αφορά τη διαδικασία παραγωγής των ROS υπάρχουν δύο οδοί, η ενδογενής και η εξωγενής οδός. Κατά την ενδογενή οδό λαμβάνουν μέρος κυτταρικές διαδικασίες όπως η μιτοχονδριακή

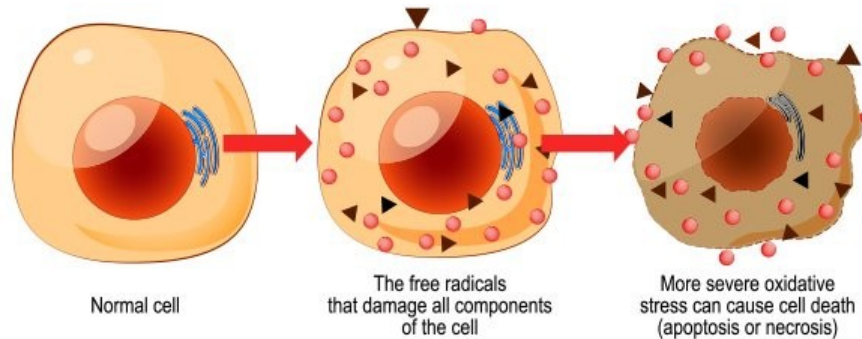
αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC), η οξείδωση που είναι εξαρτώμενη από τη φλαβίνη και η μικροσωμική οξείδωση. Στην εξωγενή οδό παρατηρούμε φαινόμενα όπως παραγωγή ROS λόγω ξενοβιοτικού μεταβολισμού (πχ αντιμυκίνη και αδριαμυκίνη). Η παραγωγή των ROS φαίνεται πως εντείνεται και μετά από έκθεση σε θρεπτικά συστατικά, ρύπους και άλλους φυσικούς παράγοντες όπως το υπεριώδες φως, οι υπέρηχοι, ακτίνες Χ αλλά και προϊόντα αυτοοξείδωσης όπως η αιμοσφαιρίνη και οι φλαβίνες.

Το RNS είναι μία κατηγορία μορίων που παράγονται ύστερα από αλληλεπίδραση του αζώτου με οξειδωτικά και αναγωγικά μόρια όπως το υπεροξείδιο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου είτε με ενδογενή είτε με εξωγενή τρόπο. Οι πιο γνωστοί πρεσβευτές των RNS είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το οποίο έχει και τον πιο σημαντικό ρόλο στην οξειδωαναγωγή και τα υπερνιτρώδη (ONOO<sup>-</sup>). Εκτός από το μονοξείδιο του αζώτου, ένα άλλο μόριο, το υπεροξυνιτρικό, αποτελεί κύριο παράγοντα νιτροποίησης που προέρχεται από την αντίδραση του NO με ένα ανιόν υπεροξειδίου, είναι βραχύβιο και επάγει σημαντικά τον κυτταρικό θάνατο.

Το RSS είναι μια κατηγορία δραστικών ειδών που περιλαμβάνουν βιομόρια θείου με μέγεθος που κυμαίνεται από μικρά μόρια έως πρωτεΐνες και προέρχεται από την οξείδωσηθειώδους ήθειικών μορίων ή ως παραπροϊόν των κυρίωνθειολών. Οι πιο κοινές μορφές RSS αφορούν το υδρόθειο (H<sub>2</sub>S) το οποίο είναι το πιο βραχύβιο RSS με παρατεταμένη επίδραση στον οργανισμό θηλαστικών,θειόλες πρωτεΐνης, ενώσεις χαμηλής μοριακής μάζας όπως η γλουταθειόνη, η τρυπανοθειόνη, τα σουλφενικά οξέα (RSOH) και οι νιτροσοθειόλες (RSNO). Η δράση των RSS έχει παρατηρηθεί σε ασθένειες όπως η φλεγμονή, η αθηροσκλήρωση, το λιπώδες ήπαρ και η ιογενής ηπατίτιδα.

Τέλος τα RCS είναι ενώσεις με μία ή περισσότερες καρβονυλικές ομάδες που περιέχουν μεταβολικά δημιουργημένες αλδεΐδες και διεγερμένα από ηλεκτρόνια καρβονυλικά μόρια όπως η ακετόνη, η φορμαλδεΐδη και η ακρολεΐνη. Η διαδικασία προέλευσης τους σχετίζεται με μη ενζυμικές διεργασίες όπως η υπεροξείδωση λιπιδίων, η οξείδωση αμινοξέων και η γλυκοζυλίωση. Η επίδραση των RCS είναι κυρίως θετική όμως στην περίπτωση μεγάλων ποσοτήτων δημιουργεί φαινόμενα γήρανσης ως αποτέλεσμα συσσώρευσης τους σε ιστούς όπως το περιφερικό αίμα με μορφή τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης, αλλά και άλλα φαινόμενα όπως οι νευροεκφυλιστικές νόσοι και μεταβολικές ασθένειες.

# Oxidative stress



Εικόνα 5: Το κύτταρο σε οξειδωτικό στρες. Πηγή: <https://www.h-h-c.com/what-is-oxidative-stress-and-how-to-analyze-it/>

## 4.3 Οξειδωτικό στρες και ήπαρ

Το ήπαρ όπως είναι γνωστό αποτελείται από δύο ειδών κύτταρα, τα παρεγχυματικά, δηλαδή τα ηπατοκύτταρα και τα μη παρεγχυματικά που περιλαμβάνουν τα κύτταρα Kupffer, τα κολποειδή ενδοθηλιακά κύτταρα, τα αστροκύτταρα, τους περιπυλαίους ινοβλάστες και τα ηπατικά δενδριτικά κύτταρα. Το ήπαρ παράγει διάφορα είδη ελευθέρων ριζών όπως του οξυγόνου και του αζώτου (ROS και RNS αντίστοιχα) κυρίως λόγω αυξημένης μιτοχονδριακής αναπνοής.

Τα ηπατοκύτταρα, τα οποία καταλαμβάνουν και το μεγαλύτερο ποσοστό του ήπατος, είναι τα πρώτα κύτταρα που έρχονται σε επαφή με τα διάφορα συστατικά και προϊόντα του μεταβολισμού τα οποία μπορεί να είναι χρήσιμα ή βλαπτικά για τον οργανισμό. Για αυτό χρησιμοποιούν ένα μηχανισμό ο οποίος προστατεύει το ήπαρ και περιλαμβάνει την μετατροπή λιπαρών οξέων σε λιπομόρια. Η αυξημένη ποσότητα λιπιδίων οδηγεί σε μειωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία και επομένως σε ελλιπή παραγωγή ATP που είναι η βασική μορφή ενέργειας των κυττάρων. Το αποτέλεσμα είναι αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου που βλάπτουν το DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια ακόμα και γειτονικά κύτταρα και αποτελεσματικά επέρχεται κυτταρικός θάνατος και δημιουργία ίνωσης στον ηπατικό ιστό.

Τα κύτταρα Kupffer βρίσκονται στο κολποειδές ηπατικό ενδοθήλιο και είναι τα κύρια μακροφάγα υπεύθυνα για την καταστροφή και απομάκρυνση μικροβίων και των προϊόντων τους. Αν και η ενεργοποίησή τους αποδεικνύεται αποτελεσματική για την άμυνα από ξένους εισβολείς, πολλές φορές συνδέεται με την απαρχή ηπατικής βλάβης και ίνωσης με παράγοντες του περιβάλλοντος και της διατροφής να παίζουν επίσης ρόλο στην ενεργοποίησή τους εκτός από τις χημειοκίνες, τα κύτταρα φλεγμονής και τους αυξητικούς παράγοντες. Όλη η παραπάνω ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer και άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού φαίνεται πως αυξάνει την παραγωγή ROS και RNS με διάφορους μηχανισμούς που επηρεάζουν τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο.

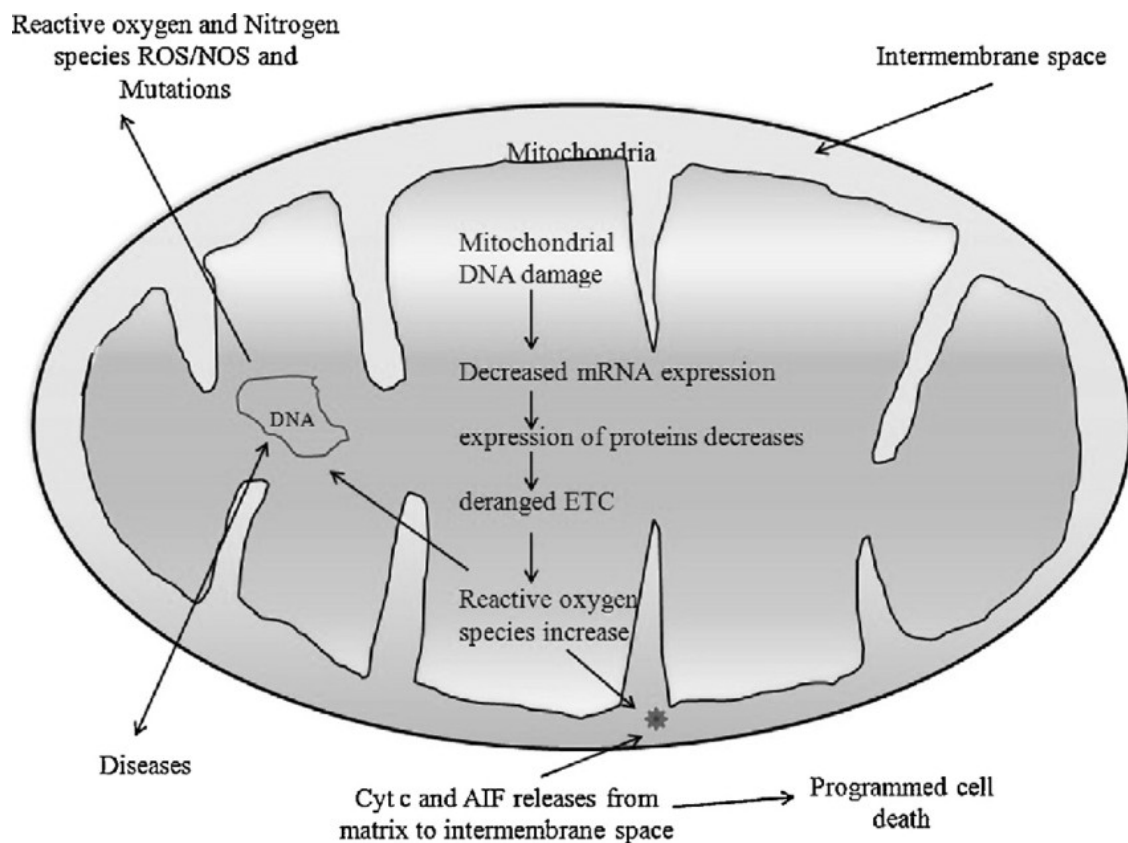
Τα ηπατικά αστροκύτταρα έχουν στηρικτικό ρόλο καθώς συμβάλλουν στη διατήρηση της δομής του ήπατος και στην ομαλή ροή του αίματος μέσω των μηχανισμών αυξομείωσης του εξωκυτταρικού στρώματος. Επιπλέον εκκρίνουν κυττοκίνες, χημειοκίνες και αυξητικούς παράγοντες, αποθηκεύοντας παράλληλα διάφορα ρετινοειδή όπως βιταμίνη Α. Τα ROS που παράγονται από τα κύτταρα Kupffer και λευκοκύτταρα ενεργοποιούν τα ηπατικά αστροκύτταρα σε μεγάλο βαθμό γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη σύνθεση πρωτεϊνών εξωκυτταρικού στρώματος η οποία οδηγεί σε ηπατική ίνωση.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν ως ρόλο τη διατήρηση του μικροπεριβάλλοντος και είναι η άμυνα πρώτης γραμμής και συμβάλλει σε καταστάσεις φλεγμονής, μεταφοράς μεταβολιτών και αγγειογένεσης και ξεκινούν τη διαδικασία αναγέννησης σε περιπτώσεις τραυματισμού. Επομένως εξωγενείς παράγοντες όπως ιοί και η αιθανόλη αλλά και ενδογενείς όπως κύτταρα φλεγμονής και αστροκύτταρα μπορεί να οδηγήσουν σε δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω έκθεσης σε ROS και σε περαιτέρω ηπατική βλάβη και ίνωση.

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού στο ήπαρ περιλαμβάνουν δενδριτικά κύτταρα, ουδετερόφιλα, κύτταρα φυσικούς φονείς και Β και Τ λεμφοκύτταρα. Αν και τα λευκοκύτταρα έχουν ρόλο προστατευτικό και ευνοϊκό προς τον οργανισμό, σε συγκέντρωση μεγάλου πληθυσμού προκαλούν βλάβη στον ιστό και χειροτερεύουν τη νόσο. Έχει αποδειχθεί πως τα κύτταρα αυτά παράγουν ROS με τα ουδετερόφιλα και τα Τ και Β λεμφοκύτταρα να αποτελούν τους κύριους κυτταρικούς πληθυσμούς που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες.

#### 4.4 Οξειδωτικό στρες και κυτταρικά οργανίδια

Τα μιτοχόνδρια έχουν κυρίαρχο ρόλο στην παραγωγή ATP, αλλά και στην κατανάλωση οξυγόνου, μέσω της οξείδωσης των μεσολαβητών του μεταβολισμού στο ETC. Η συσσώρευση όμως λιπαρών οξέων διαταράσσει την ισορροπία των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή ROS. Για να αντισταθμίσουν όμως την υπέρμετρη αυτή παραγωγή ROS έχουν εφοδιαστεί με διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που τα προστατεύουν. Τα ROS και η παθολογία τους σε σχέση με τα μιτοχόνδρια έχει μελετηθεί εις βάθος σε νόσους όπως η αλκοολική ηπατική νόσος, η μη αλκοολική λιπιδική ηπατική νόσος, η κίρρωση του ήπατος, η ιογενής ηπατίτιδα και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.



Εικόνα 6: Το οξειδωτικό στρες στα μιτοχόνδρια. Πηγή: [https://www.researchgate.net/figure/Mitochondrial-dysfunction-and-oxidative-stress-Mitochondrial-genome-can-be-affected-by\\_fig2\\_280940686](https://www.researchgate.net/figure/Mitochondrial-dysfunction-and-oxidative-stress-Mitochondrial-genome-can-be-affected-by_fig2_280940686)

Το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι το κύριο οργανίδιο υπεύθυνο για πρωτεϊνοσύνθεση και βιοσύνθεση στεροειδών, λιπιδίων και υδατανθράκων. Η οξειδωτική αναδίπλωση πρωτεϊνών οδηγεί σε παραγωγή ROS σε ποσοστό που φτάνει το 25% του συνολικού κυτταρικού ROS. Σε παθολογικές καταστάσεις η υπερενεργοποίηση της απόκρισης των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ROS και έχει συνδεθεί με κίρρωση του ήπατος. Το οξειδωτικό στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο συμβάλλει σε συσσώρευση ασβεστίου που με τη σειρά του επιδεινώνει την παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια οδηγώντας στην πρόοδο της νόσου.

Τα λυσοσωμάτα είναι τα κύρια οργανίδια που διαδραματίζουν το ρόλο της αυτοφαγίας, συμπεριλαμβανομένης και της απομάκρυνσης των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων μέσω της μιτοφαγίας. Έχουν μελετηθεί περιπτώσεις ηπατικής στέρσης θρεπτικών συστατικών που οδήγησε σε συσσώρευση δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων και αυξημένου οξειδωτικού στρες που είναι παρόν σε διάφορες ηπατικές παθολογικές καταστάσεις. Τέλος έχει αναφερθεί η σχέση των λυσοσωμάτων με την συσσώρευση σιδήρου που καταλύει την fenton αντίδραση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε διάφορες ηπατικές μελέτες.

#### **4.5 Παθοφυσιολογία οξειδωτικού στρες στις ηπατικές νόσους**

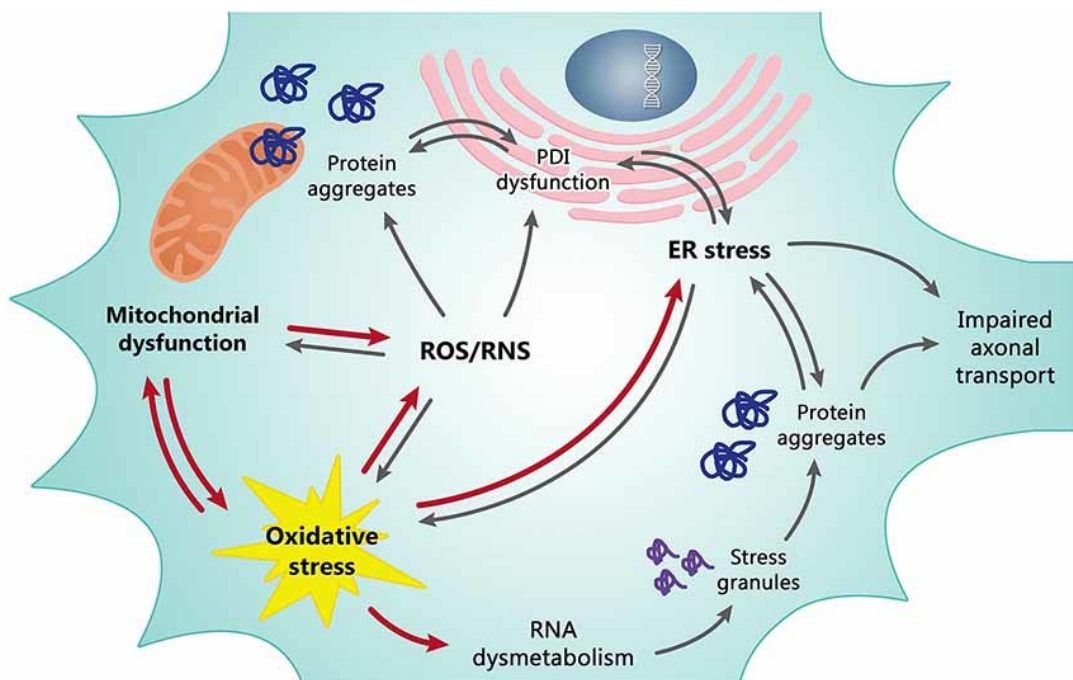
**Το οξειδωτικό στρες στη λιπώδη ηπατική νόσο.** Η διάγνωση της λιπώδους ηπατικής νόσου γίνεται όταν υπάρχουν λιπιδιομόρια σε πάνω από 5% των ηπατοκυττάρων ή αν το ποσό των τριγλυκεριδίων ξεπερνά το 5% του συνολικού ηπατικού βάρους. Η στεάτωση του ήπατος χωρίζεται σε μικρομοριακή και μακροκοριακή ανάλογα με το μέγεθος το λιπιδιομορίων. Στην πρώτη περίπτωση η στεάτωση οφείλεται σε δυσαναλογία της σύνθεσης τριγλυκεριδίων και στη δεύτερη περίπτωση σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Συχνά η στεάτωση περιορίζεται μόνη της αλλά σε αρκετές περιπτώσεις οδηγεί σε νόσο, ίνωση, κίρρωση, ακόμα και σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Στη λιπώδη ηπατική νόσο υπάρχουν δύο στάδια παθογένειας, το πρώτο είναι η αυξημένη παραγωγή και συσσώρευση λιπαρών οξέων και η λιποτοξικότητα και το δεύτερο είναι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία λόγω λιποτοξικότητας που αλλάζει την οξείδωση των λιπαρών οξέων και επιδεινώνει περαιτέρω τη συσσώρευση λιπιδίων άρα και τη στεάτωση και η αύξηση της παραγωγής ROS και η ιστική βλάβη του ήπατος λόγω αυξανόμενου οξειδωτικού στρες το



οποίο επηρεάζει επιπλέον το μεταβολισμό των λιπιδίων και επομένως την διαπερατότητα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, την απώλεια του δυναμικού της και τη σύνθεση του ATP.

