

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

&

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ



**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ
ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΣΕ
ΚΙΡΡΩΤΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ»**

ΓΑΡΥΦΑΛΛΙΑ Δ. ΚΑΛΤΣΑ

ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2015



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
Πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

&

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ



**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ
ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΣΕ
ΚΙΡΡΩΤΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ»**

ΓΑΡΥΦΑΛΛΙΑ Δ. ΚΑΛΤΣΑ

ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2015



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ιατρική Σχολή

Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική

&

Πανεπιστημιακή Γαστρεντερολογική Κλινική

Διευθυντές:

Καθηγητής Πέτρος Σφηκάκης

Καθηγητής Γεώργιος Παπαθεοδωρίδης

Υποψήφια Διδάκτωρ: Γαρυφαλλιά Καλτσά, Ιατρός

*Επιβλέπων Καθηγητής: Σπύρος Λαδάς, Καθηγητής Παθολογίας-
Γαστρεντερολογίας*

*Τόπος εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής: Α' Προπαιδευτική
Παθολογική Κλινική & Πανεπιστημιακή Γαστρεντερολογική Κλινική*

*Γνωστικό Αντικείμενο: «Μελέτη του ρόλου των φυσικών
αντιμικροβιακών πεπτιδίων στην παθογένεση των λοιμώξεων σε
κιρρωτικούς ασθενείς»*

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- 1. Σπύρος Λαδάς, Καθηγητής Παθολογίας-Γαστρεντερολογίας*
- 2. Ειρήνη Βαφειάδη-Ζουμπούλη, Καθηγήτρια Παθολογίας-
Γαστρεντερολογίας*
- 3. Γεώργιος Δαΐκος, Καθηγητής Παθολογίας*

Εκθέσεις προόδου:

1^η Έκθεση προόδου: 2/7/2010

2^η Έκθεση προόδου: 22/7/2011

3^η Έκθεση προόδου: 13/3/2013

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Σπύρος Λαδάς, Καθηγητής Παθολογίας-Γαστρεντερολογίας
2. Ειρήνη Βαφειάδη-Ζουμπούλη, Καθηγήτρια Παθολογίας-Γαστρεντερολογίας
3. Γεώργιος Δαΐκος, Καθηγητής Παθολογίας
4. Σπύρος Ντουράκης, Καθηγητής Παθολογίας-Ηπατολογίας
5. Γεώργιος Παπαθεοδωρίδης, Καθηγητής Παθολογίας-Γαστρεντερολογίας
6. Ιωάννης Βλαχογιαννάκος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας
7. Γεώργιος Καραμανώλης, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας

*Στο φως της ζωής μου,
στο γιο μου,
Νεκτάδημο*

*Στους γονείς μου,
Καίτη και Δημήτρη*

Ὀρκος του Ιπποκράτη

« Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, Ἱστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χριζόντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωύτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἢν χριζῶσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὔδενί.

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν.

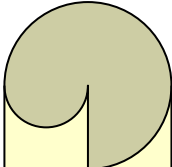
Οὐ δώσω δὲ οὔδὲ φάρμακον οὔδενι αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὔδὲ ὑφηγήσομαι συμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὔδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν.

Οὐ τεμέω δὲ οὔδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἦ ἀκούσω, ἦ καὶ ἄνευ θεραπήης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἕξω, σιγήσομαι, ἄρῆτα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιποροῦντι, τάναντία τουτέων. »



« Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή.

Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωτόν του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδελφία μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία.

Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο.

Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη.

Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης.

Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά.

Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα. »

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε, συνεγγράφη και ολοκληρώθηκε το 2015. Λίγα χρόνια πριν, το Φεβρουάριο του 2009, το ταξίδι ξεκινούσε. Ένα ταξίδι με άγνωστο προορισμό, πλήθος δυσκολιών, εμποδίων, απογοητεύσεων, αλλά και επιτυχημένων και χαρούμενων στιγμών. Ένα ταξίδι που θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί χωρίς τις συμβουλές, την εμπειρία, τη βοήθεια, την κατανόηση, αλλά και την υπομονή όλων εκείνων των ανθρώπων που στάθηκαν στο πλάι μου.

Ήταν πραγματική τύχη να βρεθώ μαθητευόμενη στην ομάδα εξαιρετικών επιστημόνων και γνωρίζω ότι λίγες φράσεις ευχαριστιών που θα γραφούν σε μία σελίδα δεν αρκούν για να εκφράσουν την ευγνωμοσύνη, το σεβασμό και το θαυμασμό μου προς , ας μου επιτραπεί η έκφραση, την ερευνητική και ιατρική μου οικογένεια, αλλά θα προσπαθήσω συνοπτικά να ευχαριστήσω:

1. Τον Καθηγητή και Επιβλέποντα της Διατριβής, Καθηγητή Γαστρεντερολογίας και Παθολογίας, κ. Σπύρο Λαδά. Όχι μόνο για την τιμή της ανάθεσης της διατριβής, και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, όχι μόνο για την αμέριστη συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της, αλλά κυρίως για το ότι μας ενέπνευσε με το παράδειγμά του και την αγάπη του προς την επιστήμη της Γαστρεντερολογίας.
2. Την Καθηγήτρια Παθολογίας και Γαστρεντερολογίας, κα Ειρήνη Βαφειάδη-Ζουμπούλη. Είναι τιμή να εκπονείται μία διδακτορική διατριβή με θέμα την κίρρωση του ήπατος δίπλα σε μία τόσο διακεκριμένη και βαθιά γνώστρια του αντικειμένου Ηπατολόγου, η οποία εκτός των ιατρικών γνώσεων που μεταλαμπάδευσε, γνώριζε να στηρίζει και ηθικά τους νέους επιστήμονες στα πρώτα βήματά τους.
3. Τον Καθηγητή Παθολογίας και Διευθυντή του εργαστηρίου Λοιμώξεων, κ. Γεώργιο Δαΐκο. Ήταν τιμή να διδαχθώ έρευνα στο εργαστήριό του και να μου δείξει τόση εμπιστοσύνη κατά τη διάρκεια εκπόνησης των πειραμάτων. Ήταν, επίσης, τιμή και τύχη να διδαχθώ και ως φοιτήτρια Παθολογία και οφείλω ένα ακόμα ευχαριστώ για τις βάσεις που μου μετέδωσε για την Ιατρική μου πορεία.
4. Τον κ. Γιώργο Μπάμια, Γαστρεντερολόγο-Επιμελητή Α'. Τον ευχαριστώ που με την άριστη κατάρτισή του και την αγάπη του προς την έρευνα, συντόνισε τη δύσκολη αυτή διαδρομή και μου δίδαξε έρευνα όταν ήμουν ακόμη αδαής, με εμπιστεύτηκε να παρουσιάσω σε ελληνικά και διεθνή συνέδρια όταν δεν είχα ξαναπαρουσιάσει ποτέ στο παρελθόν, που μου ανέθεσε τη συγγραφή άρθρων. Πρόκειται για τον ερευνητικό μου

πατέρα, που μου έμαθε να προσπαθώ για την τελειότητα , όπως ο ίδιος, ακόμη και όταν φαίνεται αδύνατη. Ένα ευχαριστώ απλά είναι λίγο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Παπαθεοδωρίδη, Διευθυντή της Πανεπιστημιακής Γαστρεντερολογικής Κλινικής ο οποίος διευκόλυνε την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Βλαχογιαννάκο, ο οποίος συνετέλεσε στην ολοκλήρωση της παρούσας έρευνας τόσο με την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη συλλογή των δειγμάτων, όσο και με τις εύστοχες παρατηρήσεις του και τη μετάδοση των εξειδικευμένων γνώσεων που κατέχει στον τομέα της ηπατολογίας, τον κ. Σπύρο Μιχόπουλο Διευθυντή της Γαστρεντερολογικής Κλινικής του ΓΝΑ “Αλεξάνδρα” και την κα Ευανθία Ζαμπέλη για τη συνεργασία.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον κ. Σπύρο Σιακαβέλλα, συνάδελφο, συνεργάτη, τον κ. Δημήτρη Γούκο, Βιολόγο, για την πολύτιμη βοήθειά του στην βαθύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών καθώς και όλους τους Διευθυντές, Επιμελητές, συνεργάτες, συναδέλφους και φίλους που στάθηκαν τόσα χρόνια στο πλευρό μου τόσο στην Κλινική και τα Εργαστήρια της Α΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής και Πανεπιστημιακής Γαστρεντερολογικής Κλινικής, όσο και στις άλλες κλινικές και εργαστήρια με τα οποία συνεργαστήκαμε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους τους αφανείς ήρωες, που χωρίς τη δική τους βοήθεια, δε θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου, Καίτη και Δημήτρη, γιατί σε εκείνους οφείλω ό,τι έχω δημιουργήσει.