**Οξειδωτικό στρες και φλεγμονή.** Η συγκέντρωση μεγάλων και τοξικών ποσοτήτων λιπαρών οξέων οδηγεί σε καταστάσεις φλεγμονής που ελκύουν στον κατεστραμμένο ιστό διάφορα λευκοκύτταρα όπως μακροφάγα και ουδετερόφιλα μέσω κυτοκινών και άλλων λιπιδιακών μεσολαβητών. Σε φυσιολογικές συνθήκες τα ROS προστατεύουν τα κύτταρα από παθογόνους μικροοργανισμούς όμως σε ηπατική νόσο τα ROS από τα λευκοκύτταρα ενεργοποιούν την έκκριση των DAMPs που με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα κύτταρα Kupffer και τα ουδετερόφιλα μέσω των TLR υποδοχέων. Όλα αυτά τα φαινόμενα επιδεινώνουν το οξειδωτικό στρες και την πρόοδο της ηπατικής βλάβης και νόσου.

**Οξειδωτικό στρες και ίνωση/κίρρωση του ήπατος.** Όπως είναι γνωστό διάφοροι εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες οδηγούν σε συνεχή βλάβη και φλεγμονή του ηπατικού ιστού με αποτέλεσμα να προκαλείται ηπατική ίνωση δηλαδή μεγάλη συσσώρευση εξωκυτταρικού στρώματος. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ινωγένεση μέσω της επιρροής σε ηπατοκύτταρα και κύτταρα Kupffer εκκρίνοντας κυτοκίνες και άλλους προ-φλεγμονώδεις παράγοντες όπως τον TNF-α και τον TGF-β οι οποίοι με τη σειρά τους παράγουν επιπλέον ROS που οδηγεί σε ηπατική βλάβη.



Εικόνα 7: Οξειδωτικό στρες και οργανίδια. Πηγή:

[https://www.researchgate.net/figure/Mitochondrial-dysfunction-and-oxidative-stress-OS-are-tightly-dependent-on-each-other\\_fig1\\_273155367](https://www.researchgate.net/figure/Mitochondrial-dysfunction-and-oxidative-stress-OS-are-tightly-dependent-on-each-other_fig1_273155367)

**Οξειδωτικό στρες και ηπατικός καρκίνος.** Η κίρρωση του ήπατος και οι ιογενείς ηπατοπάθειες μπορεί να εξελιχθούν σε ηπατικοκυτταρικό καρκίνωμα. Το οξειδωτικό στρες είναι παρόν σε κάθε στάδιο για τη δημιουργία του καρκινώματος όπως στην περίπτωση της λιπώδους ηπατικής νόσου η φλεγμονή και η παραγωγή των ROS που προκύπτει από αυτή οδηγεί σε βλάβη του DNA και των μηχανισμών επιδιόρθωσης που στη συνέχεια δημιουργούν μεταλλάξεις που ξεκινούν τη διαδικασία της καρκινογένεσης. Το γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες διαταράσσει τους μηχανισμούς αυτοφαγίας των προβληματικών κυττάρων ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Τέλος τα ROS αυξάνονται σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο μέσω των Fenton αντιδράσεων με σίδηρο.

#### **4.6 Βιοδείκτες οξειδωτικού στρες**

Οι δύο κύριοι βιοδείκτες για την αξιολόγηση της κατάστασης του ήπατος είναι οι τρανσαμινάσες ALT και AST. Τα επίπεδα AST αυξάνονται σε μυϊκό τραυματισμό, σε συγκεκριμένα αυτοάνοσα ακόμα και στην εγκυμοσύνη και πάνω από το 20% των ασθενών με κίρρωση μπορεί να φυσιολογικά επίπεδα ALT. Για αυτό το λόγο άμεσες μετρήσεις όπως των ROS και του οξειδωτικού στρες και των μορίων που επηρεάζουν όπως τα λιπίδια, το DNA, αμινοξέων και γλυκοπρωτεϊνών μπορούν να μας δώσουν μια πιο ξεκάθαρη εικόνα για την κατάσταση του ήπατος. Το MDA ανάμεσα στα παραπάνω είναι το πιο αντιπροσωπευτικό μόριο του οξειδωτικού στρες ειδικά σε λιπώδη ηπατική νόσο. Οι βιοδείκτες αυτοί μπορούν να εντοπιστούν απευθείας στο ήπαρ ή στον ορό με ELISA ή με μεθόδους φθορισμού. Η φασματοσκοπία μάζας είναι η πιο αποδοτική μέθοδος αναγνώρισης των ειδών ελευθέρων ριζών οξυγόνου και η μέτρηση επιπέδων των ROS μαζί με τις κλασσικές βιοχημικές εξετάσεις του ήπατος δίνουν μία καθοριστική εικόνα και διάγνωση για τον ασθενή (33).

#### **4.7 Οξείδωση αιμοσφαιρίνης**

Οι αιμοσφαιρίνες είναι κρίσιμες για τις μεταβολικές διεργασίες των οργανισμών όπου δρουν συμβιωτικά με μικροοργανισμούς στην διαδικασία δέσμευσης αζώτου ή διατηρούν την ενέργεια του κυττάρου σε καταστάσεις υποξίας δρώντας ως οξυγονάση στην γλυκολυτική οδό. Η αιμοσφαιρίνη μέσω χημικών αντιδράσεων αυτοοξειδώνεται όμως σε

παθολογικές καταστάσεις όπως η υποξία, ο κυτταρικός θάνατος και η θαλασσαιμία γίνει υπέρμετρη αυτοοξειδωση με αποτέλεσμα να υπάρχουν προβλήματα στην μεμβράνη των ερυθροκυττάρων και τελικά να παρατηρείται αιμόλυση (34).

#### **4.8 Φθορίδιο και οξειδωτικό στρες**

Η φθορίνη είναι μια χημική ουσία που βρίσκεται άπλετη στην επιφάνεια της γης σχεδόν αποκλειστικά με τη μορφή φθοριδίων. Εντοπίζεται σε μέταλλα, ποντικοφάρμακα, λιπάσματα και σε παράγωγα κάρβουνου και αποτελεί παράγοντα μόλυνσης του περιβάλλοντος. Μία από τις πιο ωφέλιμες χρήσεις του είναι ως συστατικό προϊόντων οδοντικής υγιεινής καθώς αποτρέπει την αλλοίωση των δοντιών. Σε μεγάλες όμως ποσότητες προκαλεί μία νόσο που ονομάζεται φθορίωση και περιλαμβάνει συμπτώματα όπως σκελετικές παραμορφώσεις και βλάβη σε νεύρα, γαστρεντερικό σύστημα, εγκέφαλο και νεφρά. Το φθορίδιο μπαίνει στον οργανισμό μέσω της γαστρεντερικής οδού, μεταβαίνει με παθητική διάχυση στην κυκλοφορία του αίματος και στη συνέχεια στους διάφορους επικείμενους ιστούς. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι εκείνα που επηρεάζονται πιο άμεσα και περισσότερο από ουσίες όπως η φθορίνη που επιδεινώνει το ήδη υπάρχον ενδογενές οξειδωτικό στρες προκαλώντας αιματολογικά προβλήματα όπως αναιμία και κυτταρικό θάνατο μέσω κυτταρικών βλαβών όπως καταστροφή του DNA, δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και οξείδωση λιπιδίων της μεμβράνη και πρωτεϊνών κάνοντας έτσι την μεμβράνη πιο εύθραυστη και επιρρεπή σε λύση. Το φθορίδιο εμποδίζει τη δράση πολλών αντιοξειδωτικών και του ATP και μειώνει τα επίπεδα γλουταθειόνης. Επιπλέον, αυξάνει την μακροφαγική δραστηριότητα που απομακρύνει τα μολυσμένα με φθορίδιο ερυθροκύτταρα. Τέλος το φθορίδιο εμποδίζει την ερυθροποίηση και προκαλεί αιμοποιητικές δυσλειτουργίες λόγω της συσσώρευσης του στον μυελό των οστών (35).

Για τα εργαστηριακά ευρήματα σε ηπατική κίρρωση έχει βρεθεί πως τα επίπεδα μεθαιμοσφαιρίνης είναι αρκετά υψηλά μαζί με οξειδωτικούς βιοδείκτες όπως το μονοξειδίο του αζώτου. Η δράση της NADH- αναγωγή μεθαιμοσφαιρίνης ήταν αισθητά χαμηλότερη όπως και διάφορα αντιοξειδωτικά και το ATP. Τέλος υπήρχε σημαντική διαφορά στην αναλογία μεμβρανικής χοληστερόλης/φωσφολιπιδίων σε άτομα με αιμορραγία λόγω κίρρωσης όπως και διαφορετική οσμωτική ευθραυστότητα (36).

#### **4.9 Προστασία έναντι στο οξειδωτικό στρες**

Οι προστατευτικές δράσεις κατά των ROS γίνονται από ποικιλία ενζύμων και μη ενζυματικές ενώσεις. Όταν η λειτουργία του αντιοξειδωτικού αυτού συστήματος δεν είναι η αναμενόμενη τότε τα απενεργοποιημένα ROS πληθαίνουν και δημιουργείται ένα επιβλαβές επίπεδο οξεινοαγωγικής κατάστασης και προκύπτουν ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Αυτά περιλαμβάνουν αλλαγές σε αμινοξέα όπως κυρίως η κυστεΐνη, η τρυπτοφάνη, τυροσίνη, ιστιδίνη και πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν αυτά τα αμινοξέα. Ο ρόλος της μελατονίνης περιλαμβάνει την προστασία της κυτταρικής μεμβράνης, στις κυτταρικές πρωτεΐνες στον δομικό και λειτουργικό τομέα καθώς και να εντοπίζει ως στόχο τα ROS και τα δραστικά είδη υδρογόνου. Η μελατονίνη είναι ένα παράγωγο σεροτονίνης που προέρχεται από την υπόφυση. Κυρίαρχος ρόλος της είναι να ρυθμίζει τον ύπνο και τον κirkάδιο ρυθμό αλλά σύμφωνα με σύγχρονες μελέτες η μελατονίνη επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημα και έχει ταυτόχρονα αντιοξειδωτικό, αντιφλεγμονώδη και αντι-αποπτωτικό ρόλο. Αυξάνει τα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων και έχει αποδειχτεί πως σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η κίρρωση, η στεάτωση και η αλκοολική ηπατική νόσος η χορήγηση μελατονίνης βελτιώνει και επιδιορθώνει την ηπατική λειτουργία (6).

#### **4.10 Οξειδωτικό στρες και ιογενής ηπατίτιδα**

Οι ιοί είναι γνωστό πως αλλάζουν το περιβάλλον του ξενιστή ως προς το όφελος τους. Το ίδιο κάνουν και στις οξειδοαναγωγικές οδούς όπου διαταράσσουν την ισορροπία παραγωγής και απομάκρυνσης οξειδωτικών ριζών για να ενισχύσουν τους μηχανισμούς αντιγραφής και τον πολλαπλασιασμό τους. Στις ιογενείς ηπατοπάθειες έχει παρατηρηθεί συσσώρευση βιοδεικτών οξειδωτικού στρες το οποίο έχει προκληθεί από μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και διαταραχή στο σύστημα αναδίπλωσης πρωτεϊνών. Δεν προκαλούν όμως οι ιοί μόνο αλλαγές στον αριθμό των ROS καθώς έχει αποδειχθεί πως και τα ROS ασκούν επίδραση σε διάφορα στάδια του κύκλου ζωής των HBV και HCV. Επιπλέον τα ROS έχουν προκαλέσει παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών που οδηγεί σε καταστάσεις ηπατικής φλεγμονής, είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία νεοπλαστικών γεγονότων σε ηπατοκύτταρα, για μεταβολικές αλλαγές και για την παρεμπόδιση προαποπτωτικών οδών των κυττάρων (3).

## Κεφάλαιο 5: Το οξειδωτικό στρες στην αλκοολική ηπατική νόσο

### 5.1 Μεταβολισμός αιθανόλης

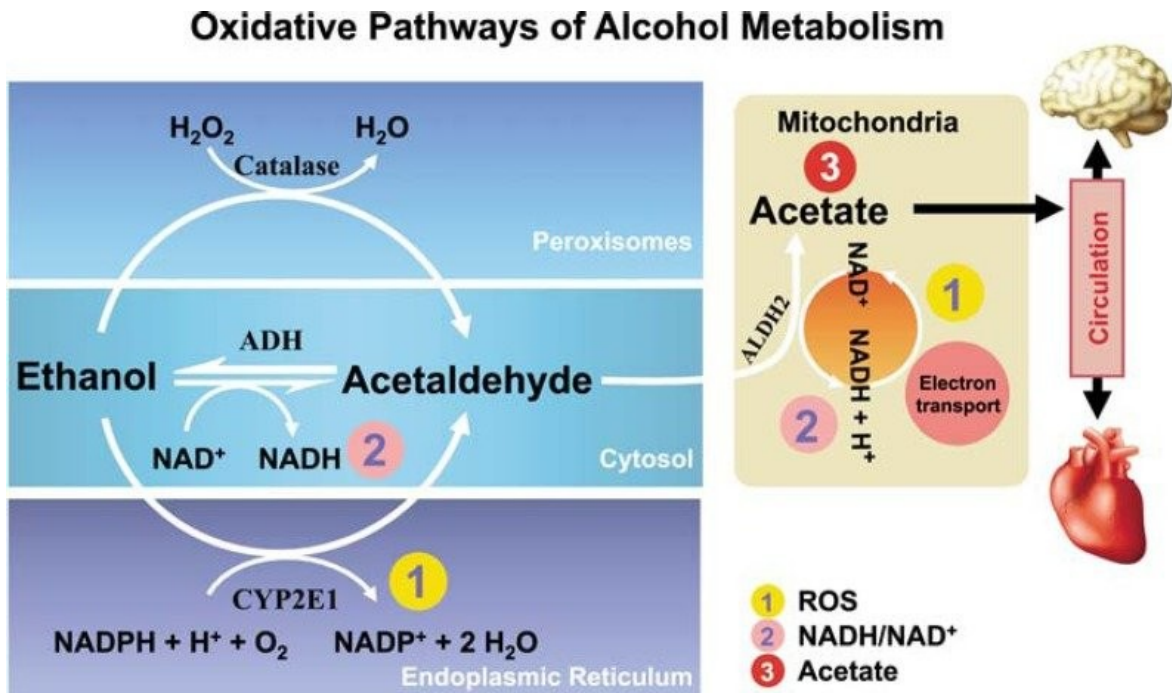
Η αιθανόλη εισέρχεται στον ανθρώπινο οργανισμό με την κατανάλωση αλκοολούχων ποτών. Μεταφέρεται από την κυκλοφορία του αίματος στο ήπαρ όπου τα ηπατοκύτταρα την απομακρύνουν μέσω οξειδωτικού και μη-οξειδωτικού μεταβολισμού. Τα μόρια της αιθανόλης στον οξειδωτικό μεταβολισμό ακολουθούν δύο μεταβολικές οδούς, η πρώτη περιλαμβάνει την αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) και η δεύτερη τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 και πιο συγκεκριμένα το CYP2E1. Τα προϊόντα των οδών αυτών είναι μεταβολίτες της αιθανόλης όπως η ακεταλδεΐδη και οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) που οδηγούν σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες όταν φτάσουν σε αυξημένα επίπεδα. Κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού μεταβολισμού παρατηρείται επίσης μείωση των αποθεμάτων ποικίλων αντιοξειδωτικών όπως είναι η γλουταθειόνη.

Η κύρια μεταβολική οδός της αιθανόλης ενεργοποιείται από τη δράση της ADH, ενός ενζύμου που χρησιμοποιεί το NAD<sup>+</sup> για να οξειδώσει την αιθανόλη σε ακεταλδεΐδη στο κυτταρόπλασμα μειώνοντας την αναλογία NAD<sup>+</sup>/NADH και διευκολύνοντας έτσι τη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ λόγω μειωμένης οξείδωσης των λιπαρών οξέων. Σε φυσιολογικές ηπατικές συνθήκες η ακεταλδεΐδη μεταβολίζεται ταχύτατα σε ακετόνη μέσω της αλδεϋδικής διυδρογονάσης (ALDH), όμως στην αλκοολική ηπατική νόσο η οδός της ADH/ALDH διαταράσσεται και παράγει δραστικές αλδεΐδες και λιπιδικά υπεροξειδία του υδρογόνου που μπορούν να βλάψουν το ήπαρ ύστερα από πρόσδεση σε πρωτεΐνες και στο DNA.

Η δεύτερη σημαντικότερη μεταβολική οδός της αιθανόλης εστιάζει στο ένζυμο CYP2E1 το οποίο προϋποθέτει τη συμβολή του NADPH για να δράσει στη μεταβολική οδό της ADH ειδικά σε ασθενείς με χρόνια υπερκατανάλωση αλκοόλης. Κύριος ρόλος του CYP2E1 είναι ο μεταβολισμός της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη μέσω της μετατροπής του NADPH και του οξυγόνου σε NADP<sup>+</sup> και νερό παράγοντας έτσι διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου. Αποτελεσματικά το CYP2E1 ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες του στρες, προκαλεί μιτοχονδριακό στρες και διαταραχές στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ηπατοκυτταρικό θάνατο και καρκινογένεση μέσω οξειδωτικής βλάβης του DNA.

Η νικοτιναμίδη της N-μεθυλοτρανσφεράσης (NNMT) αποτελεί άλλο ένα πολύ σημαντικό ένζυμο στην αλκοολική ηπατική νόσο και γενικότερα στην ηπατική λειτουργία

καθώς είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της ομοιόστασης του NAD<sup>+</sup> και επηρεάζει την διαδικασία της αυτοφαγίας και μπορεί να προστατεύσει τα αγγεία του ήπατος από το οξειδωτικό στρες λόγω του ευνοϊκού του ρόλου στο ενδοθήλιο. Γενικότερα τα αυξημένα ποσοστά του NNMT έχουν συνδεθεί με καλύτερο μεταβολισμό και μειωμένα επίπεδα λιπαρών οξέων (37).



Εικόνα 8: Μεταβολισμός αιθανόλης. Πηγή: [https://www.researchgate.net/figure/Oxidative-pathways-of-alcohol-metabolism-Alcohol-is-metabolized-mainly-in-the-cytosol-by\\_fig4\\_259209496](https://www.researchgate.net/figure/Oxidative-pathways-of-alcohol-metabolism-Alcohol-is-metabolized-mainly-in-the-cytosol-by_fig4_259209496)

## 5.2 Οξειδωτικό στρες στην αλκοολική ηπατική νόσο και φλεγμονή

Τα ηπατοκύτταρα στην αλκοολική ηπατική νόσο που έχουν εκτεθεί οξειδωτικό στρες υπόκεινται σε διάφορες βλάβες και οδηγούνται ακόμα και σε κυτταρικό θάνατο. Αυτά τα κύτταρα στις παθολογικές αυτές καταστάσεις παράγουν έναν αριθμό μεσολαβητών της φλεγμονής όπως χημειοκίνες, κυτοκίνες και DAMPs τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα και τις διαδικασίες του. Τα DAMPs αναγνωρίζονται όπως ξέρουμε από ειδικούς υποδοχείς TLRs και έτσι ξεκινά η ανοσολογική απόκριση συμπεριλαμβανομένων των οδών της φλεγμονής. Επιπλέον η ενισχυμένη

παραγωγή κυτοκινών, χημειοκινών και των μορίων προσκόλλησης οδηγεί σε διαχωρισμό και ενεργοποίηση κυττάρων της έμφυτης ανοσίας όπως είναι τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τα κύτταρα Kupffer. Η κατανάλωση αλκοόλης προκαλεί αύξηση των ROS και των λιπιδικών υπεροξειδίων, διευκολύνοντας την δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων που δρουν ως νεοαντιγόνα και προωθούν την ανοσία με T και B λεμφοκύτταρα. Επομένως παρατηρείται μία αμφίδρομη σχέση μεταξύ οξειδωτικού στρες και φλεγμονής καθώς η ενεργοποίηση του ενός ενισχύει την παραγωγή του άλλου, δηλαδή τα ROS από κατεστραμμένα κύτταρα δημιουργούν φλεγμονή και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού παράγουν επιπλέον ROS ενισχύοντας έτσι το οξειδωτικό στρες (38).

### **5.3 Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στην αλκοολική ηπατική νόσο**

Όπως είναι γνωστό η κατανάλωση αλκοόλης οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ROS και RNS που ανιχνεύονται σε πλάσμα και ούρα. Οι βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες φαίνεται πως έχουν άμεση συσχέτιση με το βαθμό της ηπατικής βλάβης. Επιπλέον αντιοξειδωτικοί βιοδείκτες όπως είναι η γλουταθειόνη και οι βιταμίνες C και E βρέθηκαν σε μειωμένα επίπεδα στην αλκοολική ηπατική νόσο. Ένα άλλο θέμα που έχει διερευνηθεί είναι οι πολυμορφισμοί του αντιοξειδωτικών γονιδίων κυρίως για εκείνο της GST δηλαδή της s-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης. Τα γονίδια GSTM1 και GSTT1 έχουν συνδεθεί με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αλκοολικής ηπατικής νόσου και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τα ένζυμα GST έχουν κυρίαρχο ρόλο στην αποτοξίνωση των δραστικών αλδεϋδών που προκαλούν ηπατικές βλάβες. Επιπρόσθετα οι πολυμορφισμοί των αντιοξειδωτικών γονιδίων αλληλεπιδρούν με άλλα ένζυμα όπως εκείνα που αφορούν την βιομεταφορά ξενοβιοτικών με αποτέλεσμα την επιδείνωση της με παράδειγμα τον γενότυπο GSTM1-μηδέν με έναν πολυμορφισμό του P4502E1 (33).

### **5.4 L-NAME και οξειδωτικό στρες στην αλκοολική ηπατική νόσο**

Το οξειδωτικό στρες συνεισφέρει σημαντικά στην δημιουργία βλάβης στο ήπαρ που σχετίζεται με κατανάλωση αλκοόλης. Πιο συγκεκριμένα το μονοξείδιο του αζώτου (NO) έχει συνδεθεί έντονα με την ηπατοτοξικότητα όταν υπάρχουν αλλαγές στην παραγωγή του

και στις δράσεις του οδηγώντας έτσι σε παθολογικές καταστάσεις όπως στην χρόνια ηπατική νόσο όπου εντοπίστηκαν αυξημένα επίπεδα NO. Σε κάποια όμως πειράματα που έγιναν σε αρουραίους με φλεγμονή παρατηρήθηκε ότι η παρεμπόδιση της δράσης του μονοξειδίου του αζώτου επιδεινώνει τη βλάβη και δυσλειτουργία των ιστών. Επομένως, τα αποτελέσματα σχετικά με τη δράση του NO φαίνονται αντικρουόμενα.

Σε μία μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένας γενικός αναστολέας, η L-NAME για να διαπιστωθεί αν η αναστολή της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου μειώνει το οξειδωτικό στρες σε αρουραίους. Τα ευρήματα έδειξαν ότι το NO έχει άμεση σχέση με κυτταρική βλάβη όταν είναι παρούσες αυξημένες ποσότητες αιθανόλης σε έναν οργανισμό και εντοπίζεται σε μεγάλα επίπεδα. Σε καταστάσεις φλεγμονής παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του NO και η κυτταρική βλάβη είναι δευτερογενής και η χορήγηση L-NAME μειώνει το οξειδωτικό στρες με την ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών παραγόντων. Συμπερασματικά το NO είναι υπεύθυνο για οξειδωτική βλάβη και η αναστολή της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου μειώνει το οξειδωτικό στρες στην αλκοολική ηπατική νόσο (39).

## 5.5 Παθογένεια αλκοολικής ηπατικής νόσου και οξειδωτικό στρες

**Παραγωγή ROS:** Ο μεταβολισμός της αιθανόλης μέσω του CYP2E1 και της οξειδάσης NADPH 4 (NOX4) οδηγεί σε υπερβολική παραγωγή ROS στα ηπατικά κύτταρα, η οποία διαταράσσει το DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, επηρεάζοντας τις κυτταρικές λειτουργίες. **Ανεπάρκεια γλουταθειόνης (GSH):** Το υπερβολικό ROS βλάπτει τους μεταφορείς GSH, προκαλώντας ανεπάρκεια GSH στα μιτοχόνδρια και με αποτέλεσμα μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, ακανόνιστο σχήμα, μειωμένη σύνθεση πρωτεϊνών και αλλοίωση της παραγωγής ATP. **Υπεροξειδωση λιπιδίων:** Το ROS προάγει τον σχηματισμό προϊόντων υπεροξειδωσης λιπιδίων όπως το MDA και το 4-HNE, τα οποία σχηματίζουν προϊόντα προσθήκης DNA που οδηγούν σε απόπτωση και νέκρωση, συμβάλλοντας σε ηπατικές ασθένειες που προκαλούνται από την αιθανόλη. **Οδοί σηματοδότησης:** Η αιθανόλη επηρεάζει τις οδούς σηματοδότησης, ιδιαίτερα το μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -κατενίνης, αυξάνοντας την έκφραση των σχετικών πρωτεϊνών και ενδεχομένως συμβάλλοντας στα επίπεδα τριγλυκεριδίων του ήπατος. **Φλεγμονώδης απόκριση:** Η αιθανόλη μεταβάλλει τη σηματοδότηση του υποδοχέα 4 (TLR4) που μοιάζει με Toll, οδηγώντας σε ενεργοποίηση



φλεγμονωδών καταρρακτών που περιλαμβάνουν MyD88, κινάσες που σχετίζονται με τον υποδοχέα IL-1, MAPKs, JNK, P38 και ERK, με αποτέλεσμα φλεγμονή και απόπτωση (40).

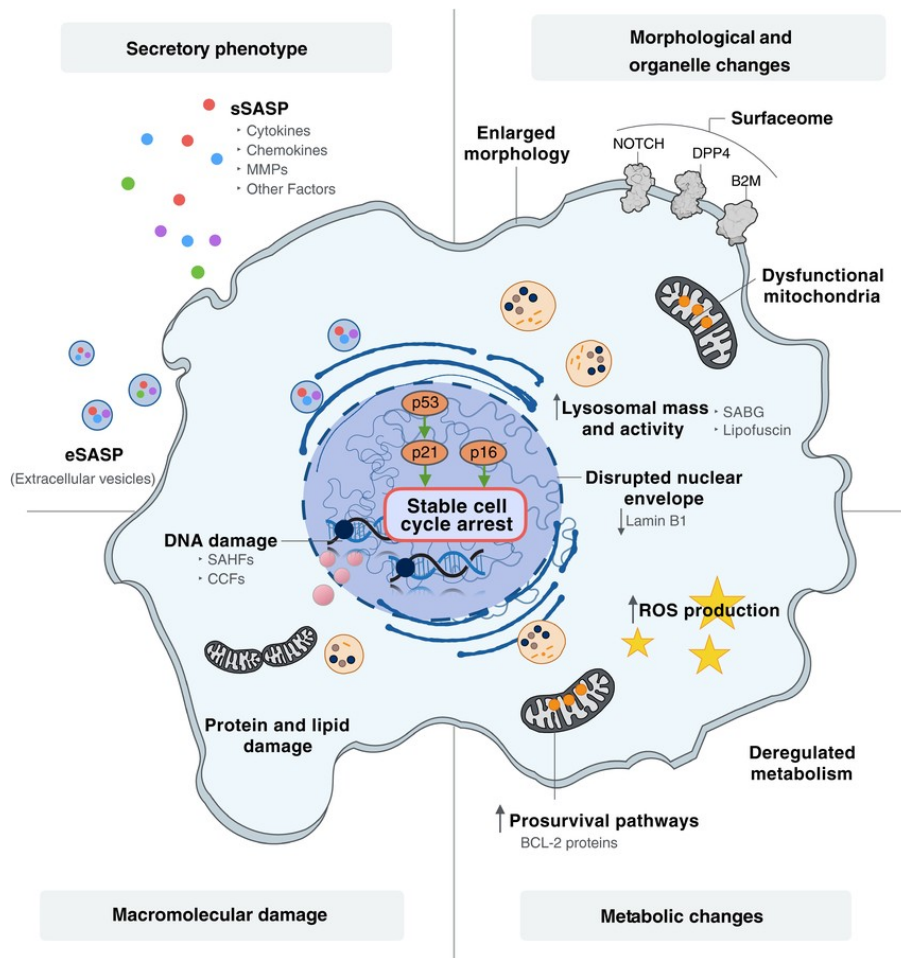
## **5.6 Οξειδωτικό στρες και ερυθροκύτταρα σε επίδραση αιθανόλης**

Τα ερυθροκύτταρα είναι γνωστό πως είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά οξυγόνου σε όλους τους ιστούς στον ανθρώπινο οργανισμό. Η συνεχής έκθεση στο οξυγόνο και το οξειδωτικό στρες προκαλούν βλάβες στο ερυθροκύτταρο οι οποίες επιδεινώνονται από το γεγονός ότι δεν υπάρχει δυνατότητα επιδιόρθωσης των οξειδωτικά κατεστραμμένων τμημάτων των ερυθροκυττάρων με νέες πρωτεΐνες. Έτσι τα ερυθροκύτταρα περιορίζονται σε έναν κύκλο ζωής 120 ημερών. Αν και τα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν διαθέτουν μιτοχόνδρια ώστε να χρησιμοποιούν το οξυγόνο σε αντιδράσεις παραγωγής ενέργειας, έχουν αναπτύξει διάφορα αντιοξειδωτικά συστήματα για να αντιμετωπίσουν το οξειδωτικό στρες είτε καταπολεμώντας απευθείας τις δραστικές μορφές οξυγόνου είτε ανακυκλώνοντας τα κατεστραμένα μόρια.

Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε με το αιθυλογλυκουρονίδιο, έναν υδροδιαλυτό μεταβολίτη, να λειτουργεί ως βιοδείκτης που ανιχνεύει πρόσφατη κατανάλωση αλκοόλης (έως και 80 ώρες) ακόμα κι αν εκείνη έχει απομακρυνθεί εντελώς από τον οργανισμό. Τα δείγματα αποτελούνταν από αποθηκευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια 10, 20 και 42 ημερών και ερευνήθηκε η σχέση του αιθυλογλυκουρονιδίου με το οξειδωτικό στρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν που οι δότες με αυξημένα επίπεδα αιθυλογλυκουρονιδίου είχαν επίσης αυξημένη σύνθεση γλουταθειόνης, μειωμένο μεταβολισμό γλυκόζης, μειωμένα επίπεδα ATP και μειωμένη παραγωγή γαλακτικού. Παρατηρήθηκε επίσης αυξημένο οξειδωτικό στρες με ανίχνευση μεγάλου αριθμού αλδεϋδών και τελικών προϊόντων υπεροξειδωσης γλουταθειονυλιωμένων λιπιδίων και οξείδωση μεθειονίνης και πουρινών. Η Γενικότερη εικόνα περιλαμβάνει την μειωμένη ενέργεια και αντιοξειδωτικό μεταβολισμό των ερυθροκυττάρων λόγω αλκοόλης (40).

## Κεφάλαιο 6: Κυτταρική γήρανση

Γήρανση είναι η μείωση των κυτταρικών λειτουργιών. Αυτό συνεπάγεται την αργή επούλωση πληγών λόγω της μειωμένης κυτταρικής μεταφοράς και κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθώς και μειωμένης παραγωγής κολλαγόνου. Επιπλέον ύστερα από προκαθορισμένο αριθμό διαιρέσεων τα κύτταρα σταματούν τον πολλαπλασιασμό και υπόκεινται σε προγραμματισμένη κυτταρική γήρανση. Η γήρανση επεκτείνεται και στους ιστούς και καταλήγει σε μειωμένο βάρος των οργάνων, ατροφία και δυσλειτουργία των φυσιολογικών συστημάτων και οδών. Η συγκέντρωση πολλών γερασμένων κυττάρων μπορεί να οδηγήσει και να επιδεινώσει τη χρόνια φλεγμονή. Τα κύτταρα που είναι έτοιμα για να προβούν σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο χαρακτηρίζονται από ένα εκκριτικό φαινότυπο που σχετίζεται με τη γήρανση το SASP και από αυξημένη απέκκριση προτεασών, χημειοκίνες, κυτοκίνες. Τα κύτταρα με φαινότυπο SASP είναι υπεύθυνα για την συγκέντρωση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και επηρεάζουν τη λειτουργία των γειτονικών κυττάρων. Η κυτταρική γήρανση έχει συνδεθεί με παθολογικές καταστάσεις όπως η αθηροσκλήρωση, η άνοια και ο καρκίνος. Επιπλέον σύνδεση έχει διαπιστωθεί μεταξύ της κυτταρικής γήρανσης και του γλυκολυτικού συστήματος λόγω των παραγόντων γήρανσης που αποτελούν στόχο του γλυκολυτικού μεταβολισμού (42).



Εικόνα 9: Η κυτταρική γήρανση μέσα στο κύτταρο. Πηγή: [https://www.researchgate.net/figure/Oxidative-pathways-of-alcohol-metabolism-Alcohol-is-metabolized-mainly-in-the-cytosol-by\\_fig4\\_259209496](https://www.researchgate.net/figure/Oxidative-pathways-of-alcohol-metabolism-Alcohol-is-metabolized-mainly-in-the-cytosol-by_fig4_259209496)

## 6.1 Ακετυλοχολινεστεράση και γήρανση ερυθρών κυττάρων

Για να κατανοήσουμε τη δομή και τη λειτουργία των ερυθροκυττάρων και τις αλλαγές στην ακετυλοχολινεστεράση έγιναν μελέτες σε ερυθροκύτταρα *in vivo* και *in vitro* παρατηρώντας την ενζυμική δραστηριότητα. Η μελέτη εξετάζει τις αλλαγές στην έκφραση πρωτεϊνών και την ενζυμική δραστηριότητα στα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs) με τη γήρανση, εστιάζοντας στην ακετυλοχολινεστεράση (AChE) και σε άλλες πρωτεΐνες που συνδέονται με το GPI. Η κυτταρομετρία ροής δεν έδειξε μεταβολή στην κυτταρική περιεκτικότητα σε AChE με την ηλικία, σύμφωνα με τα ευρήματα για άλλες συνδεδεμένες με GPI πρωτεΐνες όπως CD55 και CD59, υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει ειδική απώλεια αυτών των πρωτεϊνών μέσω κυστιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες. Ωστόσο, η δραστηριότητα του ενζύμου AChE μειώθηκε με την ηλικία, υποδηλώνοντας πρόωρη

απώλεια στη ζωή των RBC. Αυτή η απόκλιση υποδηλώνει ότι η δραστηριότητα της AChE είναι ένας ευαίσθητος δείκτης γήρανσης των RBC, σε αντίθεση με την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Επιπλέον, το CD59 μπορεί να υποστεί αλλαγές διαμόρφωσης μειώνοντας την προστατευτική του λειτουργία έναντι της ενεργοποίησης του συμπληρώματος.

Τα πρωτεομικά δεδομένα έδειξαν εκλεκτική ταξινόμηση των πρωτεϊνών της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού κατά τη διάρκεια του σχηματισμού κυστιδίων, που διαφέρει μεταξύ των συνθηκών *in vivo* και *in vitro*. Η αποθήκευση RBC σε τράπεζες αίματος δεν άλλαξε σημαντικά την έκφραση ή τη δραστηριότητα της AChE, αλλά η επαγόμενη από την αποθήκευση κυστιδοποίηση εμπλούτισε την ανενεργή AChE στα κυστίδια, υπογραμμίζοντας τις διαφορές μεταξύ *in vivo* και *in vitro* γήρανσης. Αυτό υποδηλώνει ότι τα κυστίδια από τα αποθηκευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορεί να βοηθήσουν στον εντοπισμό δομικών αλλοιώσεων κατά τη διάρκεια της γήρανσης, βοηθώντας στην κατανόηση των παρενεργειών της μετάγγισης. Οι συνθήκες αποθήκευσης συγκαλύπτουν τις αλλαγές που σχετίζονται με τη γήρανση λόγω της μεταβλητότητας μεταξύ των ατόμων και της αλλοιωμένης οσμωτικής συμπεριφοράς, περιπλέκοντας την ερμηνεία των δεδομένων κυτταρομετρίας ροής στο CD59 και τη γλυκοφορίνη A. Η μηχανική καταπόνηση κατά την επεξεργασία των RBC μπορεί να προκαλέσει αρχική απώλεια AChE, υποστηριζόμενη από αυξημένη φωσφατιδυλοσερίνη κατά την έκθεση των RBC αποθήκευση (43).

## **6.2 Κυτταρική γήρανση και ερυθροκύτταρα**

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια αποτελούν το 40-45% του όγκου του αίματος και υφίστανται σημαντικό στρες κατά τη διάρκεια της ζωής τους 120 ημερών. Η αποτελεσματική απομάκρυνση των γηρασμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της υγείας του κυκλοφορικού συστήματος. Η ζώνη 3, μια ενσωματωμένη πρωτεΐνη μεμβράνης, παίζει καθοριστικό ρόλο στη φυσιολογία των ερυθρών αιμοσφαιρίων, συμπεριλαμβανομένης της ανταλλαγής χλωρίου/διττανθρακικών, η οποία είναι απαραίτητη για τη μεταφορά CO<sub>2</sub> στο αίμα. Οι λειτουργίες της ζώνης 3 είναι ποικίλες. Η ζώνη 3 συμμετέχει στη μεταφορά αερίων, στη σταθερότητα της μεμβράνης/κυτταροσκελετού και στη σηματοδότηση για την κάθαρση των RBC.

Συμμετέχει επίσης στη διατήρηση του σχήματος και της σταθερότητας των RBC και αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες για να εκτελέσει αυτές τις λειτουργίες.