Και το μεγαλύτερο ευχαριστώ στο γιο μου, Νεκτάδημο, γιατί μόνο με το βλέμμα του μου δίνει δύναμη να συνεχίζω...

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Γαρυφαλλιά Καλτσά
Οδός Μιχαλακοπούλου 113
Αμπελόκηποι, Αθήνα
Τ.Κ. 11527
Τηλ: 2107487527
Κινητό: 6977257208
E-mail: garykaltsa@gmail.com

Ημερομηνία & Τόπος Γέννησης 28 Φεβρουαρίου 1985, Βόλος

Εθνικότητα Ελληνική

Εκπαίδευση/Μόρφωση **Απόφοιτος της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών**
Ημ. Κτήσης πτυχίου: Αύγουστος 2008
Βαθμός πτυχίου: «Λίαν Καλώς» (8,05)

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Σπουδών στη «Μοριακή Ιατρική»

Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Ημ. Κτήσης πτυχίου: Δεκέμβριος 2012
Βαθμός πτυχίου: «Άριστα» (8,9)

Ιούλιος 2012 - σήμερα **Ειδικευόμενη Παθολογίας στο Γενικό Νοσοκομείο Χαλκίδας εν αναμονή έναρξης ειδικότητας Γαστρεντερολογίας στο ΓΝΑ "ΛΑΪΚΟ"**

Οκτώβριος 2008 - Ιούνιος 2012 **Επιστημονικός Συνεργάτης στο Ήπατογαστρεντερολογικό Εργαστήριο της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών**

2002-2008 **Φοιτήτρια Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών**
Εισήχθη στην Ιατρική Σχολή μέσω των Πανελληνίων Εξετάσεων με 19572/20000 μόρια (8^η από τους εισαχθέντες στην Ιατρική).
Ολοκλήρωσα τις σπουδές μου στο ελάχιστο προβλεπόμενο χρονικό διαστήμα (διάρκεια 12 εξαμήνων).

Δημοσιεύσεις

- 1) Koutsounas I, **Kaltsa G**, Siakavellas SI, Bamias G. Markers of bacterial translocation in end-stage liver disease. World J Hepatol. 2015 Sep 18;7(20):2264-73.
- 2) **Kaltsa G**, Bamias G, Siakavellas SI, Goukos D, Karagiannakis D, Zampeli E, Vlachogiannakos J, Michopoulos S, Vafiadi I, Daikos GL, Ladas SD. Systemic levels of human β -defensin 1 are elevated in patients with cirrhosis. Ann Gastroenterol 2015; 28 (4): 1-10. Άρθρο υπό δημοσίευση.
- 3) Karagianni F, Prakoura N, **Kaltsa G**, Politis P, Arvaniti E, Kaltezioti V, Psarras S, Pagakis S, Katsimboulas M, Abed A, Chatziantoniou C, Charonis A. Transgelin Up-Regulation in Obstructive Nephropathy. PLoS One. 2013 Jun 26; 8(6): e66887.
- 4) Bamias G, Daikos GL, Siakavellas SI, **Kaltsa G**, Smilakou S, Katsogridakis I, Vafiadis-Zouboulis I, Ladas SD. Atypical mycobacterial infection presenting as persistent skin lesion in a patient with ulcerative colitis. Case Rep Med. 2011; 2011: 480987.
- 5) Bamias G, **Kaltsa G**, Siakavellas SI, Gizis M, Margantinis G, Zampeli E, Vafiadis-Zouboulis I, Michopoulos S, Daikos GL, Ladas SD. Differential expression of the TL1A/DcR3 system of TNF/TNFR-like proteins in large vs. small intestinal Crohn's disease. Dig Liver Dis. 2012 Jan; 44(1): 30-6.
- 6) Bamias G, Evangelou K, Vergou T, Tsimaratou K, **Kaltsa G**, Antoniou C, Kotsinas A, Kim S, Gorgoulis V, Stratigos AJ, Sfikakis PP. Upregulation and nuclear localization of TNF-like cytokine 1A (TL1A) and its receptors DR3 and DcR3 in psoriatic skin lesions. Exp Dermatol. 2011 Sep; 20(9): 725-31.
- 7) Bamias G, **Kaltsa G**, Ladas SD. Cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. Discov Med. 2011 May; 11(60): 459-67.
- 8) Bamias G, **Kaltsa G**, Siakavellas SI, Papaxoinis K, Zampeli E, Michopoulos S, Zouboulis-Vafiadis I, Ladas SD. High intestinal and systemic levels of decoy receptor 3 (DcR3) and its ligand TL1A in active ulcerative colitis. Clin Immunol. 2010 Nov; 137(2): 242-9.

Παρουσιάσεις-Ομιλήτρια σε συνέδρια

- Προφορική παρουσίαση στο 32^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας 2012, Αθήνα, με τίτλο:
“Μελέτη των επιπέδων φυσικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων και δεικτών βακτηριακής αλλόθεσης σε κίρρωτικούς ασθενείς”

Γ. Μπάμιας, **Γ. Καλτσά**, Ε. Ζουμπούλη-Βαφειάδη, Μ. Γκίζης, Δ. Καραγιαννάκης, Ε. Λαούδη, Δ. Γούκος, ΓΛ Δαΐκος, Ι. Βλαχογιαννάκος, ΣΔ Λαδάς

- Προφορική παρουσίαση στο DDW2012, San Diego, California, με τίτλο:
“Markers of Bacterial Translocation in Patients with Chronic Liver Disease”
G. Kaltsa, I. Zouboulis-Vafiadis, M. Gizis, DS Karagiannakis, E. Laoudi, J. Vlachogiannakos, G. Daikos, G. Bamias, SD Ladas
- Προφορική παρουσίαση στο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο 2012, Αθήνα, με τίτλο:
“Μελέτη των επιπέδων φυσικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων και δεικτών βακτηριακής αλλόθεσης σε κίρρωτικούς ασθενείς”
Γ. Καλτσά, Ε. Ζουμπούλη-Βαφειάδη, Μ. Γκίζης, Δ. Καραγιαννάκης, Ε. Λαούδη, ΓΛ Δαΐκος, Ι. Βλαχογιαννάκος, Γ. Μπάμιας, ΣΔ Λαδάς
- Προφορική παρουσίαση στο 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας 2012, Κυλλήνη, με τίτλο:
“Ο ρόλος του Kruppel-Like Factor 6 (KLF6) στη νεφρική ίνωση”
Γ. Καλτσά, Φ. Καραγιάννη, Ν. Πράκουρα, Β. Καλτεζιώτη, Μ. Κατσίμπουλας, Π. Πολίτης, Α. Χαρώνης
- Προφορική παρουσίαση στη 19^η Διεθνή Δημερίδα Ηπατίτιδας Β & C “Σ. Χατζηγιάννης”, Αθήνα, 2012, με τίτλο:
“Αντιμικροβιακά πεπτίδια (ντεφενσίνες) και δείκτες βακτηριακής αλλόθεσης σε κίρρωτικούς ασθενείς”
Γ. Καλτσά, Ε. Ζουμπούλη-Βαφειάδη, Μ. Γκίζης, Δ. Καραγιαννάκης, Ε. Λαούδη, ΓΛ Δαΐκος, Ι. Βλαχογιαννάκος, Γ. Μπάμιας, ΣΔ Λαδάς
- Παρουσίαση πόστερ **προτεινόμενου για βράβευση** στο UEGW 2011, Stockholm, Sweden, με τίτλο:
“Elevated plasma levels of natural antimicrobial peptides in patients with chronic liver disease”
G. Kaltsa, I. Vafiadi-Zoumbouli, M. Gizis, S. I. Siakavellas, J. Vlachogiannakos, E. Zambeli, S. Michopoulos, G.L. Daikos, G. Bamias, S. D. Ladas
- Παρουσίαση πόστερ στο EUROKUP, Cyprus, 2010, με τίτλο:
“Members of the Kruppel-Like Factors (KLF) family of transcription factors are involved in renal fibrosis”
G. Kaltsa, F. Karagianni, N. Prakoura, P. Politis and A. Charonis
- Προφορική παρουσίαση στο 30^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας 2010, με τίτλο:
“Αυξημένα επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης DcR3 στον ορό ασθενών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνο (ΗΚΚ)”
Γ. Καλτσά, Σ.Η. Σιακαβέλλας, Μ. Γκίζης, Ι. Βλαχογιαννάκος, Ι. Δελλαδέτσιμα, Ε. Ζουμπούλη-Βαφειάδη, Γ. Μπάμιας, Σ.Δ. Λαδάς.

Περιλήψεις προφορικών και αναρτημένων ανακοινώσεων σε συνέδρια

- Πόστερ στο AASLD: The Liver Meeting 2011, San Francisco CA, με τίτλο:
“Elevated Plasma Levels of Natural Antimicrobial Peptides in Patients with Chronic Liver Disease”
G. Kaltsa, I. Vafiadis-Zouboulis, D. Karagiannakis, J. Vlachogiannakos, SI Siakavellas, M. Gizis, E. Zampeli, S. Michopoulos, GL Daikos, G. Bamias, SD Ladas
- Πόστερ στο AASLD: The Liver Meeting 2011, San Francisco CA, με τίτλο:
“Cirrhotic Cardiomyopathy: Frequency, Characteristics and Relationship with Bacterial Translocation”
D. Karagiannakis, J. Vlachogiannakos, G. Anastasiadis, G. Kaltsa, SI Siakavellas, I. Vafiadis-Zouboulis, SD Ladas
- Προφορική ανακοίνωση στο UEGW 2010, Barcelona, με τίτλο:
“Intestinal and Systemic Expression of Decoy Receptor 3 (DcR3) and TL1a in Patients with Ulcerative Colitis (UC)”
G. Bamias, SI Siakavellas, G. Kaltsa, K. Papaxoinis, E. Zambeli, S. Michopoulos, I. Zouboulis-Vafiadis, SD Ladas
- Πόστερ στο UEGW 2010, Barcelona, με τίτλο:
“The anti-apoptotic protein DcR3 (TNFSF6B) is elevated in patients with non-compensated cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC)”
G. Bamias, I. Zouboulis-Vafiadis, SI Siakavellas, G. Kaltsa, J. Vlachogiannakos, SD Ladas
- Προφορική ανακοίνωση στο 30^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας 2010, Αθήνα, με τίτλο:
“Μέτρηση του παράγοντα TL1A και του υποδοχέα του DcR3 στο αίμα και στον εντερικό ιστό ασθενών με ελκώδη κολίτιδα”
ΣΗ Σιακαβέλλας, Γ. Καλτσά, Μ. Γκίζης, Ε Ζαμπέλη, Σ. Μιχόπουλος, Ε. Βαφειάδη-Ζουμπούλη, Γ. Μπάμιας, ΣΔ Λαδάς
- Πόστερ στο GASTRO2009 UEGW/WCOG, London, με τίτλο:
“Measurment of soluble Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in patients with Ulcerative Colitis (UC) and Crohn’s Disease (CD) using a multiplex fluorometric assay”
G. Bamias, SI Siakavellas, G. Kaltsa, P. Tzafestas, D. Perrea, I. Vafiadis, SD Ladas

Ειδικά σεμινάρια – Εκπαιδεύσεις

- Σεμινάριο Advanced Cardiac Life Support (ACLS) πιστοποιημένο από το American College of Emergency Physicians (06/2011)

- Εκπαιδεύτρια ACLS από το 2012
- Σεμινάριο Advanced Medical Life Support (AMLS) πιστοποιημένο από την National Association of Emergency Medical Technicians (09/2014)
- Εκπαιδεύτρια AMLS (9/2014)

Υποτροφίες

- Υποτροφία «Ηράκλειτος II» από 2009-2015 για την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής, η οποία έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) - Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Μη Ιατρικά προσόντα

- Άριστη γνώση της Αγγλικής γλώσσας (Cambridge Proficiency, Michigan Proficiency).
- Άριστη γνώση της Γαλλικής γλώσσας (Sorbonne 2, DALF).
- Πολύ καλή γνώση της Ιταλικής γλώσσας (Κρατικό πτυχίο Γλωσσομάθειας-Γ1, Celi 3 του Πανεπιστημίου της Perugia).
- Καλή γνώση της Γερμανικής γλώσσας (Zertifikat Deutsch του Goethe Institut).
- Πτυχίο Αρμονίας.

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

«Έν οίδα ότι ούδέν οίδα»

Μία φράση χιλιάδων ετών, πόσο επίκαιρη μπορεί να είναι. Ίσως, ο Σωκράτης όταν εξέφραζε το «ένα γνωρίζω, ότι δεν γνωρίζω τίποτα» να μην απευθυνόταν στην Ιατρική επιστήμη, αλλά στο βάθος των αιώνων τα λόγια του μοιάζουν προφητικά.

Δε θα μπορούσα να σκεφτώ καλύτερη ρήση που να ταιριάζει στην Ιατρική. Αν αναλογιστεί κανείς τα χρόνια των ερευνητικών προσπαθειών και τις ανακαλύψεις που έχουν γίνει στο πέρασμα των χρόνων, θα παραδεχθεί ότι η πρόοδος είναι ραγδαία. Όμως, πολλά μοριακά μονοπατιά, πολλοί νοσολογικοί μηχανισμοί, πολλές βιολογικές λειτουργίες κρατούν επτασφράγιστα κρυμμένα τα μυστικά τους. Καταλήγουμε έτσι στο απογοητευτικό συμπέρασμα ότι τελικά έχουμε κατακτήσει ένα μικρό τμήμα της γνώσης, και τελικά σε πολλούς τομείς της Ιατρικής «ούδέν ἴσμεν».

Η κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στη παθοφυσιολογία και εξέλιξη μίας νόσου ή/και των επιπλοκών της, θα βοηθούσε στην βελτιωμένη διαγνωστική και θεραπευτικής της προσέγγισης μέσω της ανάπτυξης νέων ειδικών, ευαίσθητων και εύκολα μετρήσιμων διαγνωστικών δεικτών (βιοδεικτών) και νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων. Πλήθος ερευνητικών προσπαθειών έχουν στραφεί προς τη συγκεκριμένη κατεύθυνση με στόχο την αποσαφήνιση των μοριακών και βιολογικών μονοπατιών διαφόρων ασθενειών.

Ένα πεδίο έντονης ερευνητικής προσπάθειας, χωρίς ωστόσο να έχει καταστεί εφικτή η πλήρης κατανόησή της, είναι η ανάπτυξη της βακτηριακής αλλόθεσης στους ασθενείς με τελικού σταδίου ηπατική νόσο. Αν και έχουν προταθεί διάφορα μόρια ως πιθανοί βιοδείκτες της και οι υποθέσεις για την παθογένεια της συγκεκριμένης οντότητας είναι πολυάριθμες, όμως μία σαφής εξήγηση του