**Γήρανση και κάθαρση RBC.** Τα γηρασμένα ερυθρά αιμοσφαίρια εμφανίζουν αυξημένη έκθεση σε φωσφατιδυλοσερίνη, μειωμένο σιαλικό οξύ, χοληστερόλη και φωσφολιπίδια και αλλαγές στη δραστηριότητα των πρωτεϊνών. Αυτά τα κύτταρα γίνονται πιο πυκνά και απομακρύνονται από την κυκλοφορία από τα μακροφάγα μέσω μηχανισμών που εξαρτώνται από το IgG. Τα αυτοαντισώματα που επισημαίνουν τα γηρασμένα RBC είναι ειδικά για τη ζώνη 3.

**Μηχανισμοί σηματοδότησης γήρανσης.** Διάφορα μοντέλα προτείνουν διαφορετικούς μηχανισμούς για αλλαγές της ζώνης 3 που οδηγούν σε οψωνισμό (επικάλυψη κυττάρων για αναγνώριση μακροφάγων): **Πρωτεόλυση:** Η ζώνη 3 μπορεί να υποστεί αποικοδόμηση, αποκαλύπτοντας αντιγονικά θραύσματα. **Ομαδοποίηση:** Οξειδωμένα ημιχρώματα δεσμεύουν τη ζώνη 3, οδηγώντας σε ομαδοποίηση και αυξημένη δέσμευση αυτο-αντισώματος. **Διαμορφωτικές αλλαγές:** Η ζώνη 3 μπορεί να εκθέσει κανονικά κρυμμένες αντιγονικές περιοχές. **Επαναξιολόγηση μοντέλων:** Τα παραδοσιακά *in vitro* μοντέλα γήρανσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων έχουν περιορισμούς και ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν επακριβώς *in vivo* διαδικασίες. Οι πρόοδοι στην κατανόηση των πρωτεϊνών της μεμβράνης υποδηλώνουν έναν δυναμικό ρόλο για τη ζώνη 3 στη μεμβράνη, που περιλαμβάνει πιθανές αλλαγές διαμόρφωσης. **Τοποθεσίες αυτόματης δέσμευσης αντισωμάτων:** Η μελέτη προσδιορίζει δύο κύριες περιοχές δέσμευσης για αυτο-αντισώματα στη ζώνη 3. Η πρόσφατη κρυσταλλογραφία του Band 3 βοηθά στην κατανόηση αυτών των περιοχών σε ένα δομικό πλαίσιο. **Προτεινόμενος Μηχανισμός Μοριακού Ρολογιού:** Ο προτεινόμενος μηχανισμός υποδηλώνει ότι η ζώνη 3 υφίσταται σπάνιες διαμορφωτικές αλλαγές, εκθέτοντας κρυπτικά αντιγόνα για αυτοδέσμευση αντισωμάτων. Αυτή η δέσμευση ξεκινά τη ομαδοποίηση της ζώνης 3, επισημαίνοντας τα RBC για κάθαρση μακροφάγων. Συμπερασματικά η ζώνη 3 παίζει κεντρικό ρόλο στη σηματοδότηση της γήρανσης και της κάθαρσης των RBC. Οι πρόοδοι στη δομική βιολογία παρέχουν νέες γνώσεις σχετικά με τους εμπλεκόμενους μοριακούς μηχανισμούς (44).

### 6.3 Βιοδείκτες γήρανσης ερυθροκυττάρων

Σε πρόσφατη μελέτη που έγινε συλλέχθηκαν ερυθρά αιμοσφαίρια σε κιτρική φωσφορική δεξτρόζη που μπορούν να αποθηκευτούν για έως και 42 ημέρες στους 4°C σε διάλυμα πρόσθετου αλατούχου ορού-αδενίνης-γλυκόζης-μαννιτόλης. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, τα ερυθρά αιμοσφαίρια εμφανίζουν διάφορες αναστρέψιμες και μη αναστρέψιμες βλάβες που μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργικότητά τους κατά τη μετάγγιση. Ο στόχος μελέτης είναι η παρακολούθηση πολλών παραμέτρων ενδεικτικών του μεταβολισμού των κυττάρων, της αντιοξειδωτικής άμυνας, της μορφολογίας και της δυναμικής της μεμβράνης σε όλη την περίοδο αποθήκευσης. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνουν παρατήρηση πέντε συμπυκνώματα ερυθροκυττάρων εβδομαδιαίως για 42 ημέρες. Οι παράμετροι που μετρήθηκαν περιελάμβαναν εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις γλυκόζης και γαλακτικού, ολική αντιοξειδωτική ισχύ, ενδοκυτταρικά επίπεδα γλουταθειόνης (μειωμένη και οξειδωμένη), μικροκυστιδοποίηση, ποσοστό αιμόλυσης, αιματολογικές παραμέτρους, μορφολογικές αλλαγές και διακυμάνσεις της μεμβράνης χρησιμοποιώντας ψηφιακή ολογραφική μικροσκοπία. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η αντιοξειδωτική ισχύς και η ενδοκυτταρική γλουταθειόνη αρχικά αυξήθηκαν, κορυφώνοντας τη μία και δύο εβδομάδες αντίστοιχα. Οι μη αναστρέψιμες μορφολογικές αλλαγές άρχισαν να εμφανίζονται την τέταρτη εβδομάδα, όπου τα δισκοκύτταρα μετατράπηκαν σε παροδικά εχινοκύτταρα και τελικά σε σφαιροκύτταρα. Η μικροκυστικότητα και η αιμόλυση άρχισαν να αυξάνονται εκθετικά σε αυτό το στάδιο. Μέχρι την ημερομηνία λήξης (έξι εβδομάδες), η ενδοκυτταρική γλουταθειόνη μειώθηκε κατά 25%, υποδηλώνοντας αυξημένο οξειδωτικό στρες. Οι διακυμάνσεις της μεμβράνης έδειξαν μειωμένα πλάτη κατά τη μετάβαση από τα δισκοκύτταρα στα σφαιροκύτταρα. Με άλλα λόγια διάφορες βλάβες σε διαφορετικά χημικά και κυτταρικά επίπεδα συσσωρεύτηκαν κατά την αποθήκευση, επηρεάζοντας την *in vivo* ανάκτηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων μετά τη μετάγγιση. Σημειώθηκαν σημαντικές αλλαγές μετά από τέσσερις εβδομάδες αποθήκευσης, κάτι που ευθυγραμμίζεται με τα πρόσφατα κλινικά δεδομένα. Η μελέτη υπογραμμίζει ότι οι βλάβες αποθήκευσης ποικίλλουν μεταξύ των δωρητών και ότι η παρατεταμένη παρακολούθηση καταγράφει βλάβες σε βαθιά αποθήκευση. Συμπερασματικά η μελέτη παρέχει μια ολοκληρωμένη ανάλυση των αλλαγών των ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά την αποθήκευση, υπογραμμίζοντας τη σημασία της κατανόησης αυτών των αλλαγών για τη βελτίωση των

αποτελεσμάτων της μετάγγισης. Αυτή η πολυπαραμετρική ανάλυση προσφέρει πληροφορίες για το πώς τα ερυθρά αιμοσφαίρια επιδεινώνονται με την πάροδο του χρόνου στην αποθήκευση, παρέχοντας μια βάση για περαιτέρω έρευνα και πιθανές βελτιώσεις στις πρακτικές αποθήκευσης αίματος (45).

## Κεφάλαιο 7: Δείκτες γήρανσης και αλκοολική ηπατική νόσος

Σύμφωνα με έρευνες έχει αποδειχθεί πως η κατανάλωση αλκοόλ συνδέεται σταθερά με την επιγενετική επιτάχυνση της ηλικίας, ιδιαίτερα όταν μετράται από το επιγενετικό ρολόι GrimAge. Αυτή η συσχέτιση είναι ιδιαίτερα έντονη μεταξύ των ατόμων που αναφέρουν τα υψηλότερα επίπεδα κατανάλωσης αλκοόλ, επιβεβαιώνοντας τα προηγούμενα ευρήματα σχετικά με τη σχέση μεταξύ της χρήσης αλκοόλ και του συστατικού GrimAge PAI-1. Ενώ τόσο η πρόσφατη όσο και η κατανάλωση αλκοόλ καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής έδειξαν θετικές συσχετίσεις με το GrimAgeAccel, μόνο η χρήση εφ' όρου ζωής παρέμεινε σημαντική σε ένα μοντέλο που προσαρμόστηκε και για τους δύο παράγοντες. Δεν παρατηρήσαμε σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της μέσης κατανάλωσης αλκοόλ (πρόσφατη ή κατά τη διάρκεια της ζωής) και της επιτάχυνσης ηλικίας όπως μετρήθηκε από τα ρολόγια Hannum, Horvath ή PhenoAge. Ωστόσο, το ρολόι Hannum έδειξε συσχετισμούς με την τρέχουσα κατάσταση κατανάλωσης αλκοόλ και την πρόσφατη ένταση χρήσης αλκοόλ. Παρά την πιθανή υπολειπόμενη σύγχυση, η κατανάλωση αλκοόλ φαίνεται να σχετίζεται μέτρια με ορισμένες μετρήσεις βιολογικής ηλικίας που βασίζονται στη μεθυλίωση.

Οι ασυνέπειες στις συσχετίσεις μεταξύ της κατανάλωσης αλκοόλ και των μετρήσεων επιτάχυνσης ηλικίας σε όλες τις μελέτες μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στις περιόδους κατά τις οποίες αξιολογήθηκε η έκθεση στο αλκοόλ. Η αυτοαναφερόμενη εβδομαδιαία πρόσληψη αλκοόλ έχει δείξει μικτές συσχετίσεις με τα Hannum, Horvath και PhenoAge AgeAccel, τόσο πριν όσο και μετά την προσαρμογή για συγχυτές. Ομοίως, οι συσχετίσεις μεταξύ της πρόσφατης χρήσης αλκοόλ και του GrimAgeAccel ήταν ανάμεικτες, με αναφορές τόσο αντίστροφων όσο και θετικών συσχετισμών. Προηγούμενες μελέτες δεν εξέτασαν την αυτοαναφερόμενη χρήση αλκοόλ σε όλη τη ζωή, αλλά η κλινική εξάρτηση από το αλκοόλ έχει συνδεθεί με το Horvath και το PhenoAge AgeAccel. Ενώ η μελέτη μας βρήκε μια θετική συσχέτιση μεταξύ της χρήσης αλκοόλ κατά τη διάρκεια της ζωής και του GrimAgeAccel, προηγούμενη έρευνα είχε επίσης συνδέσει το GrimAgeAccel με λιπώδη ηπατική νόσο, που συνήθως προκαλείται από χρόνια βαριά κατανάλωση αλκοόλ.

Οι μεθοδολογικές διαφορές στην κατασκευή των επιγενετικών ρολογιών μπορεί να εξηγήσουν αυτές τις ποικίλες συσχετίσεις. Τα ρολόγια Hannum και Horvath αναπτύχθηκαν



χρησιμοποιώντας CpGs όπου η μεθυλίωση συσχετίζεται με τη χρονολογική ηλικία και προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι αυτά τα ρολόγια έχουν ελάχιστες συσχετίσεις με παράγοντες τρόπου ζωής που συνδέονται με τη θνησιμότητα, όπως το κάπνισμα ή η αδράνεια. Αντίθετα, τα ρολόγια PhenoAge και GrimAge προβλέπουν τον κίνδυνο θνησιμότητας χρησιμοποιώντας μεθυλίωση της θέσης CpG. Το ρολόι PhenoAge ενσωματώνει εννέα κλινικούς βιοδείκτες και χρονολογική ηλικία, ενώ το ρολόι GrimAge χρησιμοποιεί έναν συνδυασμό χρονολογικής ηλικίας, φύλου και οκτώ εκτιμητών μεθυλίωσης DNA (επτά για πρωτεΐνες πλάσματος και έναν για πακέτα-έτη καπνίσματος). Κατά συνέπεια, αυτά τα τέσσερα ρολόγια μπορεί να καταγράφουν διαφορετικές πτυχές του κινδύνου γήρανσης και θνησιμότητας, με το ρολόι GrimAge και τον εκτιμητή DNAm PAI-1 να αντικατοπτρίζουν ειδικά μοριακές διεργασίες που επηρεάζονται από τη μακροχρόνια κατανάλωση αλκοόλ (46).

## 7.1 Αίτια κυτταρικής γήρανσης

Οι αιτίες της κυτταρικής γήρανσης στα BM-MSC περιλαμβάνουν τον υπερβολικό πολλαπλασιασμό, τη βράχυνση των τελομερών και τα περιβάλλοντα οξειδωτικού στρες. Για την πρόωρη γήρανση που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες, τόσο οι μέτριες συγκεντρώσεις (100-200  $\mu\text{M}$ ) του εξωγενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου όσο και η υπερσυσσώρευση ενδοκυτταρικών αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) έχουν αποδειχθεί ότι πυροδοτούν τη γήρανση, που οδηγεί σε μειωμένο πολλαπλασιασμό και αλλοιωμένη διαφοροποίηση. Στη μελέτη μας, παρατηρήσαμε μια αύξηση στα ενδοκυτταρικά ROS στα BM-MSC μετά από έκθεση σε αιθανόλη (EtOH), η οποία ακολουθήθηκε από χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη γήρανση, όπως η διακοπή του κυτταρικού κύκλου και η αυξημένη δραστηριότητα SA- $\beta$ -gal. Τα αυξημένα επίπεδα ROS που προκαλούνται από EtOH πιθανότατα συμβάλλουν σε αυξημένους δείκτες γήρανσης στα BM-MSCs, σύμφωνα με προηγούμενα ευρήματα αυξημένης δραστηριότητας  $\beta$ -gal και μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με τη γήρανση σε οστεοβλάστες που έλαβαν EtOH. Προηγούμενη έρευνα δείχνει ότι 50 mM αλκοόλ καταστέλλει αποτελεσματικά τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών *in vitro* (Gong and Wezeman, 2004) και μετατοπίζει τη δέσμευση της γενεαλογίας BM-MSC προς τα λιποκύτταρα (Wezeman and Gong, 2004). Αυτή η μελέτη χρησιμοποίησε υψηλές δόσεις EtOH για να τονίσει διακριτά

χαρακτηριστικά γήρανσης και να δοκιμάσει αποκρίσεις που εξαρτώνται από τη συγκέντρωση. Χρησιμοποιώντας 250 mM EtOH, στοχεύαμε να προκαλέσουμε πρόωρη γήρανση σε καλλιεργημένα BM-MSC γρήγορα, αποφεύγοντας την αντιγραφική γήρανση. Απαιτούνται περαιτέρω in vivo μελέτες για να επιβεβαιωθεί ότι τα BM-MSC από ασθενείς ή ζώα με οστεοπενία που προκαλείται από το αλκοόλ εμφανίζουν περισσότερα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη γήρανση από τα κύτταρα που δεν έχουν υποβληθεί σε θεραπεία.

Τα συσσωρευμένα στοιχεία δείχνουν ότι η υπερβολική παραγωγή ROS οδηγεί σε οξειδωτική βλάβη του DNA και επακόλουθη κυτταρική γήρανση στα βλαστοκύτταρα. Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το EtOH έχει ως αποτέλεσμα βλάβη στο DNA και ελαττωματική επισκευή, πιθανώς αναστέλλοντας βασικούς παράγοντες επιδιόρθωσης όπως το 53BP1. Η λανθασμένα επισκευασμένη βλάβη του DNA ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες του σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου όπως η p53 και η p16INK4a, οδηγώντας σε πρόωρη γήρανση. Στους οστεοβλάστες, μια θεραπεία με EtOH 48 ωρών ενεργοποιεί τον αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p53 και τον στόχο του p21, ξεκινώντας τη γήρανση. Η μελέτη μας διαπίστωσε ότι οι θεραπείες EtOH ρύθμισαν σημαντικά τα επίπεδα mRNA του p16INK4a και πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη p16INK4a, κρίσιμη για τη μετάβαση της φάσης G1 σε S, είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των γηρασμένων ή γηρασμένων κυττάρων. Έτσι, τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι η επαγόμενη από EtOH πρόωρη γήρανση προκαλείται μέσω αυξημένων ρυθμιστών ROS και κυτταρικού κύκλου p21 και p16INK4a.

Κατά τη διερεύνηση των μηχανισμών πρόωρης γήρανσης που προκαλείται από EtOH σε BM-MSCs, βρήκαμε ότι η p38 ενεργοποιήθηκε σε γηρασμένα κύτταρα μετά την έκθεση σε EtOH. Η αναστολή της p38 με SB203580 απέτρεψε τους δείκτες γήρανσης διασώζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ωστόσο, η οξεία θεραπεία χαμηλής δόσης EtOH (5 mM) μείωσε την έκφραση του γονιδίου p38 στα καρδιοκύτταρα. Υποθέτουμε ότι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις EtOH και οι χρόνοι έκθεσης ευθύνονται για αυτές τις αντίθετες επιδράσεις στην ενεργοποίηση του p38. Είναι σημαντικό ότι παρατηρήσαμε ότι η επαγόμενη από EtOH πρόωρη γήρανση σε BM-MSCs συσχετίστηκε με ρυθμισμένο προς τα κάτω SIRT1. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας με 250 mM EtOH, τα επίπεδα πρωτεΐνης SIRT1 μειώθηκαν περισσότερο από τα επίπεδα mRNA. Οι θεραπείες με EtOH σε ηπατοκύτταρα μείωσαν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, προκάλεσαν την αποδιπλωμένη απόκριση πρωτεΐνης και προκάλεσαν στρες ER. Επομένως, η έκθεση σε EtOH υψηλής

συγκέντρωσης επηρεάζει τα μεταγραφικά στάδια, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και την αποικοδόμηση πρωτεΐνης στα BM-MSC. Ωστόσο, η συμπλήρωση με ρεσβερατρόλη (ResV), έναν ενεργοποιητή SIRT1, κατέστειλε φαινοτύπους γήρανσης, ενισχυμένο πολλαπλασιασμό, μειωμένο ROS και κατέστειλε παράγοντες μεταγραφής που σχετίζονται με τη γήρανση, υποδηλώνοντας ότι η ενεργοποίηση του SIRT1 από το ResV μπορεί να είναι μια νέα στρατηγική για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες ή της EtOH. επαγόμενη γήρανση σε MSC.

Το μειωμένο οστεογονικό δυναμικό των BM-MSCs είναι μια σημαντική αιτία οστεοπόρωσης που προκαλείται από το αλκοόλ. Η έκθεση σε 250 mM EtOH μείωσε δραματικά την ανοργανοποίηση της μήτρας από τα BM-MSCs σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα κύτταρα. Ωστόσο, μόνο μια ελαφρά μείωση παρατηρήθηκε στην ειδική για οστεοβλάστες γονιδιακή έκφραση. Υποθέτουμε ότι το EtOH επηρεάζει διαφορετικά διάφορα στάδια οστεογονικής διαφοροποίησης στα BM-MSCs, εμποδίζοντας την ανοργανοποίηση χωρίς να αναστέλλει πλήρως την έκφραση γονιδίου ειδικής για οστεοβλάστες όπως το COL1A1 και το RUNX2, υποδεικνύοντας ισχυρότερες επιδράσεις στα τελευταία και όχι στα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης. Αν και το ResV δεν αποκατέστησε πλήρως την πολλαπλασιαστική ικανότητα σε κύτταρα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με EtOH, διέσωσε εν μέρει τον πολλαπλασιασμό. Το πιο σημαντικό, η θεραπεία με ResV αποκατέστησε την ανέστειλε την οστεογονική διαφοροποίηση, που πιθανότατα περιλαμβάνει PPAR $\gamma$ . Η στόχευση του PPAR $\gamma$  με το siRNA κατέστειλε αποτελεσματικά την επαγόμενη από το αλκοόλ αδιογόνο διαφοροποίηση των BM-MSCs (47).