φαινομένου, καθώς και η επίπτωσή της στον κίρρωτικό πληθυσμό, ακόμα εκκρεμούν.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή έχει ως στόχο να προσφέρει ένα λιθαράκι γνώσης στα άγνωστα μονοπάτια της παθογένειας των λοιμώξεων σε ασθενείς με τελικού σταδίου ηπατική νόσο και την ανάδειξη ενός πιθανού δείκτη βακτηριακής αλλόθεσης. Απώτερος σκοπός είναι η έγκαιρη διάγνωση ασθενών υψηλού κινδύνου και στη μελλοντική ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στόχων στην κίρρωση του ήπατος.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ALT	: Alanine transaminase, αλανινική αμινοτρανσφεράση
AMPs	: Antimicrobial peptides, αντιμικροβιακά πεπτίδια
AP-1	: Activator protein 1, μεταγραφικός παράγοντας
AST	: Aspartate transaminase, ασπαρτική αμινοτρανσφεράση
bdNA	: Bacterial DNA, βακτηριακό DNA
BSA	: Bovine serum albumin, βόεια αλβουμίνη ορού
BTEB	: Basic transcription element binding protein
c-myc	: Μεταγραφικός παράγοντας
C/EBP	: CCAAT-enhancer-binding proteins, μεταγραφικός παράγοντας
CARD15	: Caspase recruitment domain-containing protein 15
CCR6	: CC chemokine receptor 6, υποδοχέας 6 της χημειοκίνης CC
cdNA	: Complementary DNA, συμπληρωματικό DNA
CI	: Confidence interval, διάστημα εμπιστοσύνης
COX1	: Cyclooxygenase-1, κυκλοξυγενάση-1
Crea	: Creatinine, κρεατινίνη
DAB	: Diaminobenzidine, διαμινοβενζιδίνη
DNA	: Deoxyribonucleic acid, δεσοξυριβοζονουκλεϊκό οξύ
dNTPs	: triphosphate deoxynucleotides, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid, Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EGFR	: Epidermal growth factor receptor, υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay, ενζυμο-συνδεόμενη ανοσοαπορροφητική τεχνική
eNOS	: Endothelial nitric oxide synthase, ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου
ERK	: Extracellular-signal-regulated kinase, κινάση που ρυθμίζεται από εξωκυττάρια σηματοδότηση
FBS	: Fetal bovine serum, ορός αίματος βόειου εμβρύου
hBD1-4	: Human beta defensin 1-4, ανθρώπινη βήτα ντεφενσίνη 1-4
HBsAg	: Surface antigen of the hepatitis B virus, αντιγόνο επιφανείας του ιού της ηπατίτιδας Β
HBSS	: Hank's Balanced Salt Solution
HBV	: Hepatitis B Virus, ιός ηπατίτιδας Β
hCAP-18	: The human cationic antimicrobial protein 18, καδελινιδίνη (ή LL37)
HCV	: Hepatitis C Virus, ιός ηπατίτιδας C
HD5	: Human defensin 5, ανθρώπινη ντεφενσίνη 5
HD6	: Human defensin 6, ανθρώπινη ντεφενσίνη 6
HDAC	: Histone deacetylases
HIV	: Human immunodeficiency virus, ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
HNP1-4	: Human neutrophil peptides 1-4, ανθρώπινα πεπτίδια των ουδετερόφιλων 1-4

HRP	: Horseradish peroxidase
HSCs	: Hepatic stellate cells, ηπατικά αστεροειδή κύτταρα
HSV	: Herpes simplex virus, ιός του απλού έρπητα
IgG	: Immunoglobulin G, ανοσοσφαιρίνη Γ
IL-1β	: Interleukin 1β, ιντερλευκίνη 1β
INR	: International normalized ratio
KLF6	: Krüppel like factor 6, μεταγραφικός παράγοντας
LBP	: Lipopolysaccharite binding protein, πρωτεΐνη που προσδένει τον λιποπολυσακχαρίτη
LL37	: Cathelicidin, καδελιχιδίνη (ή hCAP-18)
LPS	: Lipopolysaccharite, λιποπολυσακχαρίτης
MAPK	: Mitogen activated protein kinase, MAP κινάση
mCD14	: Membrane cluster of differentiation 14, μεμβρανικό σύμπλεγμα διαφοροποίησης 14
MD-2	: Myeloid differentiation factor 2
MDP	: Muramyl-dipeptide, μουραμικό διπεπτίδιο
MELD	: Model of end stage liver disease
miRNA	: microRNA
mRNA	: Messenger RNA, αγγελιοφόρο RNA
NAFLD	: Non alcoholic fatty liver disease, μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος
NASH	: Nonalcoholic steatohepatitis, μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα
NFκB	: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, μεταγραφικός παράγοντας
NO	: Nitric oxide, μονοξείδιο του αζώτου
NOD2	: Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
PBS	: Phosphate buffer saline
PCR	: Polymerase chain reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PDGF	: Platelet-derived growth factor, αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας
PGN	: Peptidoglycan, πεπτιδογλυκάνη
PPARγ	: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, πυρηνικός υποδοχέας
REG3a	: Regenerating islet-derived protein 3 alpha
RNA	: Ribonucleic acid, ριβοζονουκλεϊκό οξύ
RPLP0	: 60S acidic ribosomal protein P0
rRNA	: Ribosomal RNA, ριβοσωμικό RNA
SBP	: Spontaneous bacterial peritonitis, αυτόματη βακτηριακή περιτονίτιδα
sCD14	: Soluble cluster of differentiation 14, διαλυτό σύμπλεγμα διαφοροποίησης 14
SD	: Standard deviation, τυπική απόκλιση
SIBO	: Small intestinal bacterial overgrowth, βακτηριακή υπερανάπτυξη στο λεπτό έντερο
TBE	: Tris/Borate/EDTA buffer
Tbil	: Total Bilirubin, ολική χολερυθρίνη
TGF-β1	: Transforming growth factor β1, αυξητικός παράγοντας

	μετασηματισμού-β1
TLR	: Toll-like receptor, Toll-like υποδοχείς
TNFα	: Tumor necrosis factor α, παράγοντας νέκρωσης όγκων α
TXA2	: Thromboxane A2, θρομβοξάνη A2
VEGF	: Vascular endothelial growth factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
γ-GT	: Gamma-glutamyl transferase, γάμμα γλουταμυλική τρανσφεράση
HKK	: Ηπατοκυτταρικός καρκίνος
ΙΦΝΕ	: Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	19
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
1. ΉΠΑΡ.....	22
2. ΚΙΡΡΩΣΗ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ.....	23
3. ΠΥΛΑΙΑ ΥΠΕΡΤΑΣΗ.....	25
4. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΑΛΛΟΘΕΣΗ.....	26
4.1. <i>Αυτόματη βακτηριακή περιτονίτιδα</i>	27
4.2. <i>Δείκτες βακτηριακής αλλόθεσης</i>	27
4.2.1. Βακτηριακό DNA.....	28
4.2.2. LPS-LBP-sCD14	28
5. ΤΑ ΦΥΣΙΚΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ.....	31
5.1. <i>Οι ντεφενσίνες</i>	32
5.2. <i>Η σύνθεση και τα γονίδια που κωδικοποιούν τις ντεφενσίνες</i>	34
5.3. <i>Ο τρόπος δράσης των ντεφενσινών</i>	36
5.4. <i>Η έκφραση και δράση των ντεφενσινών</i>	37
5.5. <i>Η έκφραση των ντεφενσινών στο γαστρεντερικό σωλήνα</i>	41
5.5.1. Οι α-ντεφενσίνες των κυττάρων Paneth.....	41
5.5.2. Οι β-ντεφενσίνες.....	43
5.6. <i>Οι ανθρώπινες ντεφενσίνες σε διάφορα συστήματα του οργανισμού</i>	44
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	46
1. ΣΚΟΠΟΣ	47
2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	48
2.1 <i>ΑΣΘΕΝΕΙΣ</i>	48
2.2 <i>ΜΕΘΟΔΟΙ</i>	49
2.2.1. Συλλογή των δειγμάτων.....	49
2.2.2. Μέτρηση της συγκέντρωσης της hBD-1 και του sCD14 με ELISA.....	49
2.2.3. Προσδιορισμός έκφρασης του mRNA των φυσικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων σε εντερικό ιστό.....	51
2.2.3.1. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων (RNA)	51
2.2.3.1.1. Ομογενοποίηση των ιστών.....	51
2.2.3.1.2. Απομόνωση του RNA.....	52
2.2.3.2. Μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA	52
2.2.3.3. Έλεγχος ποιότητας του RNA.....	53
2.2.3.4. Επεξεργασία του RNA με DNάση	54
2.2.3.5. Έλεγχος της καθαρότητας του RNA.....	54
2.2.3.5.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	54
2.2.3.5.2. Ηλεκτροφόρηση	55
2.2.3.6. Σύνθεση cDNA – αντίστροφη μεταγραφή.....	56
2.2.3.7. Πραγματικού χρόνου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Real – Time RT-PCR).....	57
2.2.4. Απομόνωση βακτηριακού DNA	58
2.2.5. Ανοσοϊστοχημεία	59
2.2.6. Καλλιέργεια ολικού αίματος.....	60
2.2.7. Ιστική καλλιέργεια	61
3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	62
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	63
4.1. <i>Χαρακτηριστικά των ασθενών</i>	63

4.2.	<i>Η διαλυτή hBD-1 είναι αυξημένη στους ασθενείς με κίρρωση του ήπατος.....</i>	64
4.3.	<i>Η hBD-1 στο πλάσμα σχετίζεται με τα επίπεδα του sCD14 στους κίρρωτικούς ασθενείς.....</i>	69
4.4.	<i>Η έκφραση του mRNA των φυσικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων στον τελικό ειλεό ή στο παχύ έντερο δεν μεταβάλλεται στους ασθενείς με κίρρωση του ήπατος.....</i>	75
4.5.	<i>Η έκφραση της HD-5 σε επίπεδο ιστού.....</i>	81
4.6.	<i>Αδυναμία ανίχνευσης του βακτηριακού DNA.....</i>	82
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	83
6.	ΣΥΝΟΨΗ.....	94
7.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	96
III.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	97
IV.	SUMMARY.....	100
V.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	102

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ήπαρ

Το ήπαρ αποτελεί ένα όργανο, του οποίου η αναγεννητική ικανότητα είχε επισημανθεί από την αρχαία εποχή με το μύθο του Προμηθέα. Πρόκειται για ένα όργανο, βάρους 1200-1500gr με βασική λειτουργική και ανατομική μονάδα το ηπατικό λόβιο, η δομή του οποίου επιτρέπει τη στενή επαφή των ηπατοκυττάρων με το αίμα που προσκομίζει η πυλαία φλέβα. Ιδιαιτερότητα του ήπατος είναι η διττή αιμάτωσή του μέσω τόσο της ηπατικής αρτηρίας, όσο και της πυλαίας φλέβας. Η πρώτη παρέχει αρτηριακό αίμα για τη θρέψη του οργάνου, ενώ η δεύτερη αθροίζει το φλεβικό αίμα από τον πεπτικό σωλήνα και το σπλήνα οδηγώντας το στο ήπαρ για περαιτέρω επεξεργασία. Η παροχέτευση του αίματος από το ήπαρ πραγματοποιείται μέσω των ηπατικών φλεβών προς την κάτω κοίλη φλέβα. [1]

Το ήπαρ αποτελεί ένα “βιοσυνθετικό εργαστήριο”, επιτελώντας πλήθος λειτουργιών, όπως:

- ✓ Σύνθεση πρωτεϊνών.
- ✓ Μεταβολικές διεργασίες των αμινοξέων (οξειδωτική απαμίνωση και τρανσαμίνωση).
- ✓ Μεταβολισμός των υδατανθράκων (γλυκόλυση, γλυκογονοσύνθεση, γλυκογονόλυση, νεογλυκογένεση)
- ✓ Μεταβολισμός των λιπιδίων.
- ✓ Χημικές μετατροπές των στεροειδών ορμονών (κορτικοειδή, οιστρογόνα, προγεστερόνη).
- ✓ Αδρανοποίηση και αποβολή της αμμωνίας.
- ✓ Μεταβολισμός των εξωγενών ουσιών μέσω του κυτοχρώματος P450 και της αναχθείσας γλουταθειόνης.

[1, 2]

Εξαιτίας του πλήθους των λειτουργιών που επιτελεί το ήπαρ, η διαταραχή της δομής του συνεπεία νοσημάτων που το προσβάλλουν έχει ως αποτέλεσμα έντονη κλινική συμπτωματολογία και πολυάριθμων επιπτώσεων στην εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού.

2. Κίρρωση του ήπατος

Η κίρρωση του ήπατος αποτελεί την τελική κατάληξη πολλών παθήσεων, όχι μόνο του ηπατικού παρεγχύματος αλλά και εξωηπατικών. (πίνακας 1) Ορίζεται ως μια διάχυτη διαδικασία που χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη ινώδους ιστού και τη μετατροπή της αρχιτεκτονικής του ηπατικού παρεγχύματος σε δομικά μη φυσιολογικούς αναγεννητικούς όζους.^[4] Η ηπατοκυτταρική νέκρωση και φλεγμονή είναι το αρχικό στάδιο της κίρρωτικής διεργασίας που ακολουθείται από ανάπτυξη συνδετικού ιστού, σχηματισμό ινώδων διαφραγματίων και έντονη αναγεννητική δραστηριότητα των κυττάρων που οδηγεί στο σχηματισμό όζων.

Ιστολογικά, η κίρρωση διακρίνεται σε:

- ✓ Μικροοζώδης, αν οι όζοι έχουν διάμετρο μικρότερη από 3mm, μεγαλοοζώδης, αν οι όζοι έχουν διάμετρο μεγαλύτερη από 3 mm και μεικτή, αν συνυπάρχουν και τα δύο είδη όζων σε περίπου ίση αναλογία.
- ✓ Τυπική ή άτυπη (ή «μετανεκρωτική»), ανάλογα με το μέγεθος και το σχήμα των αναγεννητικών όζων αλλά και την κατανομή του ουλώδους ιστού.
- ✓ Πυλαία ή χολική, ανάλογα με τον παθογενετικό μηχανισμό της κίρρωσης και τον τύπο της ίνωσης που αναπτύχθηκε στα αρχικά στάδια της νόσου.

Πίνακας 1. Αίτια της κίρρωσης [3]

Χρόνια ιογενής ηπατίτιδα	HCV HBV
Κατάχρηση αλκοόλ	
Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα	
Αυτοάνοση ηπατίτιδα	
Παθήσεις των χοληφόρων	Πρωτοπαθής χολική κίρρωση Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα Ατρησία των χοληφόρων στα παιδιά
Γενετικές παθήσεις	Ανεπάρκεια α ₁ -αντιθρυψίνης Αιμοχρωμάτωση Νόσος του Wilson Νοσήματα εναποθήκευσης του γλυκογόνου ή των λιπιδίων
Φάρμακα και τοξίνες	
Καρδιακή ανεπάρκεια ή απόφραξη των ηπατικών φλεβών	
Ιδιοπαθής (20%)	

Κλινικά, η κίρρωση διακρίνεται σε:

- **Αντιρροπούμενη.** Όταν δεν παρατηρείται ηπατοκυτταρική ανεπάρκεια ούτε σημεία πυλαίας υπέρτασης. Ο ασθενής μπορεί να είναι τελείως ασυμπτωματικός ή να έχει άτυπα συμπτώματα, όπως κακουχία, ανορεξία, πυρετός.
- **Μη αντιρροπούμενη κίρρωση.** Όταν εμφανίζονται τα σημεία της πυλαίας υπέρτασης με τις επακόλουθες επιπλοκές της κίρρωσης, όπως ίκτερος, ασκίτης, ηπατική εγκεφαλοπάθεια, γαστροοισοφαγικοί κίρσοι, ηπατονεφρικό σύνδρομο και ηπατοπνευμονικό σύνδρομο.

3. Πυλαία υπέρταση

Η πυλαία υπέρταση αποτελεί μία από τις πιο σοβαρές επιπλοκές της κίρρωσης του ήπατος. Η αναδιαμόρφωση του ηπατικού παρεγχύματος με την ανάπτυξη του ινώδους ιστού και των αναγεννητικών όζων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ενδοηπατικών αγγειακών αντιστάσεων, την αύξηση της πίεσης στην πυλαία κυκλοφορία και τελικά την ανάπτυξη παράπλευρης κυκλοφορίας και αγγειοδιαστολής, επηρεάζοντας τόσο την αιμάτωση όσο και την λειτουργία όλων των οργάνων. Στη συστηματική αγγειοδιαστολή, η καρδιά αποκρίνεται με αύξηση της καρδιακής παροχής με τελική κατάληξη την καρδιακή ανεπάρκεια, ενώ οι νεφροί αντιλαμβάνονται υποογκαιμία, υπόκεινται σε αγγειοσύσπαση και κατακρατούν νερό και νάτριο, με τελικό αποτέλεσμα το ηπατονεφρικό σύνδρομο. [5, 6, 7]

Η αύξηση των ενδοηπατικών αγγειακών αντιστάσεων με επακόλουθο την πυλαία υπέρταση, προκαλείται μεταξύ άλλων και από αλλαγές στην έκφραση διαφορών παραγόντων με τελικό αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων στο ήπαρ. Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει το ρόλο τόσο των αγγειοδιασταλτικών όσο και των αγγειοσυσταλτικών παραγόντων στην εκδήλωση της πυλαίας υπέρτασης. Στην ηπατική νόσο τελικού σταδίου έχει παρατηρηθεί μειωμένη παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) (αγγειοδιασταλτικός παράγοντας) από τα ηπατικά ενδοθηλιακά κύτταρα, εξαιτίας της αναστολής της ενδοθηλιακής συνθάσης του (eNOS) από μόρια που υπερεκφράζονται κατά την κίρρωση και εξαιτίας του αυξημένου οξειδωτικού stress στο οποίο υπόκεινται τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ αυξάνεται η έκφραση του NO εξωηπατικά στη συστηματική κυκλοφορία. [5, 8, 9, 10] Επιπροσθέτως, παρατηρείται ταυτόχρονη αύξηση των αγγειοσυσταλτικών παραγόντων, όπως της θρομβοξάνης A₂ (TXA₂) μέσω της δράσης της COX-1 [11] στα ενδοθηλιακά κύτταρα και της ενδοθηλίνης-1 (ET-1) που επιδρά στα HSCs. [5, 9, 12, 13] Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί και στο ρόλο των HSCs στο ινώδες ήπαρ, των οποίων η ενεργοποίηση υπόκειται σε πλήθος μεταγραφικών παραγόντων, όπως KLF6, BTEB, AP-1, NFκB, C/EBP, PPARγ. [14] Τα HSCs, ενώ σε κατάσταση ηρεμίας εκπληρώνουν τον αποθηκευτικό τους ρόλο για την βιταμίνη A, όταν ενεργοποιηθούν σε συνθήκες «τραυματισμού» του ήπατος, χαρακτηρίζονται από τον φαινότυπο του μυοϊνοβλάστη, προωθώντας την παραγωγή και

αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρίου θεμέλιας ουσίας και την ίνωση μέσω των TGF-β1 και PDGF [15, 16], και την αγγειογένεση, ενισχύοντας έτσι την αυξημένη πυλαία πίεση. Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει την παράλληλη ανάπτυξη ίνωσης και αγγειογένεσης στο κίρρωτικό ήπαρ και ως εκ τούτου την ανάπτυξη πυλαίας υπέρτασης. Τα ηπατικά ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω του TLR4^[17] και η επαγόμενη από την υποξία έκφραση του VEGF και του κολλαγόνου τύπου I καθώς και άλλων προ-αγγειογενετικών, όπως η αγγειοποιητίνη-1 (angiopoietin-1), και προ-ινωτικών μορίων στα ενεργοποιημένα HSCs ρυθμίζουν την αγγειογένεση και την επακόλουθη ίνωση. [18, 19, 20, 21]

4. Βακτηριακή αλλόθεση

Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί τα τελευταία χρόνια στα ρόλο της βακτηριακής αλλόθεσης στην παθοφυσιολογία της κίρρωσης. Η βακτηριακή αλλόθεση, η οποία ορίζεται ως η διαπήδηση των βακτηρίων ή των βακτηριακών προϊόντων από τον εντερικό σωλήνα στη συστηματική κυκλοφορία και εξωεντερικά, έχει χαρακτηριστεί τόσο ως αποτέλεσμα της πυλαίας υπέρτασης όσο και ως αίτιο της προαγωγής της, ανατροφοδοτώντας ένα φαύλο κύκλο στην εξέλιξη της ηπατικής νόσου τελικού σταδίου. Έχει ενοχοποιηθεί όχι μόνο ως προδιαθεσικός παράγοντας για την εμφάνιση λοιμώξεων (ουροποιητικού, κατώτερου αναπνευστικού) στους κίρρωτικούς ασθενείς, με πιο σοβαρή και απειλητική την αυτόματη βακτηριακή περιτονίτιδα, αλλά και για την συμμετοχή της άμεσα ή έμμεσα σε άλλες σοβαρές επιπλοκές της κίρρωσης, όπως οι γαστροοισοφαγικοί κίρσοι [22], η ηπατική εγκεφαλοπάθεια [23, 24], το ηπατονεφρικό σύνδρομο. [25, 26]

Παρά τον κομβικό ρόλο της βακτηριακής αλλόθεσης στην εξέλιξη της ηπατικής νόσου τελικού σταδίου, ο ακριβής μηχανισμός που την προκαλεί δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Μεταξύ των προτεινόμενων παθογενετικών μηχανισμών διακρίνονται η βακτηριακή υπερανάπτυξη στο λεπτό έντερο (SIBO) [27, 28], οι αλλαγές στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου [29, 30] και η αυξημένη εντερική διαπερατότητα λόγω δυσλειτουργίας του επιθηλιακού φραγμού του εντέρου [31, 32]. Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί και στην τροποποιημένη ανοσολογική απόκριση των κίρρωτικών ασθενών, η οποία χαρακτηρίζεται από

την ελαττωμένη δραστηριότητα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, τη μειωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα των κυττάρων του Kupffer, καθώς και την περιορισμένη συγκέντρωση των λευκοκυττάρων ως απάντηση στη φλεγμονή εξαιτίας της σπλαγχνικής υπεραιμίας συνεπεία της πυλαίας υπέρτασης. [33,34,35, 36]

4.1. Αυτόματη βακτηριακή περιτονίτιδα

Όπως προαναφέρθηκε, η βακτηριακή αλλόθεση προδιαθέτει στην ανάπτυξη της αυτόματης βακτηριακής περιτονίτιδας (spontaneous bacterial peritonitis-SBP), μία από τις σοβαρότερες λοιμώξεις των κίρρωτικών ασθενών με υψηλή θνησιμότητα.

Η διάγνωση τίθεται με την ύπαρξη >250 πολυμορφοπύρηνων/ mm^3 (μεγαλύτερη ευαισθησία) ή >500 πολυμορφοπύρηνων/ mm^3 (μεγαλύτερη ειδικότητα) στο ασκитικό υγρό, ακόμα κι όταν οι καλλιέργειες αίματος και ασκитικού υγρού είναι αρνητικές. Προκαλείται στο μεγαλύτερο ποσοστό (60%), από Gram αρνητικά μικρόβια, κυρίως *E.coli* και *Klebsiella*. Η παρουσία ενός είδους μικροβίου στο ασκитικό υγρό επιβεβαιώνει τη διάγνωση, ενώ η ύπαρξη περισσότερων κατευθύνει προς την πιθανότητα δευτεροπαθούς περιτονίτιδας. Δεδομένου των άτυπων κλινικών της συμπτωμάτων, όπως πυρετός, κοιλιακό άλγος, διαρροϊκών κενώσεων και σπανιότερα σημεία ηπατικής εγκεφαλοπάθειας και της υψηλής θνησιμότητας, η έγκαιρη διάγνωση και η έναρξη αντιβιοτικής αγωγής ακόμη και σε υποψία SBP είναι επιβεβλημένη. [37, 38]

4.2. Δείκτες βακτηριακής αλλόθεσης

Λαμβάνοντας υπόψιν τις σοβαρές επιπλοκές, καθώς και τη νοσηρότητα και θνησιμότητα που συνοδεύουν την βακτηριακή αλλόθεση, η ανάγκη ανεύρεσης δεικτών πρώιμης διάγνωσης της για την αναγνώριση των ασθενών υψηλού κινδύνου και την πρόληψη των επιπλοκών καθιστάται επιβεβλημένη. Προς τη συγκεκριμένη κατεύθυνση, είχε στραφεί το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών

ομάδων και ανάμεσα στους δείκτες βακτηριακής αλλόθεσης που έχουν προταθεί, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν το βακτηριακό DNA (bacterial DNA - bDNA), ο λιποπολυσακχαρίτης (lipopolysaccharide - LPS), η πρωτεΐνη που προσδένει το LPS (lipopolysaccharide binding protein - LBP), το διαλυτό CD14 (soluble CD14 - sCD14), ενώ μερικές μελέτες αναφέρονται και στον ρόλο της καλπροτεκτίνης και της προκαλσιτονίνης, αν και τα αποτελέσματά τους είναι αντικρουόμενα.

4.2.1.Βακτηριακό DNA

Το βακτηριακό DNA αποτελεί έναν από τους προτεινόμενους και πιο μελετημένους δείκτες βακτηριακής αλλόθεσης. Πολλές μελέτες τόσο σε ζωικά μοντέλα όσο και σε ανθρώπινο πληθυσμό με τελικού σταδίου ηπατική νόσο, έχουν απομονώσει το bDNA στους μεσεντέριους λεμφαδένες, στο περιφερικό αίμα και στο ασκитικό υγρό ακόμη κι αν οι καλλιέργειες ήταν αρνητικές. [39, 40, 41] Αντιθέτως πολλές ερευνητικές ομάδες καταγράφουν τη δυσκολία της ανίχνευσης του 16S ριβοσωμικού RNA στο περιφερικό αίμα. [42] Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις τεχνικές δυσκολίες και τις διαφορετικά αποτελέσματα των ερευνών, η χρησιμότητα του bDNA ως δείκτη βακτηριακής αλλόθεσης καθιστάται επισφαλής.