Σε άλλο άρθρο, διερευνήθηκε η επιγενετική γήρανση σε άτομα με Διαταραχή Χρήσης Αλκοόλ (AUD) χρησιμοποιώντας δεδομένα από τη μεγαλύτερη μελέτη του είδους της μέχρι σήμερα. Εξετάστηκαν επίσης οι βιολογικοί μηχανισμοί πίσω από την επιτάχυνση ηλικίας σε AUD. Τα ευρήματα επιβεβαίωσαν ότι η επιγενετική επιτάχυνση ηλικίας, που υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο DNAm PhenoAge του Levine, είναι υψηλότερη στην ομάδα AUD σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (HC). Ωστόσο, δεν βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της κατάστασης AUD και της επιτάχυνσης ηλικίας χρησιμοποιώντας τα επιγενετικά ρολόγια Horvath και Hannum, πιθανώς λόγω μεθοδολογικών διαφορών στην καταγραφή θέσεων CpG που σχετίζονται με την ηλικία. Οι διερευνητικές αναλύσεις έδειξαν πιο έντονη επιτάχυνση της ηλικίας σε άτομα με

σοβαρούς φαινοτύπους που σχετίζονται με το AUD, όπως αυξημένο GGT, ακόμη και μετά τον υπολογισμό των συγχυτικών παραγόντων. Αυτό υποδηλώνει ότι τα άτομα με AUD, ιδιαίτερα εκείνα με ηπατική ή/και ιστική βλάβη που υποδηλώνεται από αυξημένα ηπατικά ένζυμα, μπορεί να εμφανίσουν επιταχυνόμενη γήρανση και δυνητικά μικρότερη διάρκεια ζωής.

Για να διερευνήσουμε περαιτέρω τους γενετικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην επιγενετική γήρανση στο AUD, πραγματοποιήθηκε μια GWAS επιγενετικής επιτάχυνσης ηλικίας στο δείγμα μας. Εντοπίστηκε ένα σημαντικό SNP σε όλο το γονιδίωμα, το rs916264, που βρίσκεται σε μια ιντρονική περιοχή στο APOL2 στο χρωμόσωμα 22q12.3, το οποίο μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης mRNA του APOL2 στον εγκέφαλο.

Η μελέτη βασίζεται σε προηγούμενη έρευνα των Rosen et al., η οποία βρήκε την επιγενετική γήρανση στο AUD και τη συνέδεσε με την υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ στο αίμα και το συκώτι. Στη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν εκτενείς αναλύσεις με καλά χαρακτηρισμένους φαινοτύπους που σχετίζονται με την κατανάλωση αλκοόλ και ένζυμα ελέγχου της ηπατικής λειτουργίας, χρησιμοποιώντας το ρολόι Levine DNAm PhenoAge καθώς και τα ρολόγια Hannum και Horvath. Είναι ενδιαφέρον ότι μόνο το ρολόι του Levine εντόπισε την επιγενετική επιτάχυνση ηλικίας (EAA) στο AUD και τους σχετικούς φαινότυπους. Το ρολόι του Levine είναι γνωστό ότι διαφοροποιεί καλύτερα τον κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας μεταξύ ατόμων της ίδιας χρονολογικής ηλικίας σε σύγκριση με άλλα επιγενετικά ρολόγια.

Παρόλο που η μελέτη επικεντρώθηκε στη μεθυλίωση του πλήρους αίματος, ελέγξαμε για σχετικούς παράγοντες όπως τη σύνθεση του τύπου των κυττάρων του αίματος, τον οποίο προηγούμενες μελέτες δεν έλαβαν υπόψη. Αυτός ο έλεγχος είναι ζωτικής σημασίας καθώς η μεγάλη κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη μεταβλητότητα της μεθυλίωσης του DNA. Ένας πιθανός λόγος για την αδυναμία να αντιγραφούν τα ευρήματα των Rosen et al. χρησιμοποιώντας το ρολόι του Horvath είναι ότι τα ρολόγια πρώτης γενιάς σχεδιάστηκαν για τη συστοιχία μεθυλίωσης DNA 450k της Illumina. Η ακρίβεια των εκτιμήσεων που βασίζονται σε DNAm που χρησιμοποιούν ρολόγια πρώτης γενιάς με τη διάταξη EPIC εξακολουθεί να συζητείται.

Τα ευρήματά χρησιμοποιώντας την προσέγγιση του Levine αλλά όχι του Horvath ή του Hannum δεν προκαλούν έκπληξη, καθώς το ρολόι του Levine περιλαμβάνει θέσεις CpG

που σχετίζονται με φυσιολογική απορρύθμιση και χρόνιες ασθένειες, ενώ τα ρολόγια Horvath και Hannum προβλέπουν μόνο τη χρονολογική ηλικία.

Χρησιμοποιώντας το ρολόι Levine, διερευνήσαμε περαιτέρω πώς η σοβαρότητα του φαινοτύπου AUD, που χαρακτηρίζεται από πρότυπα κατανάλωσης αλκοόλ και κλινικούς βιοδείκτες, σχετίζεται με την επιγενετική γήρανση. Οι σοβαρές περιπτώσεις AUD εμφάνισαν μεγαλύτερη επιτάχυνση ηλικίας σε σύγκριση με λιγότερο σοβαρές περιπτώσεις, υποδεικνύοντας ότι η κλινική ετερογένεια εντός των πληθυσμών AUD θα μπορούσε να οδηγήσει σε διαφορές στη μελλοντική νοσηρότητα. Τα αποτελέσματά μας δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των βασικών και πλήρως προσαρμοσμένων μοντέλων, υποστηρίζοντας την ευρωστία των ευρημάτων μας.

Τα επιγενετικά ρολόγια έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της επιτάχυνσης της ηλικίας και σε άλλες νευροψυχιατρικές διαταραχές. Για παράδειγμα, ασθενείς με μείζονα καταθλιπτική διαταραχή και PTSD έχουν δείξει αυξημένο EAA. Μικτά αποτελέσματα έχουν αναφερθεί στη σχιζοφρένεια, με ορισμένες μελέτες να μην εντοπίζουν επιταχυνόμενη γήρανση και άλλες να αναφέρουν διαφορετικές επιπτώσεις. Το εύρημα της μελέτης μας για επιτάχυνση ηλικίας 1,38 ετών στο AUD είναι σημαντικό και συγκρίσιμο με το EAA που παρατηρείται σε άλλες ψυχιατρικές διαταραχές.

Δεδομένου ότι η μεθυλίωση του DNA επηρεάζεται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, παραμένει ασαφές εάν αυτές οι διαφορές και το EAA αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες για εθισμό ή συνέπειες μακροχρόνιας χρήσης αλκοόλ. Μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να συλλέγουν δεδομένα μεθυλίωσης σε πολλαπλά χρονικά σημεία για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της έκθεσης σε ουσίες και της επιγενετικής γήρανσης.

Η ανάλυση GWAS αναγνώρισε το SNP rs916264 στο APOL2, ένα γονίδιο που σχετίζεται με τη μεταφορά λιπιδίων και τη μεσολάβηση κυτταρικού θανάτου, με σημαντική έκφραση σε αρκετές περιοχές του εγκεφάλου. Διαφορική έκφραση του APOL2 έχει παρατηρηθεί σε διαταραχές χρήσης ουσιών και νευροψυχιατρικές καταστάσεις. Επιπλέον, βρέθηκαν ενδεικτικές συσχετίσεις με SNPs στο LINC01317 και το CWC27, που σχετίζονται με τη ρύθμιση γονιδίων και το μάτισμα πριν από το mRNA, αντίστοιχα.

Αυτή η μελέτη είναι το πρώτο GWAS επιγενετικής επιτάχυνσης ηλικίας σε πληθυσμό AUD. Προηγούμενο GWAS για την επιτάχυνση ηλικίας ενέπλεξε γονίδια που σχετίζονται με την ανάστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης και τους τόπους που

σχετίζονται με πολλαπλές γονιδιακές εκφράσεις. Η ανάλυση εμπλουτισμού γονιδιακού συνόλου εντόπισε σημαντικές γενετικές παραλλαγές που εμπλέκονται στη μακροχρόνια κατάθλιψη της παρεγκεφαλίδας, η οποία μπορεί να επηρεαστεί από τη χρόνια κατάχρηση αλκοόλ, οδηγώντας σε επιταχυνόμενη γήρανση.

Βρέθηκαν επίσης ονομαστικά σημαντικές οδούς που σχετίζονται με τις ντοπαμινεργικές συνάψεις, τη σηματοδότηση cAMP και την απορρόφηση ορυκτών, τα οποία έχουν επιπτώσεις στη γήρανση και το AUD. Ωστόσο, αυτές οι οδοί δεν έφτασαν σε στατιστική σημασία μετά από διόρθωση για πολλαπλές συγκρίσεις.

Η μελέτη αυτή, η μεγαλύτερη του είδους της, τροφοδοτήθηκε επαρκώς για να ανιχνεύσει σημαντικές διαφορές στο EAA μεταξύ AUD και HC. Μελλοντικές μελέτες με μεγαλύτερα μεγέθη δείγματος θα μπορούσαν να εντοπίσουν πρόσθετες παραλλαγές με μεγαλύτερη σημασία. Συνιστούμε επίσης την ανάκριση υψηλής απόδοσης σε μελλοντικές μελέτες της επιγενετικής γήρανσης στο AUD.

Συμπερασματικά, η έρευνα υποδεικνύει επιταχυνόμενη βιολογική γήρανση σε άτομα με AUD, ειδικά σε άτομα με πιο σοβαρούς κλινικούς φαινότυπους. Εντοπίσαμε μια συσχέτιση μεταξύ APOL2 και EAA στο AUD, υποδηλώνοντας πιθανούς ρόλους των απολιποπρωτεϊνών στη μοριακή γήρανση. Περαιτέρω διερεύνηση των κοινών μηχανισμών στους οποίους βασίζεται η AUD και η γήρανση θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέες μεθόδους ανίχνευσης και θεραπείας για νοσηρότητες που σχετίζονται με τη γήρανση (48).

Οι διαχρονικές μελέτες είναι κρίσιμοι πόροι για τη διαμόρφωση μιας ολοκληρωμένης, χρονολογικά τεκμηριωμένης κατανόησης του ρόλου των συμπεριφορών υγειονομικής περίθαλψης στην ανάπτυξη ασθενειών που σχετίζονται με τη γήρανση, όπως ο διαβήτης και οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Ωστόσο, για να είναι χρήσιμες, οι πληροφορίες που προέρχονται από αυτές τις μελέτες πρέπει να είναι σχετικές και αξιόπιστες. Σε αυτήν την επικοινωνία, συγκρίνουμε και αντιπαραβάλλουμε τη συσχέτιση τριών μη αυτοαναφερόμενων μετρήσεων της κατανάλωσης αλκοόλ με την επιγενετική γήρανση με τη συσχέτιση που παρατηρήθηκε με τη χρήση της αυτοαναφερόμενης κατανάλωσης αλκοόλ. Βρέθηκε ότι ενώ και οι τρεις μη αυτοαναφερόμενοι δείκτες υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ (EAK στα αγγλικά): CDT, MDR και ATS, συσχετίστηκαν καλά μεταξύ τους, με τρέχοντες και προηγούμενους δείκτες κύματος καπνίσματος και με το κύμα 6 που αναφέρεται από τον ίδιο τον ΑΗΚ. , κανένα από αυτά δεν συσχετίστηκε καλά

με το Wave 7 που αναφέρθηκε από την ίδια την ΑΗΚ. Αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον δεδομένου ότι μεταξύ του Κύματος 6 και του Κύματος 7, υπήρξε μια αξιοσημείωτη στροφή προς τη μειωμένη αυτοαναφερόμενη ΑΗΚ μεταξύ των ανδρών και των γυναικών, ένα μοτίβο που συνήθως λαμβάνεται ως ένδειξη «ωριμάζει». Επιπλέον, αν και οι μη αυτοαναφερόμενοι δείκτες καπνίσματος συσχετίστηκαν ισχυρά με τους μη αυτοαναφερόμενους δείκτες της ΑΗΚ, όπως ήταν αναμενόμενο, δεδομένης της γνωστής συννοσηρότητας της χρήσης τσιγάρου και της ΑΗΚ, και συσχετίστηκαν με το Κύμα 6 αυτο- ανέφερε χρήση αλκοόλ, η συσχέτισή τους με το Wave 7 που αναφέρθηκε από τον ίδιο τον ΑΗΚ μειώθηκε. Μαζί, αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν είτε ότι υπάρχουν ισχυρές παρατεταμένες επιδράσεις του Wave 6 EAC στα βασισμένα στο αίμα, μη αυτοαναφερόμενα μέτρα που συλλέχθηκαν στο κύμα 7 - ένα αποτέλεσμα βιολογικά απίθανο - είτε ότι η ταχεία μείωση της αυτοαναφερόμενης EAC μεταξύ των κυμάτων 6 και 7 αντικατοπτρίζει μια μεγαλύτερη αλλαγή στην αυτοαναφορά παρά στην πραγματική συμπεριφορά. Δηλαδή, η «γήρανση» μπορεί να είναι, εν μέρει, συνάρτηση αλλαγών στην προθυμία αναφοράς προβληματικών προτύπων χρήσης αλκοόλ.

Εξερευνήθηκε επίσης η χρησιμότητα των μη αυτοαναφερόμενων δεικτών της EAC στην πρόβλεψη της EA και των βασικών επιπέδων ανοσοκυττάρων που ενδέχεται να επηρεαστούν από την EAC. Αν και η αυτοαναφερόμενη χρήση αλκοόλ δεν είχε σχέση με τους δείκτες της EA, αντιγράφοντας προηγούμενα ευρήματα που έδειχναν μέτριες έως καθόλου επιδράσεις του αυτοαναφερόμενου καπνίσματος και κατανάλωσης αλκοόλ στην επιτάχυνση της γήρανσης και στη θνησιμότητα, βρέθηκαν συσχετίσεις μεταξύ των μη αυτοαναφερόμενων δεικτών της ΑΗΚ και EA, με όλους τους μη αυτοαναφερόμενους δείκτες της ΑΗΚ να προβλέπουν ορισμένες μετρήσεις του EA, και το ATS να υπερέχει κατά μέσο όρο των CDT και MDR. Οι περιορισμοί αυτών των ευρημάτων περιλαμβάνουν ότι αυτή η εξέταση ενός μόνο χρονικού σημείου μιας κοόρτης νεαρών ενηλίκων, αποκλειστικά μαύρων Αμερικανών. Είναι πιθανό ότι υπάρχουν αναπτυξιακές αλλαγές σε αυτήν την ομάδα που συμβαίνουν μεταξύ των ηλικιών 23 και 29 ετών που οδήγησαν σε μειωμένη εγκυρότητα της αυτοαναφερόμενης χρήσης ουσιών. Για παράδειγμα, μπορεί η μετάβαση στην ενηλικίωση να αύξησε την ανησυχία τους για το στίγμα που σχετίζεται με την ΑΗΚ. Είναι επίσης πιθανό οι δείκτες που δεν αναφέρουν τον εαυτό τους να ανταποκρίνονται σε μια ποικιλία μεταβλητών με βάση τα συμφραζόμενα, ίσως να λειτουργούν κάπως διαφορετικά σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς. Ωστόσο, τα αποτελέσματα

υπογραμμίζουν τη σημασία της ενσωμάτωσης μη αυτοαναφερόμενων δεικτών της ΑΗΚ στην εξέταση των επιπτώσεων στην υγεία από την αυξημένη χρήση αλκοόλ.

Δεδομένων των διαφορών στον τρόπο με τον οποίο προέκυψε καθεμία από αυτές τις μετρήσεις κατανάλωσης αλκοόλ, ήταν αναμενόμενες κάποιες διαφορές στις προγνωστικές τους ικανότητες. Πρώτον, είναι σημαντικό να θυμόμαστε ότι το CDT και οι δύο μετρικές μεθυλίωσης ακολουθούν διαφορετικές βιολογικές οδούς. Οι αλλαγές στα επίπεδα CDT ορού αντικατοπτρίζουν αλλαγές στη δραστηριότητα της σιαλυλτρανσφεράσης στο ήπαρ. Αντίθετα, τόσο το MDR όσο και το ATS μετρούν τη μεθυλίωση του DNA των κυττάρων από το αιμοποιητικό σύστημα. Δεύτερον, και οι δύο μετρήσεις με υποθετικά παράθυρα ανίχνευσης, το CDT και το ATS, έχουν διαφορετικούς χρόνους ημιζωής. Το CDT αναμένεται να καταγράψει την κατανάλωση αλκοόλ τις προηγούμενες τρεις εβδομάδες. Αντίθετα, ο χρόνος ημιζωής του ATS φαίνεται να είναι τουλάχιστον αρκετοί μήνες. Τέλος, η MDR μπορεί καλύτερα να θεωρηθεί ως ένας συνεχής δείκτης κατανάλωσης αλκοόλ στον γενικό πληθυσμό και όχι ως δείκτης προβληματικής χρήσης, καθώς αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας τη μέση εβδομαδιαία κατανάλωση αλκοόλ από άτομα της Σκωτίας «που ανέφεραν ότι η πρόσληψή τους ήταν αντιπροσωπευτική ενός φυσιολογικού εβδομάδα». Αντίθετα, τόσο το CDT όσο και το ATS αναπτύχθηκαν για την ανίχνευση ατόμων με διαταραχές χρήσης αλκοόλ. Το CDT αναπτύχθηκε αρχικά κατά τη διάρκεια του περασμένου αιώνα χρησιμοποιώντας δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού από βαρείς πότες που επηρεάστηκαν από παραλήρημα τρέμενς. Το ATS αναπτύχθηκε πολύ πρόσφατα χρησιμοποιώντας ένα παράδειγμα περίπτωσης και ελέγχου που αντιπαραβάλλει τη μεθυλίωση των απεχόντων ατόμων με αυτή των ατόμων που νοσηλεύτηκαν για δηλητηρίαση από αλκοόλ στο πλαίσιο τουλάχιστον 8 εβδομάδων κατανάλωσης τουλάχιστον 8 ποτών την ημέρα. Ως συνέπεια όλων αυτών των διαφορών, δεν προκαλεί έκπληξη το ότι οι συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών που δεν αναφέρουν τον εαυτό τους είναι σχετικά μέτριες (0,36 έως 0,41) και ότι έδειξαν κάπως διαφορετικές κατανομές και συσχέτιση με δείκτες EA και τύπων αιμοσφαιρίων. Αντίθετα, η συσχέτιση της αυτοαναφερόμενης ΑΗΚ με τον αριθμό EA και λευκών αιμοσφαιρίων είναι εξαιρετικά μέτρια και αρκετά διαφορετική από αυτή που παρατηρείται για τους μη αυτοαναφερόμενους δείκτες της ΑΗΚ.

Το ATS έχει αξιοσημείωτα ισχυρότερες συσχετίσεις με EA και τύπους κυττάρων αίματος από άλλους μη αυτοαναφερόμενους δείκτες της EAC. Επειδή το ATS συσχετίζεται



καλύτερα με τους δείκτες EA και μπορεί να υπολογιστεί από το ολικό αίμα ή το DNA του σάλιου, μπορεί να είναι καλύτερο εργαλείο, σε πολλές περιπτώσεις, από το CDT για όσους αναζητούν τον εντοπισμό προγνωστικών δεικτών EA. Ωστόσο, επειδή οι αξιολογήσεις μεθυλίωσης βάσει συστοιχιών στους τέσσερις τύπους που χρησιμοποιούνται στο ATS έχουν χαμηλή ακρίβεια, θα ήταν απαραίτητο να διεξαχθούν αξιολογήσεις MSdPCR χωρίς αναφορά, όπως κάναμε στην τρέχουσα έρευνα για να χρησιμοποιήσουμε το ATS. Δηλαδή, ο υπολογισμός του ATS από αξιολογήσεις που βασίζονται σε πίνακα δεν θα αποφέρει την ίδια τιμή με την αξιολόγηση MSdPCR χωρίς αναφορά και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο. Το MDR έχει το πλεονέκτημα τόσο έναντι του ATS όσο και του CDT ότι μπορεί να προκύψει από υπάρχοντα σύνολα δεδομένων που βασίζονται σε πίνακες χωρίς καμία πρόσθετη αξιολόγηση.

Παρά το γεγονός ότι οι μετρήσεις χρησιμοποιούσαν το ίδιο βιολογικό υλικό, το ATS προβλέπει την EA πολύ καλύτερα από το MDR (δηλαδή, πάνω από τέσσερις φορές μεγαλύτερη διακύμανση). Αυτό φαίνεται να αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι το ATS σχεδιάστηκε για να προβλέπει ένα επιζήμιο επίπεδο κατανάλωσης αλκοόλ (δηλαδή, HAC), ενώ το MDR σχεδιάστηκε για να προβλέπει την εβδομαδιαία κατανάλωση αλκοόλ. Δεδομένου ότι το POAM και το GrimAge σχεδιάστηκαν για να προβλέψουν τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα, φαίνεται λογικό ότι το ATS θα πρόβλεψε καλύτερα την EA. Το κατά πόσον αυτό επεκτείνεται στην πρόβλεψη χαμηλότερων επιπέδων ημερήσιας κατανάλωσης σε άτομα που δεν καταναλώνουν υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, παραμένει να δοκιμαστεί και σημειώνουμε ότι μόνο το MethDectectR έχει βαθμονομηθεί για να ολοκληρώσει αυτήν την εργασία.

Παρόλο που χρησιμοποιούμε τακτικά το ATS τόσο για ακαδημαϊκούς όσο και για εμπορικούς σκοπούς και πιστεύουμε ότι κατανοούμε καλά τις κλινικές προγνωστικές του ιδιότητες, δεν περιμέναμε την ισχυρή σχέση του ATS και την πιο μέτρια συσχέτιση του CDT και του MDR και με τα δύο CDT T4 και B λεμφοκύτταρα. Σε μια προηγούμενη ανάλυση χρησιμοποιώντας αυτά τα δεδομένα, αποδείχθηκε ότι οι μετρήσεις κυττάρων δεν επηρεάζουν σημαντικά τη συσχέτιση μεταξύ των δεικτών EA ή την ικανότητα του ATS και του cg05575921 να προβλέπουν την κοινή διακύμανση αυτών των δεικτών. Ωστόσο, καθώς η EAC έχει γνωστές επιδράσεις στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, πραγματοποιήθηκαν οι διερευνητικές αναλύσεις που περιγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα 5. Τα αυξανόμενα επίπεδα κατανάλωσης αλκοόλ συσχετίστηκαν ισχυρά αρνητικά

με τα επίπεδα των CDT4 και B λεμφοκυττάρων. Αυτά τα ευρήματα συμφωνούν καλά με την προηγούμενη κατανόησή μας για την κατανάλωση αλκοόλ στη λειτουργία του ανοσοποιητικού. Αντίθετα, είναι δύσκολο να συμβιβαστούν οι θετικές συσχετίσεις των CDT και MDR με κύτταρα φυσικών φονέων (NK) ή η θετική συσχέτιση της αυτοαναφερόμενης χρήσης αλκοόλ με το CDT4. Οι περισσότερες μελέτες κατανάλωσης αλκοόλ δείχνουν ότι οι αυξανόμενες ποσότητες κατανάλωσης αλκοόλ σχετίζονται με τη μείωση των επιπέδων των NK κυττάρων. Ωστόσο, σημειώνουμε ότι οι συσχετίσεις των CDT4 και MDR με τον αριθμό των κυττάρων NK είναι μέτριες. Ωστόσο, εάν κάποια από αυτές τις μετρήσεις προβλέπει μελλοντική ασθένεια που σχετίζεται με μειωμένη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως η χρόνια βρογχίτιδα, σε αυτόν τον πληθυσμό, είναι άγνωστο και η κατανάλωση αλκοόλ έχει τόσο προ- και αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα των οποίων ο ακριβής αντίκτυπος είναι ασθένεια και δόση εξαρτώμενο. Ωστόσο, πιστεύουμε ότι αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν τη μελλοντική χρήση του ATS και αυτά τα μέτρα μέτρησης κυττάρων για την ανάπτυξη μιας πιο αναλυτικής κατανόησης της σχέσης της κατανάλωσης αλκοόλ με τις ασθένειες που σχετίζονται με φλεγμονές σε διαμήκους πληθυσμούς με βιοτράπεζες DNA.

Ιδιαίτερα αξιοσημείωτη είναι η κακή προγνωστική αξία της αυτοαναφερόμενης κατανάλωσης αλκοόλ στο Wave 7 όταν οι συμμετέχοντες ήταν 29 ετών. Λόγω της δουλειάς μας και των άλλων που αποδεικνύουν τη συχνά φτωχή αξιοπιστία του αυτοαναφερόμενου καπνίσματος σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου και υποεξυπηρετούμενους πληθυσμούς, καθώς και σε πληθυσμούς λευκού, μη υψηλού κινδύνου, και το γενικά αποδεκτό στίγμα κατά του ένας χρόνιος χρήστης αλκοόλ, δεν μας εκπλήσσει υπερβολικά. Είναι πολύ πιθανό, καθώς οι νέοι ενήλικες αναλαμβάνουν μεγαλύτερη ευθύνη, ανταποκρίνονται περισσότερο στο στίγμα που σχετίζεται με το αλκοόλ, ίσως μειώνοντας κάπως την ΑΗΚ, αλλά ίσως μειώνοντας περισσότερο την αυτοαναφορά τους. Ανεξάρτητα από τους διάφορους λόγους υποαναφοράς που μπορεί να προκύψουν σε διαφορετικές ομάδες, αυτά τα αποτελέσματα δίνουν περαιτέρω έμφαση στην ανάγκη ενσωμάτωσης βιοδεικτών του καπνίσματος και του ποτού σε όλες τις μελέτες επιταχυνόμενης γήρανσης και ασθενειών γήρανσης, όταν είναι δυνατόν. Επιπλέον, πιστεύουμε ότι οι ισχυρές σχέσεις του ATS και του cg05575921 —που εμφανίζονται τώρα σε τρεις πληθυσμούς— μπορεί να υποδηλώνουν την ανάγκη επανεξέτασης προηγούμενων ευρημάτων που υποδηλώνουν χαμηλή συσχέτιση μεταξύ της χρήσης καπνού και της κατανάλωσης αλκοόλ.

Ταυτόχρονα, τα τρέχοντα αποτελέσματα υποδηλώνουν μια ευκαιρία που παρέχεται από τη χρήση της μη αυτοαναφοράς ζάρια της ΑΗΚ για τον εντοπισμό υποκειμένων που είναι πιθανό να παρέχουν αναξιόπιστη αυτοαναφορά ή που πρόσφατα άλλαξαν από την παροχή πιο ακριβών σε λιγότερο ακριβείς πληροφορίες αυτοαναφοράς για την ΑΗΚ τους. Η χρήση αυτής της ευκαιρίας για τον καλύτερο χαρακτηρισμό τέτοιων ατόμων και την καλύτερη κατανόηση των πιθανών πιέσεων που οδηγούν σε σημαντική υποαναφορά θα μπορούσε να οδηγήσει σε ευκαιρίες για ουσιαστικές βελτιώσεις τόσο στην έρευνα όσο και στην κλινική φροντίδα. Σε κάποιο βαθμό, ό,τι και να κάνουμε, το κοινωνικό στίγμα ενάντια στον υπερβολικό αλκοολισμό και άλλες παρόμοιες συμπεριφορές θα συνεχίσει να υφίσταται και δεν είμαστε υπέρ των πολιτικών που οδηγούν σε ανεπιθύμητες εισβολές στην ιδιωτική ζωή. Ωστόσο, ορίζοντας καλύτερα τα χαρακτηριστικά εκείνων που ενδέχεται να παρέχουν αναξιόπιστη αυτοαναφορά, μπορεί να είμαστε σε θέση να διατυπώσουμε αποτελεσματικές προσαρμογές στις προσεγγίσεις μας για τη συλλογή των απαραίτητων πληροφοριών από αυτά τα άτομα τόσο για ερευνητικούς όσο και για κλινικούς σκοπούς, δημιουργώντας έτσι ένα κοινωνικό όφελος. Επιπλέον, μέσω προσεκτικών αναλύσεων αυτών και άλλων συνόλων δεδομένων, μπορεί να είναι δυνατό να εντοπιστεί το εύρος της σχετικής αναξιόπιστης αυτοαναφοράς και να μετριαστούν οι επιπτώσεις της σε αναλύσεις παρόμοιων αποτελεσμάτων που σχετίζονται με την υγεία (49).

## **7.2 Παράγοντας ZNF281 και γήρανση κυττάρων**

Μία πρόσφατη μελέτη διερευνά τη συμμετοχή του ZNF281 στον επαγόμενο από αιθανόλη γήρανση των ηπατοκυττάρων, αποκαλύπτοντας πιθανούς υποκείμενους μηχανισμούς. Χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές όπως PCR πραγματικού χρόνου, κηλίδωση Western, χρώση ανοσοφθορισμού και συνδεδεμένες με ένζυμα ανοσοπροσροφητικές δοκιμασίες. Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του ZNF281 αυξήθηκε στα συκώτια ποντικών που τρέφονταν με αλκοόλη και σε ηπατοκύτταρα που είχαν υποστεί αγωγή με αιθανόλη. Η σίγαση του ZNF281 στα ηπατοκύτταρα μείωσε την προκαλούμενη από αιθανόλη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων και την απελευθέρωση ηπατικών ενζύμων (AST, ALT και LDH). Επιπλέον, το ZNF281 siRNA μείωσε τον αριθμό των γηρασμένων κυττάρων, εξάλειψε τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1 και μείωσε την έκκριση

προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1β και IL-6). Σε μοριακό επίπεδο, η απουσία του ZNF281 άλλαξε την έκφραση αρκετών πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη γήρανση και διευκόλυνε την ανάκτηση από την επαγόμενη από αιθανόλη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και την παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Αυτό συνδέθηκε με την αποκατάσταση της μιτοφαγίας που προκαλείται από σηματοδότηση HK2-PINK1/Parkin. Μηχανιστικά, το ZNF281 βρέθηκε να συνδέεται με ένα συγκεκριμένο μοτίβο εντός της περιοχής προαγωγέα HK2 και να καταστέλλει την έκφρασή του. Τα αποτελέσματα έδειξαν αναλυτικά πως η έκφραση του ZNF281 αυξάνεται προοδευτικά στους ιστούς του ήπατος ποντικού κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ηπατικής νόσου. Μελέτες *in vitro* με ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (HL-7702) έδειξαν ότι η έκφραση του ZNF281 ενισχύεται με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση και τον χρόνο υπό διέγερση με αιθανόλη.

Η σίγαση του ZNF281 με siRNA σε ηπατοκύτταρα μείωσε την ηπατοτοξικότητα που προκλήθηκε από αιθανόλη, όπως αποδεικνύεται από τη βελτιωμένη βιωσιμότητα των κυττάρων και τις μειωμένες ενζυμικές δραστηριότητες (AST, ALT, LDH) στο υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων που έχουν υποστεί αγωγή με αιθανόλη.

Η ανεπάρκεια ZNF281 μείωσε τον αριθμό των γηρασμένων κυττάρων υπό έκθεση σε αιθανόλη, όπως φαίνεται από τη μειωμένη χρώση β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal) που σχετίζεται με τη γήρανση και την απελευθέρωση από τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου G0/G1.

Το ZNF281 siRNA μείωσε επίσης τα επίπεδα δεικτών εκκριτικού φαινοτύπου που σχετίζονται με τη γήρανση (SASP) και προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1β, IL-6). Επιπλέον, η ανεπάρκεια ZNF281 μετρίασε τις λιπομεταβολικές διαταραχές στα ηπατοκύτταρα που προκαλούνται από αιθανόλη.

**Μοριακοί Μηχανισμοί:** Το knockdown ZNF281 ρύθμιζε αρνητικά την έκφραση αρκετών πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη γήρανση (p53, p21, p16, HMGA1, γH2A.X) και παραγόντων που σχετίζονται με την τελομεράση (TERT, TRF1, TRF2). Η ανεπάρκεια ZNF281 προώθησε την ανάκαμψη από την επαγόμενη από αιθανόλη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και την παραγωγή ROS, που συνδέεται με την αποκατάσταση της μιτοφαγίας που προκαλείται από τη σηματοδότηση HK2-PINK1/Parkin. Μηχανιστικά, το ZNF281 αποδείχθηκε ότι συνδέεται με ένα συγκεκριμένο μοτίβο εντός της περιοχής

προαγωγέα HK2 και καταστέλλει την έκφρασή του, αποσταθεροποιώντας τη μιτοφαγία που προκαλείται από HK2 και προάγοντας τη γήρανση.

Η μελέτη καταλήγει στο συμπέρασμα ότι το ZNF281 παίζει κρίσιμο ρόλο στην αλκοολική ηπατική νόσο προάγοντας τη γήρανση των ηπατοκυττάρων μέσω της καταστολής της μιτοφαγίας που προκαλείται από HK2. Η στόχευση του ZNF281 θα μπορούσε να είναι μια πιθανή θεραπευτική στρατηγική για την αλκοολική ηπατική νόσο (50).

## **Κεφάλαιο 8: Πειραματικό μέρος**

### **8.1 Δειγματοληψία**

Για το πειραματικό κομμάτι χρησιμοποιήθηκαν σωληνάρια με ολικό αίμα σε αντιπηκτικό EDTA. Τα δείγματα προήλθαν μερικά από υγιή άτομα και λειτούργησαν ως control για τις πειραματικές διαδικασίες, προκειμένου να διασφαλιστεί η ποιότητα των αποτελεσμάτων και τα υπόλοιπα δείγματα προήλθαν από ασθενείς με αλκοολική ηπατική νόσο και χρόνιους καταναλωτές αλκοολούχων ποτών. Όλα τα δείγματα μας τα παρείχε το γενικό νοσοκομείο 'Ιπποκράτειο'. Η κωδικοποίηση και η επεξεργασία όλων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε όσο το δυνατόν πιο άμεσα σε διάστημα μερικών ωρών από την αιμοληψία, κατά κανόνα δύο ωρών. Καθ'όλη τη διάρκεια της ερευνητικής εργασίας τηρήθηκαν κατά γράμμα τα επιστημονικά πρωτόκολλα ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα σφάλματος.

### **8.2 Υλικά και εξοπλισμός**

- Φυγόκεντρος
- Φωτόμετρο
- Κυτταρόμετρο ροής
- Vortex
- Ηλεκτρονική ζυγαριά
- Κλίβανος
- Kit G6PD
- Κωνικές φυάλες
- Σωληνάρια
- Eppendorf
- Πιπέττες των 2-20 μl, 20-200 μl, 100-1000 μl
- Πουάρ

- Κυψελίδες
- Αποσταγμένο νερό
- Water for injection
- PBS 310 mosm διάλυμα
- PBS-glucose
- Φαινυλδραζίνη 17 mM
- BHP διάλυμα
- Διαμίδη
- DCFDA
- Buffer annexin BSA 3%
- Annexin PE
- CD235-FITC
- Buffer Ca<sup>+2</sup> BSA 0.1%
- Fluo4-AM
- IgG FITC
- CD235-APCS

### **8.3 Μεθοδολογία**

#### Πρωτόκολλο ελεύθερων δραστικών ριζών ROS

- Τοποθέτηση ενδεικτικά 500 μl ολικού αίματος σε erpendorf και φυγοκέντρηση στη ρύθμιση 3000 rpm για 10 λεπτά.
- Μετά τη φυγοκέντρηση αφαίρεση του υπερκειμένου και του buffy coat. Στη συνέχεια γίνεται τοποθέτηση τυχαίας ποσότητας PBS στο erpendorf για πλύση των ερυθροκυττάρων.

- Φυγοκέντρηση του αίματος στα 3000 rpm για 10 λεπτά και αφαίρεση του υπερκλειμένου.
- Προσθήκη σε erpendorf ίσης ποσότητας PBS και πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων με τη χρήση πιπέτας. Έτσι ο αιματοκρίτης μετατρέπεται σε Hct 40% ή με άλλα λόγια 100 μl δείγματος 40% και 900 μl PBS.
- Τοποθέτηση σε ένα erpendorf για το δείγμα 2.5 μl αραιωμένου αίματος Hct 40%, 1.25 μl DCFDA και 125 μl διαλύματος PBS-glucose-BSA 0.1%.
- Σε άλλο erpendorf γίνεται τοποθέτηση ως τυφλό 2.5 μl αραιωμένου αίματος Hct 40% 125 μl διαλύματος PBS-glucose- BSA 0.1%.
- Επώαση των erpendorfs για μία ώρα στον κλίβανο με ανακίνηση.
- Μετά την επώαση γίνεται προσθήκη 25 μl δείγματος σε ένα σωληνάριο που έχει τοποθετηθεί προηγουμένως 475 μl διαλύματος PBS-glucose-BSA 0.1%.
- Μέτρηση φθορισμού μέσω κυτταρομετρίας ροής.

#### Πρωτόκολλο μέτρησης ενδοκυττάρων μορίων ασβεστίου

- Τοποθέτηση σε ένα erpendorf για το τυφλό δείγμα 10 μl αίματος Hct 4% που έχει παρασκευαστεί προηγουμένως από τα ROS, 490 μl buffer CA<sup>+2</sup>-BSA 0.1%.
- Τοποθέτηση σε ένα erpendorf για το δείγμα 10 μl αίματος Hct 4%, 0.5 μl fluo-AM, 490 μl buffer CA<sup>+2</sup>-BSA 0.1%.
- Επώαση των erpendorfs για 50 λεπτά στον κλίβανο με ανακίνηση.
- Μετά την επώαση γίνεται προσθήκη 25 μl δείγματος σε ένα σωληνάριο που έχει τοποθετηθεί προηγουμένως 475 μl buffer CA<sup>+2</sup>-BSA 0.1%.
- Μέτρηση φθορισμού μέσω κυτταρομετρίας ροής.

#### Πρωτόκολλο πρόσδεσης IgG

- Αραίωση ολικού αίματος σε διάλυμα PBS 1:10 μέσα σε erpendorf με ποσότητες 10 μl και 90 μl.