4.2.2.LPS-LBP-sCD14

Πολλά υποσχόμενοι δείκτες βακτηριακής αλλόθεσης αποτελούν τα μόρια του συμπλόκου LPS-LBP-sCD14, τα οποία εκφράζουν άμεσα ή έμμεσα την παρουσία στον οργανισμό gram (-) (negative, αρνητικών) μικροβίων. Τα gram (-) βακτήρια έχουν στο εξωτερικό τοίχωμά τους, το λιποπολυσακχαρίτη (LPS) ή ενδοτοξίνη, η παρουσία του οποίου διεγείρει διάφορα κύτταρα και οδηγεί σε αυξημένη έκφραση κυτταροκινών και προφλεγμονωδών μορίων. Στην κυκλοφορία, αναγνωρίζεται από την LBP, η οποία αποτελεί μία πρωτεΐνη οξείας φάσης, μοριακού βάρους 65 kDa, και παράγεται από τα ηπατικά κύτταρα και από τα κύτταρα του πνεύμονα. Το σύμπλοκο LPS-LBP προσδένεται στο

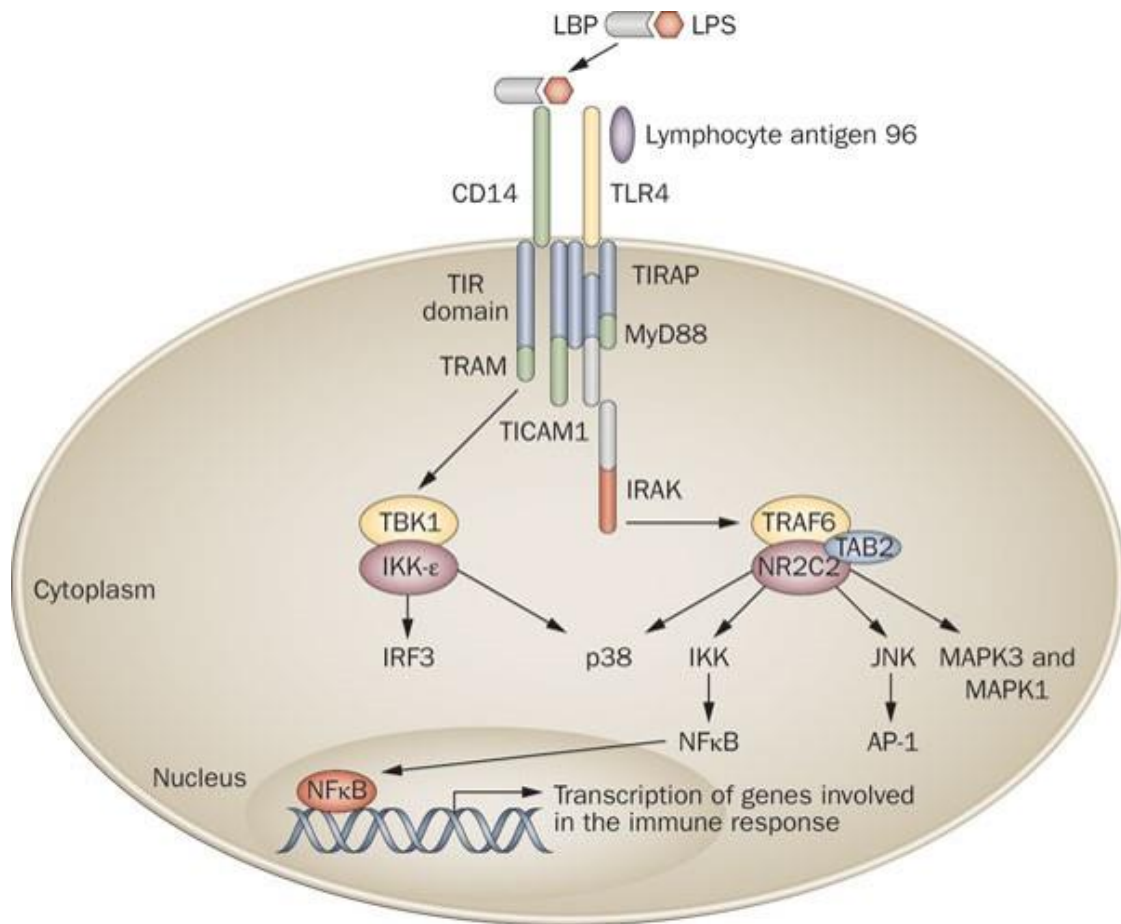
μεμβρανικό CD14 (mCD14) στα μυελοειδή κύτταρα ή στο διαλυτό CD14 (sCD14) στα κύτταρα που δεν εκφράζουν τη μεμβρανική μορφή του μορίου^[43, 44, 45, 46] και προωθεί έναν καταρράκτη φλεγμονωδών απαντήσεων με την ενεργοποίηση του NF-κΒ μέσω των MD-2/TLR4 (εικόνα 1)^[47, 48, 49, 50]. Μέσω αυτού του μονοπατιού ενισχύεται και η διαδικασία της ίνωσης.^[51] Ο Dziarski et al υποστηρίζαν επίσης την υπόθεση ότι στο CD14 εκτός από το LPS προσδένονται κι άλλες ουσίες όπως η πεπτιδογλυκάνη-PGN, η οποία ενεργοποιεί τα μακροφάγα και προέρχεται από τα Gram (+) βακτήρια. Η PGN προσδένεται τόσο στον διαμεμβρανικό όσο και στον διαλυτό CD14 με υψηλή συγγένεια.^[52]

Το LPS είναι ένα από τα πρώτα μόρια που έχουν χαρακτηριστεί ως άμεσος δείκτης βακτηριακής αλλόθεσης, αφού η ανίχνευσή του υποδηλώνει βακτηριαιμία από gram (-) μικρόβια. Αν και έχει προταθεί ότι η παρουσία του LPS μέσω των μονοπατιών που ενεργοποιεί προάγει τη διαδικασία της ίνωσης^[51] και μπορεί να χρησιμεύσει ως προγνωστικός παράγων της σοβαρότητας της νόσου^[53] οι υπάρχουσες μελέτες αναφέρουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τη συσχέτιση του LPS με το στάδιο της ηπατικής νόσου.^[53, 54, 55, 56] Η ανίχνευση του LPS στην κυκλοφορία παρουσιάζει δυσκολίες τόσο εξαιτίας πλήθους παραγόντων που την επηρεάζουν, όσο και εξαιτίας του μικρού χρόνου ημίσειας ζωής του.^[25] Οι ανωτέρω περιορισμοί εμποδίζουν την ευρεία χρήση του ως διαγνωστικό δείκτη βακτηριακής αλλόθεσης, αφού ακόμα και παρουσία μικροβιαϊμίας, μπορούν να προκύψουν υψηλά ποσοστά ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.

Ένας άλλος έμμεσος δείκτης βακτηριακής αλλόθεσης που έχει μελετηθεί είναι η LBP, καθώς η έκφρασή της αποτελεί απάντηση στην παρουσία LPS και κατά συνέπεια gram (-) μικροβίων. Οι Albillos et al αναφέρουν ότι υψηλά επίπεδα της LBP στην κυκλοφορία σχετίζονται με αιμοδυναμική αποσταθεροποίηση των κίρρωτικών ασθενών και τους καθιστούν πιο επιρρεπείς στις λοιμώξεις, ενώ ταυτόχρονα η ανίχνευσή της μετά από βακτηριαιμία συνεχίζεται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε αντίθεση με το LPS^[57, 58]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί επίσης η συσχέτιση της LBP και του sCD14 στους ασθενείς με τελικού σταδίου ηπατική νόσο^[56, 57], αλλά και η αδυναμία ανίχνευσης του LPS σε μεγάλο ποσοστό αυτών των ασθενών^[57] γεγονός που υποδηλώνει ότι πλήθος ασθενών με ενδοτοξιναιμία θα παρέμεναν αδιάγνωστοι βάσει των επιπέδων του LPS. Η

αύξηση της LBP σε οποιαδήποτε συστηματική λοίμωξη από gram(-) μικρόβια και κατα συνέπεια η ύπαρξη ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, περιορίζει τη χρησιμότητά της ως ειδικού δείκτη βακτηριακής αλλόθεσης .