- Τοποθέτηση σε ένα σωληνάριο για το δείγμα 7 μl PBS, 8 μl αντι- IgG (FITC), 1.5 μl αραιωμένου αίματος 1:10, 1.5 μl αραιωμένα CD235-APC (1:200 σε PBS όπου έχουμε 99.5 μl PBS και 0.5 μl CD235 σε eppendorf).
- Τοποθέτηση των σωληναρίων σε στατώ καλυμμένα με αλουμινόχαρτο σε συρτάρι για επώαση 40 λεπτά. Μετά την επώαση γίνεται προσθήκη 225 μl PBS.
- Πριν την τοποθέτηση των σωληναρίων στο κυτταρόμετρο γίνεται ανακίνηση στα στατώ για την αποφυγή συσσωμάτων.
- Μέτρηση φθορισμού μέσω κυτταρομετρίας ροής.

#### Πρωτόκολλο ενεργότητας G6PD

Η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) αποτελεί βασικό ένζυμο του καταβολισμού της γλυκόζης, προωθώντας την παραγωγή αναγωγικής δύναμης με τη μορφή NADPH. Για την ανάλυση της ενεργότητάς της χρησιμοποιήθηκε κιτ προσδιορισμού του οποίου οι οδηγίες ακολουθήθηκαν όπως αναλύεται:

- Ανάμιξη ολικού αίματος με working buffer (R1+R2) του κιτ και επώαση για 10 λεπτά στους 37°C.
- Προσθήκη διαλύματος R3, ανάδευση, και επώαση για 2 λεπτά στους 37°C.
- Φωτομέτρηση στα 340nm σε t=0 και t=5min.

#### Πρωτόκολλο εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης

Για τη μέτρηση της εξωτερικευμένης φωσφατιδυλοσερίνης, ανιχνεύθηκαν με κυτταρομετρία ροής διπλά θετικοί πληθυσμοί όσον αφορά τους δείκτες CD235 και φωσφατιδυλοσερίνης.

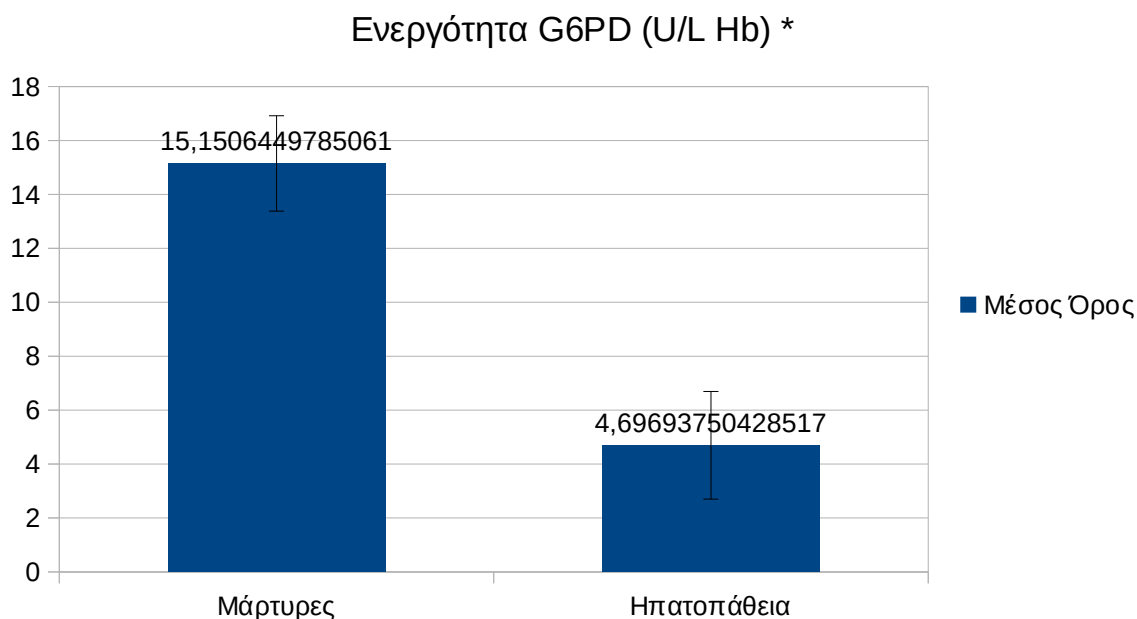
- Αραίωση ερυθροκυττάρων 1:10 με ισότονο PBS.
- Προσθήκη του αραιωμένου δείγματος σε διάλυμα ανεξίνης (NaCl 140mM – CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM –Hepes/NaOH 10mM) με BSA 3% και προσθήκη FITC (ισοθειοκυανική φλοθορεσκεΐνη)-σημασμένου αντισώματος έναντι του μορίου CD235 (γλυκοφορίνη A - χαρακτηριστική ερυθροκυτταρική πρωτεΐνη) και αννεξίνης V σημασμένης με φυκοερυθρίνη (PE) με σκοπό τη δέσμευση των PS+-ερυθροκυττάρων.

- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά στο σκοτάδι
- Αραίωση σε διάλυμα ανεξίνης-BSA και μέτρηση φθορισμού μέσω κυτταρομετρίας ροής.

## 8.4 Αποτελέσματα

### Ενεργότητα G6PD

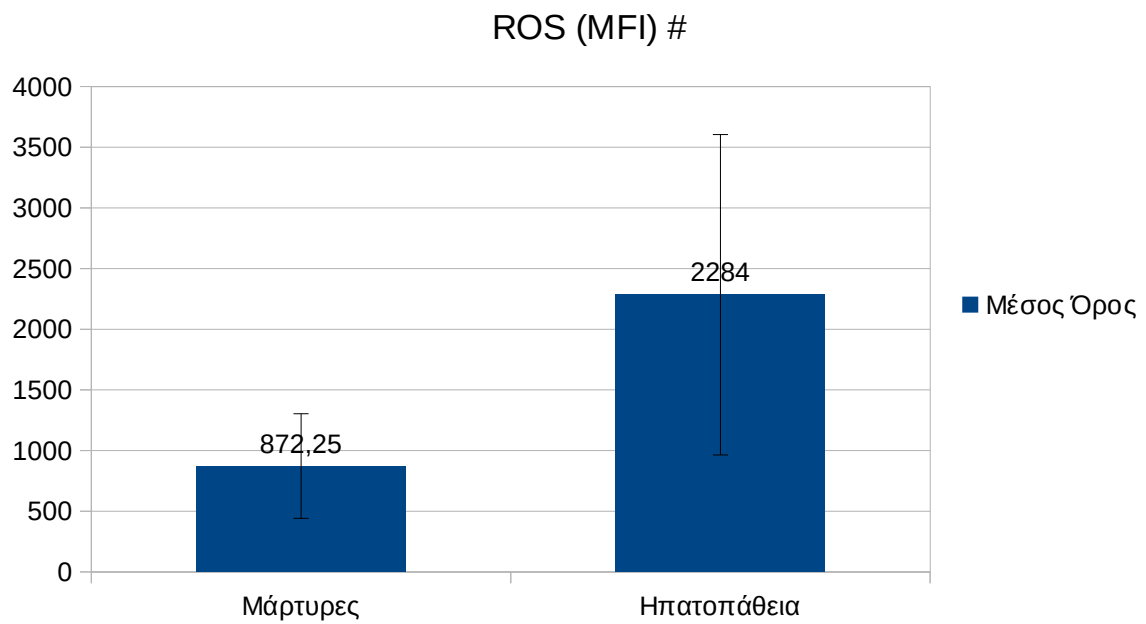
Στην εξέταση για την ενεργότητα της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης παρατηρήθηκε πως ο μέσος όρος στα control, δηλαδή στους μάρτυρες ήταν σημαντικά αυξημένος σε σχέση με τον μέσο όρο των ατόμων με αλκοολική ηπατική νόσο. Επομένως η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ οδήγησε σε μειωμένη ενεργότητα της G6PD. Η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) καταλύει την οξείδωση της 6-φωσφορικής γλυκόζης με ταυτόχρονη παραγωγή NADPH. Κατά τη διάρκεια οξειδωτικού στρες, δηλαδή όταν το κύτταρο περιέχει μεγάλη ποσότητα οξειδωτικών ουσιών (πχ υπεροξειδίου του υδρογόνου) απαιτείται δράση του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) για την απενεργοποίηση των οξειδωτικών. Προκειμένου να δράσει το ένζυμο GPX απαιτείται απόθεμα ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και NADPH. Προκειμένου να συμβεί αυτό προϋπόθεση είναι η επαρκής λειτουργία του ενζύμου G6PD. Στα ερυθροκύτταρα το παραπάνω μεταβολικό μονοπάτι αποτελεί τη μοναδική πηγή NADPH, το οποίο είναι απαραίτητο για την προστασία του κυττάρου και της αιμοσφαιρίνης που αυτό περιέχει από την οξείδωση που αυτό μπορεί να υποστεί κατά τη μεταφορά του οξυγόνου. Πολλά ένζυμα αλλά και η αιμοσφαιρίνη είναι αρκετά ευάλωτες στην οξείδωση που δύναται να προκληθεί από τους οξειδωτικούς παράγοντες. Η γλουταθειόνη η οποία συντίθεται ενεργά και βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα ερυθροκύτταρα με την ανηγμένη της μορφή (GSH) και συμβάλει στην προστασία έναντι της οξείδωσης.



Διάγραμμα 1: Ενεργότητα G6PD μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών με ηπατοπάθεια. (Το σύμβολο \* αντιστοιχεί σε  $p < 0.05$  και δηλώνει στατιστική σημασία)

#### Ενδοκυττάριας ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS)

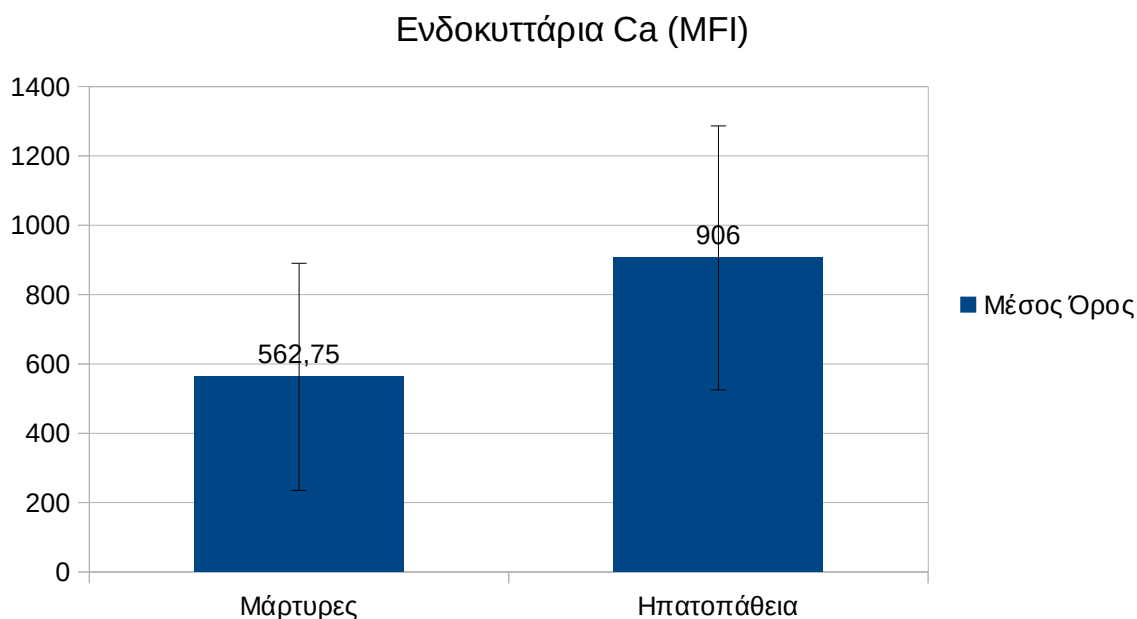
Ύστερα από μελέτη των δειγμάτων παρατηρήθηκε αυξημένος μέσος όρος ποσότητας δραστικών ριζών οξυγόνου σε άτομα με ηπατική νόσο σε σχέση με τα υγιή άτομα. Όπως αναμέναμε τα ερυθροκύτταρα μετά την υπερβολική κατανάλωση αλκοόλης είχαν τεθεί υπό συνθήκες υψηλού οξειδωτικού στρες με αποτέλεσμα την αυξημένη παρουσία ROS λόγω υπερενεργοποίησης των μεταβολικών οδών και την έντονης παρουσίας της αιθανόλης στα κύτταρα.



Διάγραμμα 2: Ενδοκυττάριας δραστικές ρίζες οξυγόνου μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατική νόσο (Το σύμβολο # αντιστοιχεί σε  $0.05 < p < 0.1$  και δηλώνει στατιστική τάση)

#### Ενδοκυττάρια μόρια ασβεστίου(Ca)

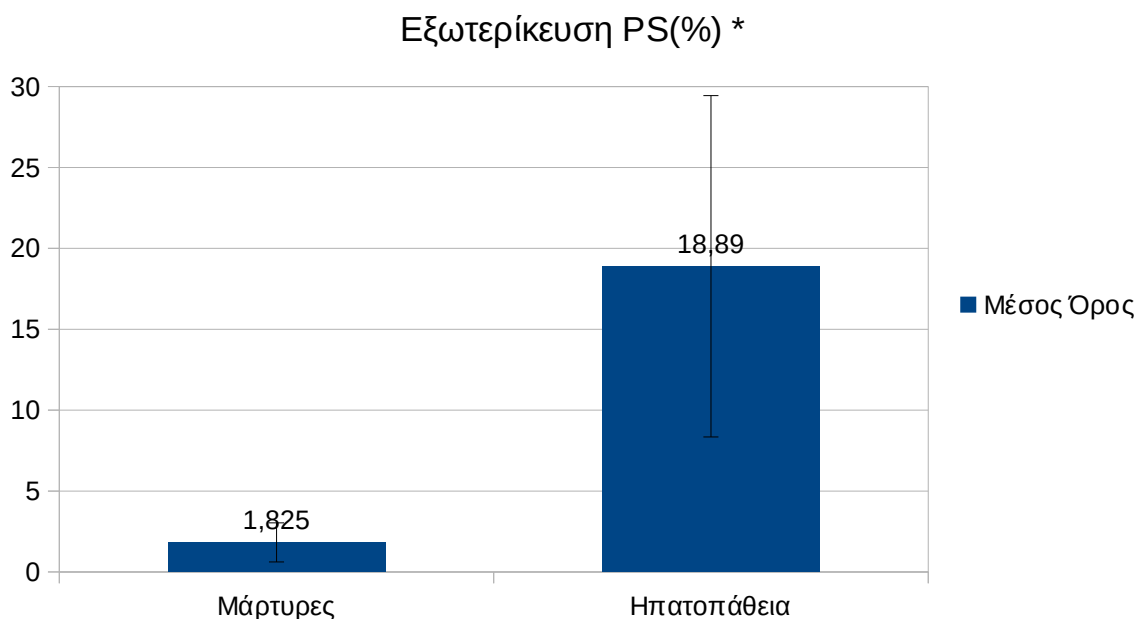
Στην παρούσα εξέταση παρατηρήθηκε ορισμένη αύξηση των ενδοκυττάρων μορίων ασβεστίου σε άτομα με αλκοολική ηπατική νόσο σε σχέση με τα υγιή, ωστόσο αυτή η μελέτη δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως στατιστικής σημασίας ή τάσης.



Διάγραμμα 3: Μέτρηση ενδοκυττάριων μορίων ασβεστίου σε μάρτυρες και ασθενείς με ηπατοπάθεια

#### Εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης(PS)

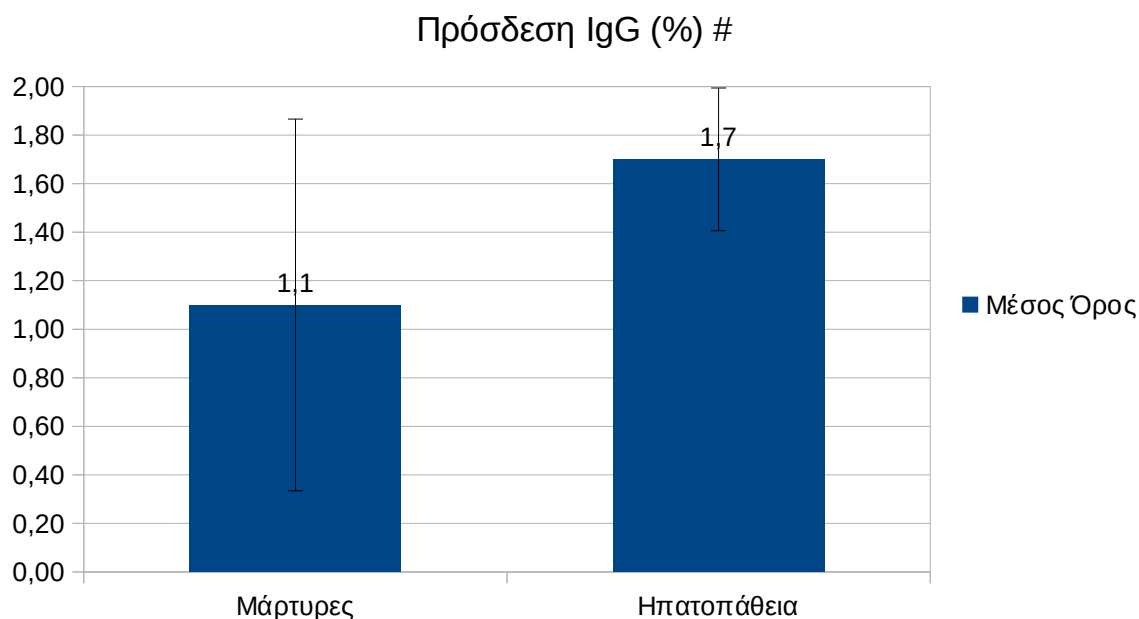
Η φωσφατιδυλοσερίνη είναι ένα από τα φωσφολιπίδια που υπάρχουν στις κυτταρικές μεμβράνες, ειδικά στον εγκέφαλο και το νευρικό σύστημα. Η περιεκτικότητα σε φωσφατιδυλοσερίνη μειώνεται με τη γήρανση και η σχετιζόμενη με την ηλικία μείωση της φωσφατιδυλοσερίνης είναι γνωστό ότι συμβάλλει στη γνωστική εξασθένηση και στη μειωμένη αντίσταση στο οξειδωτικό στρες. Η αυξημένη εξωτερίκευση της όπως είδαμε στην μελέτη μας που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με αλκοολική ηπατική νόσο μας δείχνει την κατάσταση των κυττάρων τα οποία είναι επιρρεπής σε πρόωρη γήρανση και σε έντονη οξειδωτική δραστηριότητα λόγω στρες.



Διάγραμμα 4: Εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης μεταξύ control και ασθενών. (Το σύμβολο \* αντιστοιχεί σε  $p < 0.05$  και δηλώνει στατιστική σημασία)

### Πρόσδεση IgG

Τα συμπεράσματα της μελέτης μας έδειξαν αυξημένο μέσο όρο προσδεδεμένων IgGs στα άτομα με ηπατοπάθεια σε σχέση με τα control. Αυτό μας δείχνει πως τα άτομα με ηπατοπάθεια έχουν τάση για αυξημένη γήρανση καθώς η πρόσδεση IgG αποτελεί μέρος του οψωνισμού του κυττάρου που οδηγείται στη συνέχεια σε καταστροφή.



Διάγραμμα 5: Πρόσδεση IgG σε υγιή άτομα και σε άτομα με ηπατοπάθεια. (Το σύμβολο # αντιστοιχεί σε  $0.05 < p < 0.1$  και δηλώνει στατιστική τάση)

## 8.5 Συζήτηση

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στο ρόλο του οξειδωτικού στρες και της κυτταρικής γήρανσης στα ερυθροκύτταρα, που είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την κατανόηση της παθογένειας των ηπατικών νόσων και την αξιολόγηση των θεραπειών. Αρχικά γίνεται αναφορά στο ήπαρ και στη σημασία του για τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς και στη δυσλειτουργία του ήπατος λόγω διαφόρων αιτιών όπως ηπατικές νόσοι, ιογενείς λοιμώξεις και η επίδραση της κατανάλωσης αλκοόλ (1,9,12,13). Περιγράφονται επίσης οι μηχανισμοί με τους οποίους το ήπαρ παράγει δραστικές μορφές οξειδωτικού στρες και το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες (23). Επιπρόσθετα εξετάζεται η σχέση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με ηπατικές νόσους, όπως η αλκοολική ηπατική νόσος στην οποία παρατηρείται αλλαγή της μορφολογίας των ερυθρών. Περιγράφονται οι λειτουργίες των ερυθροκυττάρων και οι μεταβολές τους υπό την επίδραση του οξειδωτικού στρες και της αιθανόλης (15,16,18). Αναλύεται η παθοφυσιολογία του οξειδωτικού στρες, οι επιπτώσεις του στο ήπαρ και η σχέση του με τις ηπατικές νόσους. Επίσης, γίνεται αναφορά στους βιοδείκτες οξειδωτικού στρες. Περιγράφονται οι βιοδείκτες γήρανσης των ερυθροκυττάρων και εξετάζεται αναλυτικά η άμεση σχέση τους με την ηπατική νόσο και το

οξειδωτικό στρες (33). Περιλαμβάνεται η μεθοδολογία της έρευνας, με αναφορές στη δειγματοληψία, τον εξοπλισμό, και τη μελέτη δεικτών οξειδωτικού στρες και γήρανσης σε ερυθροκύτταρα ασθενών με ηπατική νόσο. Χρησιμοποιούνται τεχνικές όπως κυτταρομετρία ροής για την ανάλυση των δεδομένων. Στο πειραματικό κομμάτι περιγράφονται ευρήματα που επιβεβαιώνουν τη σύνδεση του οξειδωτικού στρες και της γήρανσης των ερυθροκυττάρων με την υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλης και της ύπαρξης αλκοολικής ηπατικής νόσου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι ασθενείς έχουν αυξημένες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες είναι παρούσες σε έντονες καταστάσεις οξειδωτικού στρες όπου το κύτταρο προσπαθεί μέσω συγκεκριμένων μηχανισμών και μεταβολικών οδών να επαναφέρει ισορροπία στο δυναμικό του. Βρέθηκε επίσης στους ασθενείς πολύ χαμηλή ενεργότητα G6PD το οποίο είναι ένα πολύ σημαντικό ένζυμο που έχει ενεργό ρόλο στη διατήρηση αντιοξειδωτικού δυναμικού στο κύτταρο, γεγονός που μπορεί να αιτιολογήσει την τάση για επιρρέπεια στη συσσώρευση οξειδωτικού φορτίου. Όσον αφορά σε δείκτες γήρανσης και θανάτου, παρατηρούμε στους ασθενείς με ηπατοπάθεια πολύ υψηλότερη εξωτερική φωσφατιδυλοσερίνη, η οποία είναι δείκτης απομάκρυνσης του κυττάρου από την κυκλοφορία του αίματος και ταυτόχρονη τάση για πρόσδεση αντισωμάτων, που αποτελεί έναν δείκτη οψωνισμού και άρα πιθανής απομάκρυνσης των κυττάρων και καταστροφής τους. Συμπερασματικά η εργασία επικεντρώνεται στο ρόλο του οξειδωτικού στρες και της κυτταρικής γήρανσης στα ερυθροκύτταρα, που είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την κατανόηση της παθογένειας των ηπατικών νόσων και την αξιολόγηση των πιθανών θεραπειών στο άμεσο μέλλον.



## Αναφορές

1. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol CB*. 6 Νοέμβριος 2017;27(21):R1147–51.
2. Li S, Hong M, Tan HY, Wang N, Feng Y. Insights into the Role and Interdependence of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:4234061.
3. Ivanov AV, Valuev-Elliston VT, Tyurina DA, Ivanova ON, Kochetkov SN, Bartosch B, κ.ά. Oxidative stress, a trigger of hepatitis C and B virus-induced liver carcinogenesis. *Oncotarget*. 11 Δεκέμβριος 2016;8(3):3895–932.
4. Devarbhavi H, Asrani SK, Arab JP, Nartey YA, Pose E, Kamath PS. Global burden of liver disease: 2023 update. *J Hepatol*. 1 Αύγουστος 2023;79(2):516–37.
5. Muriel P, Gordillo KR. Role of Oxidative Stress in Liver Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:9037051.
6. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol WJG*. 7 Ιούλιος 2014;20(25):8082–91.
7. Campisi J, d’Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Σεπτέμβριος 2007;8(9):729–40.
8. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, d’Adda di Fagagna F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Φεβρουάριος 2021;22(2):75–95.
9. Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, Tuma F. *Physiology, Liver*. Στο: StatPearls [Διαδίκτυο]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [παρατίθεται 6 Απρίλιος 2024]. Διαθέσιμο στο: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>
10. Gonzalez-Casas R, Jones EA, Moreno-Otero R. Spectrum of anemia associated with chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 7 Οκτώβριος 2009;15(37):4653–8.
11. Dawidowski J, Pietrzak A. Rare causes of anemia in liver diseases. *Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ*. Δεκέμβριος 2022;31(5):567–74.
12. Bellar A, Welch N, Dasarathy J, Attaway A, Musich R, Kumar A, κ.ά. Peripheral blood mononuclear cell mitochondrial dysfunction in acute alcohol-associated hepatitis. *Clin Transl Med*. 25 Μάιος 2023;13(5):e1276.
13. Carulli L, Anzivino C. Telomere and telomerase in chronic liver disease and hepatocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 28 Δεκέμβριος 2014;20(20):6287–92.

14. Ristic-Medic D, Petrovic S, Arsic A, Vucic V. Liver disease and COVID-19: The link with oxidative stress, antioxidants and nutrition. *World J Gastroenterol*. 14 Σεπτέμβριος 2021;27(34):5682–99.
15. Barbalato L, Pillarisetty LS. Histology, Red Blood Cell. Στο: StatPearls [Διαδίκτυο]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [παρατίθεται 6 Απρίλιος 2024]. Διαθέσιμο στο: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539702/>
16. Cooper RA, Diloy-Puray M, Lando P, Greenberg MS. An Analysis of Lipoproteins, Bile Acids, and Red Cell Membranes Associated with Target Cells and Spur Cells in Patients with Liver Disease. *J Clin Invest*. Δεκέμβριος 1972;51(12):3182–92.
17. Milman N, Pedersen AN. Blood haemoglobin concentrations are higher in smokers and heavy alcohol consumers than in non-smokers and abstainers: should we adjust the reference range? *Ann Hematol*. Ιούλιος 2009;88(7):687–94.
18. Eschwege E, Papoz L, Lellouch J, Claude JR, Cubeau J, Pequignot G, κ.ά. Blood cells and alcohol consumption with special reference to smoking habits. *J Clin Pathol*. Ιούλιος 1978;31(7):654–8.
19. Sonmez M, Ince HY, Yalcin O, Ajdžanović V, Spasojević I, Meiselman HJ, κ.ά. The Effect of Alcohols on Red Blood Cell Mechanical Properties and Membrane Fluidity Depends on Their Molecular Size. *PLoS ONE*. 23 Σεπτέμβριος 2013;8(9):e76579.
20. Lee SY, Park HJ, Best-Popescu C, Jang S, Park YK. The Effects of Ethanol on the Morphological and Biochemical Properties of Individual Human Red Blood Cells. *PLoS ONE*. 21 Δεκέμβριος 2015;10(12):e0145327.
21. 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*. Ιανουάριος 2017;60(1):63–9.
22. Singal AK, Bataller R, Ahn J, Kamath PS, Shah VH. ACG Clinical Guideline: Alcoholic Liver Disease. *Am J Gastroenterol*. Φεβρουάριος 2018;113(2):175–94.
23. Rocco A, Compare D, Angrisani D, Sanduzzi Zamparelli M, Nardone G. Alcoholic disease: Liver and beyond. *World J Gastroenterol WJG*. 28 Οκτώβριος 2014;20(40):14652–9.
24. Hosseini N, Shor J, Szabo G. Alcoholic Hepatitis: A Review. *Alcohol Alcohol Oxf Oxf*. Ιούλιος 2019;54(4):408–16.
25. Hernández-Évole H, Jiménez-Esquível N, Pose E, Bataller R. Alcohol-associated liver disease: Epidemiology and management. *Ann Hepatol*. 2024;29(1):101162.
26. Stickel F, Datz C, Hampe J, Bataller R. Pathophysiology and Management of Alcoholic Liver Disease: Update 2016. *Gut Liver*. Μάρτιος 2017;11(2):173–88.
27. Jeon S, Carr R. Alcohol effects on hepatic lipid metabolism. *J Lipid Res*. Απρίλιος 2020;61(4):470–9.

28. Dukić M, Radonjić T, Jovanović I, Zdravković M, Todorović Z, Krašnik N, κ.ά. Alcohol, Inflammation, and Microbiota in Alcoholic Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 13 Φεβρουάριος 2023;24(4):3735.
29. Niemelä O, Halkola AS, Bloigu A, Bloigu R, Nivukoski U, Pohjasniemi H, κ.ά. 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.* 22 Οκτώβριος 2022;23(21):12738.
30. Wu X, Fan X, Miyata T, Kim A, Cajigas-Du Ross CK, Ray S, κ.ά. Recent Advances in Understanding of Pathogenesis of Alcohol-Associated Liver Disease. *Annu Rev Pathol.* 24 Ιανουάριος 2023;18:411–38.
31. Singal AK, Bailey SM. Cellular Abnormalities and Emerging Biomarkers in Alcohol-Associated Liver Disease. *Gene Expr.* 14 Δεκέμβριος 2018;19(1):49–60.
32. Besedina NA, Skverchinskaya EA, Ivanov AS, Kotlyar KP, Morozov IA, Filatov NA, κ.ά. Microfluidic Characterization of Red Blood Cells Microcirculation under Oxidative Stress. *Cells.* 16 Δεκέμβριος 2021;10(12):3552.
33. Mooli RGR, Mukhi D, Ramakrishnan SK. Oxidative Stress and Redox Signaling in the Pathophysiology of Liver Diseases. *Compr Physiol.* 29 Μάρτιος 2022;12(2):3167–92.
34. Kaniyas T, Acker JP. Biopreservation of red blood cells--the struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS J.* Ιανουάριος 2010;277(2):343–56.
35. Maheshwari N, Qasim N, Anjum R, Mahmood R. Fluoride enhances generation of reactive oxygen and nitrogen species, oxidizes hemoglobin, lowers antioxidant power and inhibits transmembrane electron transport in isolated human red blood cells. *Ecotoxicol Environ Saf.* 15 Ιανουάριος 2021;208:111611.
36. Geetha A, Lakshmi Priya MD, Jeyachristy SA, Surendran R. Level of oxidative stress in the red blood cells of patients with liver cirrhosis. *Indian J Med Res.* Σεπτέμβριος 2007;126(3):204–10.
37. Saletе-Granado D, Carbonell C, Puertas-Miranda D, Vega-Rodríguez VJ, García-Macia M, Herrero AB, κ.ά. Autophagy, Oxidative Stress, and Alcoholic Liver Disease: A Systematic Review and Potential Clinical Applications. *Antioxidants.* 14 Ιούλιος 2023;12(7):1425.
38. Yang YM, Cho YE, Hwang S. Crosstalk between Oxidative Stress and Inflammatory Liver Injury in the Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 11 Ιανουάριος 2022;23(2):774.
39. Uzun H, Simsek G, Aydin S, Unal E, Karter Y, Yelmen NK, κ.ά. Potential effects of L-NAME on alcohol-induced oxidative stress. *World J Gastroenterol WJG.* 28 Ιανουάριος 2005;11(4):600–4.

40. Yan C, Hu W, Tu J, Li J, Liang Q, Han S. Pathogenic mechanisms and regulatory factors involved in alcoholic liver disease. *J Transl Med.* 4 Μάιος 2023;21:300.
41. D'Alessandro A, Fu X, Reisz JA, Stone M, Kleinman S, Zimring JC, κ.ά. Ethyl glucuronide, a marker of alcohol consumption, correlates with metabolic markers of oxidant stress but not with hemolysis in stored red blood cells from healthy blood donors. *Transfusion (Paris).* Ιούνιος 2020;60(6):1183–96.
42. Yokoi H, Furukawa M, Wang J, Aoki Y, Raju R, Ikuyo Y, κ.ά. Erythritol Can Inhibit the Expression of Senescence Molecules in Mouse Gingival Tissues and Human Gingival Fibroblasts. *Nutrients.* 19 Σεπτέμβριος 2023;15(18):4050.
43. Freitas Leal JK, Adjobo-Hermans MJW, Brock R, Bosman GJCGM. Acetylcholinesterase provides new insights into red blood cell ageing in vivo and in vitro. *Blood Transfus.* Μάιος 2017;15(3):232–8.
44. Badiou KE, Casey JR. Molecular mechanism for the red blood cell senescence clock. *IUBMB Life.* Ιανουάριος 2018;70(1):32–40.
45. Bardyn M, Rappaz B, Jaferzadeh K, Crettaz D, Tissot JD, Moon I, κ.ά. Red blood cells ageing markers: a multi-parametric analysis. *Blood Transfus.* Μάιος 2017;15(3):239–48.
46. Kresovich JK, Martinez Lopez AM, Garval EL, Xu Z, White AJ, Sandler DP, κ.ά. Alcohol Consumption and Methylation-Based Measures of Biological Age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 26 Μάιος 2021;76(12):2107–11.
47. Chen X, Li M, Yan J, Liu T, Pan G, Yang H, κ.ά. Alcohol Induces Cellular Senescence and Impairs Osteogenic Potential in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Alcohol Alcohol Oxf Oxfs.* Μάιος 2017;52(3):289–97.
48. Luo A, Jung J, Longley M, Rosoff DB, Charlet K, Muench C, κ.ά. Epigenetic aging is accelerated in alcohol use disorder and regulated by genetic variation in APOL2. *Neuropsychopharmacology.* Ιανουάριος 2020;45(2):327–36.
49. Beach SRH, Ong ML, Gibbons FX, Gerrard M, Lei MK, Dawes K, κ.ά. Epigenetic and Proteomic Biomarkers of Elevated Alcohol Use Predict Epigenetic Aging and Cell-Type variation Better Than Self-Report. *Genes.* 18 Οκτώβριος 2022;13(10):1888.
50. Lu C, Ge T, Shao Y, Cui W, Li Z, Xu W, κ.ά. ZNF281 drives hepatocyte senescence in alcoholic liver disease by reducing HK2–stabilized PINK1/Parkin–mediated mitophagy. *Cell Prolif.* 14 Δεκέμβριος 2022;56(3):e13378.

## Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1: Ανατομία ήπατος. Πηγή: <a href="https://peptiko.gr/en/liver-anatomy-function-common-diseases-and-foods/">https://peptiko.gr/en/liver-anatomy-function-common-diseases-and-foods/</a> .....	4
Εικόνα 2: Το ερυθροκύτταρο στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Πηγή: <a href="https://nisenet.org/catalog/scientific-image-human-red-blood-cells-sem">https://nisenet.org/catalog/scientific-image-human-red-blood-cells-sem</a> .....	9
Εικόνα 3: Το ήπαρ στην αλκοολική ηπατική νόσο. Πηγή: <a href="https://continentalhospitals.com/diseases/alcoholic-liver-disease/">https://continentalhospitals.com/diseases/alcoholic-liver-disease/</a> .....	15
Εικόνα 4: Κίρρωση του ήπατος σε υπέρηχο Doppler. Πηγή: <a href="https://ejrnm.springeropen.com/articles/10.1186/s43055-020-00344-6">https://ejrnm.springeropen.com/articles/10.1186/s43055-020-00344-6</a> .....	18
Εικόνα 5: Το κύτταρο σε οξειδωτικό στρες. Πηγή: <a href="https://www.h-h-c.com/what-is-oxidative-stress-and-how-to-analyze-it/">https://www.h-h-c.com/what-is-oxidative-stress-and-how-to-analyze-it/</a> .....	26
Εικόνα 6: Το οξειδωτικό στρες στα μιτοχόνδρια. Πηγή: <a href="https://www.researchgate.net/figure/Mitochondrial-dysfunction-and-oxidative-stress-Mitochondrial-genome-can-be-affected-by_fig2_280940686">https://www.researchgate.net/figure/Mitochondrial-dysfunction-and-oxidative-stress-Mitochondrial-genome-can-be-affected-by_fig2_280940686</a> .....	28
Εικόνα 7: Οξειδωτικό στρες και οργανίδια. Πηγή: <a href="https://www.researchgate.net/figure/Mitochondrial-dysfunction-and-oxidative-stress-OS-are-tightly-dependent-on-each-other_fig1_273155367">https://www.researchgate.net/figure/Mitochondrial-dysfunction-and-oxidative-stress-OS-are-tightly-dependent-on-each-other_fig1_273155367</a> .....	30
Εικόνα 8: Μεταβολισμός αιθανόλης. Πηγή: <a href="https://www.researchgate.net/figure/Oxidative-pathways-of-alcohol-metabolism-Alcohol-is-metabolized-mainly-in-the-cytosol-by_fig4_259209496">https://www.researchgate.net/figure/Oxidative-pathways-of-alcohol-metabolism-Alcohol-is-metabolized-mainly-in-the-cytosol-by_fig4_259209496</a> .....	35
Εικόνα 9: Η κυτταρική γήρανση μέσα στο κύτταρο. Πηγή: <a href="https://www.researchgate.net/figure/Oxidative-pathways-of-alcohol-metabolism-Alcohol-is-metabolized-mainly-in-the-cytosol-by_fig4_259209496">https://www.researchgate.net/figure/Oxidative-pathways-of-alcohol-metabolism-Alcohol-is-metabolized-mainly-in-the-cytosol-by_fig4_259209496</a> .....	40

## Περιεχόμενα διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Ενεργότητα G6PD μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών με ηπατοπάθεια. (Το σύμβολο * αντιστοιχεί σε $p < 0.05$ και δηλώνει στατιστική σημασία).....	64
Διάγραμμα 2: Ενδοκυττάρια δραστικές ρίζες οξυγόνου μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ηπατική νόσο (Το σύμβολο # αντιστοιχεί σε $0.05 < p < 0.1$ και δηλώνει στατιστική τάση).....	65
Διάγραμμα 3: Μέτρηση ενδοκυττάρια μορίων ασβεστίου σε μάρτυρες και ασθενείς με ηπατοπάθεια.....	66
Διάγραμμα 4: Εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης μεταξύ control και ασθενών. (Το σύμβολο * αντιστοιχεί σε $p < 0.05$ και δηλώνει στατιστική σημασία).....	67
Διάγραμμα 5: Πρόσδεση IgG σε υγιή άτομα και σε άτομα με ηπατοπάθεια. (Το σύμβολο # αντιστοιχεί σε $0.05 < p < 0.1$ και δηλώνει στατιστική τάση).....	68