Ιδιαίτερα υποσχόμενος έμμεσος δείκτης βακτηριακής αλλόθεσης φαίνεται να είναι ο τελικός στόχος του συμπλέγματος LPS-LBP, το sCD14, μία γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 55 kDa, της οποίας η έκφραση ενισχύεται παρουσία του LPS. [59, 60] Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν τονίσει τη συσχέτιση της συγκέντρωσης του sCD14 με την πρόοδο της ηπατικής νόσου και την πιθανή χρησιμότητά του ως προγνωστικού δείκτη εξέλιξης της χρόνιας ηπατοπάθειας. Η αυξημένη έκφραση του sCD14 στην ηπατική νόσο ανεξάρτητα από την αιτιολογία της ηπατοπάθειας (HBV, HCV, αλκοολική, NAFLD, HIV) έχει ανευρεθεί όχι μόνο στο περιφερικό αίμα, αλλά και τοπικά στο ήπαρ, όπως φαίνεται από τα θετικά σε CD14 ηπατικά κύτταρα. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η βακτηριακή αλλόθεση, εμμέσως διαγνωσμένη από την παρουσία του sCD14, κατέχει κεντρικό ρόλο στην εξέλιξη της ηπατικής νόσου. [56, 61, 62, 63, 64, 65] Η ανίχνευσή του στο περιφερικό αίμα γίνεται εύκολα με ευρέως χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές μεθόδους και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή κλινική πράξη μετά την τεκμηρίωση της διαγνωστικής του αξίας καθώς και της ευαισθησίας και ειδικότητάς του.



Εικόνα 1: Το μονοπάτι ενεργοποίησης μέσω των LPS-LBP-CD14.

Παριστάνεται η σύνδεση του LPS με την LBP και ακολούθως με το CD14 και ο υποκείμενος καταρράκτης ενεργοποίησης των προφλεγμονωδών μορίων. [66]

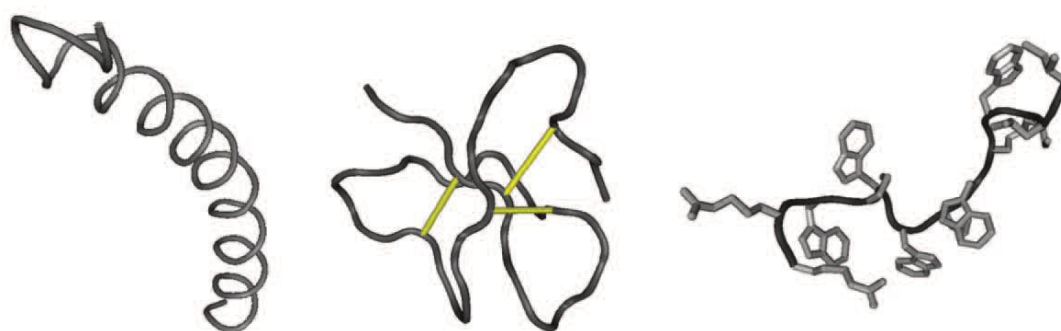
5. Τα φυσικά αντιμικροβιακά πεπτίδια

Τα φυσικά αντιμικροβιακά πεπτίδια είναι πολυπεπτίδια, τα οποία ανήκουν στη φυσική ανοσία του οργανισμού και σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις ασκούν αντιμικροβιακή δράση έναντι μικροβίων. Στους ανθρώπους και στα θηλαστικά, οι δύο κύριες κατηγορίες αντιμικροβιακών πεπτιδίων είναι οι ντεφενσίνες (defensins) και η καδελιχιδίνη (cathelicidin LL37 ή hCAP-18).

Οι ντεφενσίνες αποτελούν μία οικογένεια κατιονικών πεπτιδίων με ευρεία δράση έναντι πολλών gram (+) και gram (-) μικροβίων, ιών και μυκήτων.

Παράγονται, όπως και η καδελιχιδίνη LL37, κυρίως από λευκοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα. [67, 68]

Ανάλογα με τη δομή τους, τα αντιμικροβιακά πεπτίδια χωρίζονται σε: 1) πεπτίδια με ευθεία α -έλικα που δε φέρουν υπολείμματα κυστεΐνης, 2) πεπτίδια με σφαιρική δομή β -φύλλου που σταθεροποιούνται με ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς, 3) πεπτίδια με αφθονία ορισμένων αμινοξέων, όπως ιστοιδίνη, γλυκίνη, προλίνη ή τρυπτοφάνη. (εικόνες 2 και 3) [68]



Εικόνα 2: Οι τρεις βασικές δομικές κατηγορίες αντιμικροβιακών πεπτιδίων.

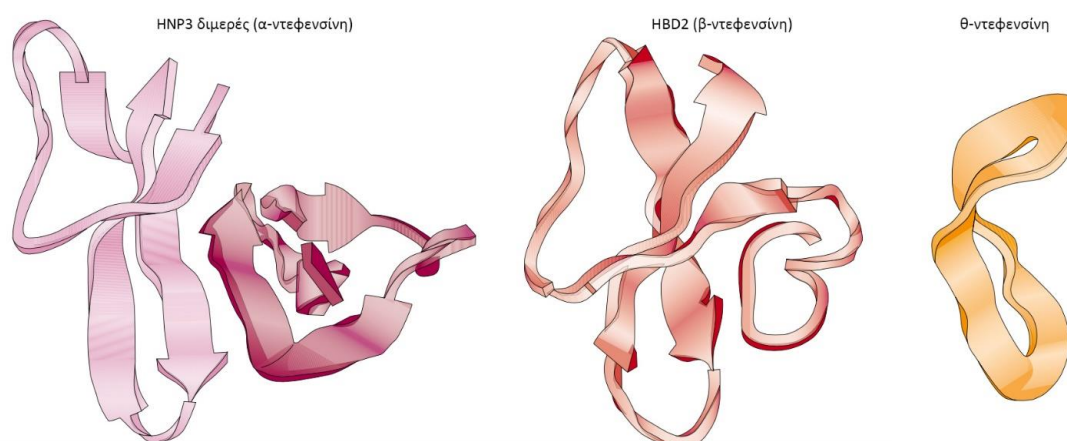
Αριστερα: η ανθρώπινη cathelicidin LL-37 με δομή α -έλικας. Στη μέση: η ανθρώπινη hBD-2 που σταθεροποιείται με τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς που φαίνονται με κίτρινο χρώμα. Δεξιά: η βόεια indolicidin που είναι πλούσια σε τρυπτοφάνη. [68]

5.1. Οι ντεφενσίνες

Οι ανθρώπινες ντεφενσίνες (defensins) ανήκουν στα φυσικά αντιμικροβιακά πεπτίδια και αποτελούν μία οικογένεια πεπτιδίων 29-45 αμινοξέων (στην πλειονότητά τους κατιονικά αμινοξέα, όπως η λυσίνη και η αργινίνη) με μοριακό βάρος 3-5 kDa. Φέρουν χαρακτηριστική δομή β -φύλλου (β -sheet rich) και ένα πλαίσιο από 6 κυστεΐνες που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς.

Οι ντεφενσίνες χωρίζονται σε 2 οικογένειες: τις α-ντεφενσίνες (α-defensins) και τις β-ντεφενσίνες (β-defensins), οι οποίες διαφοροποιούνται ανάλογα με τις κυστεΐνες που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι φαίνεται να προσφέρουν σταθερότητα στα πεπτίδια και αυξημένη αντίσταση στην πρωτεόλυση. Συγκεκριμένα, στις α-ντεφενσίνες οι κυστεΐνες που ενώνονται είναι 1-6, 2-4, 3-5, ενώ στις β-ντεφενσίνες είναι οι 1-5, 2-4, 3-6. Επειδή οι κυστεΐνες 5 και 6 είναι γειτονικές, οι δύο υποοικογένειες ομοιάζουν σημαντικά δομικά. (εικόνα 4)

Οι α-ντεφενσίνες αποτελούνται από τις τέσσερις α-ντεφενσίνες των ουδετερόφιλων (human neutrophil peptides - HNP1-4) και από τις δύο εντερικές α-ντεφενσίνες (human defensins -5 & -6, HD-5 & HD-6), οι οποίες παράγονται από τα κύτταρα Paneth του λεπτού εντέρου. Οι β-ντεφενσίνες αποτελούνται από τέσσερα μέλη (human beta defensins 1-4, hBD-1-4), οι οποίες παράγονται κυρίως από φαγοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα. Υπάρχει και η υποοικογένεια των θ-ντεφενσινών (θ-defensins), η οποία διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από τις άλλες. Η ώριμη μορφή παράγει ένα κυκλικό πεπτίδιο, το οποίο έχει απομονωθεί μόνο στα λευκοκύτταρα του πιθήκου rhesus macaque. Στον άνθρωπο το γονίδιο είναι απενεργοποιημένο εξαιτίας μεταλλάξεων που κωδικοποιούν πρόωρα κωδικόνια τερματισμού. [67, 68, 69]



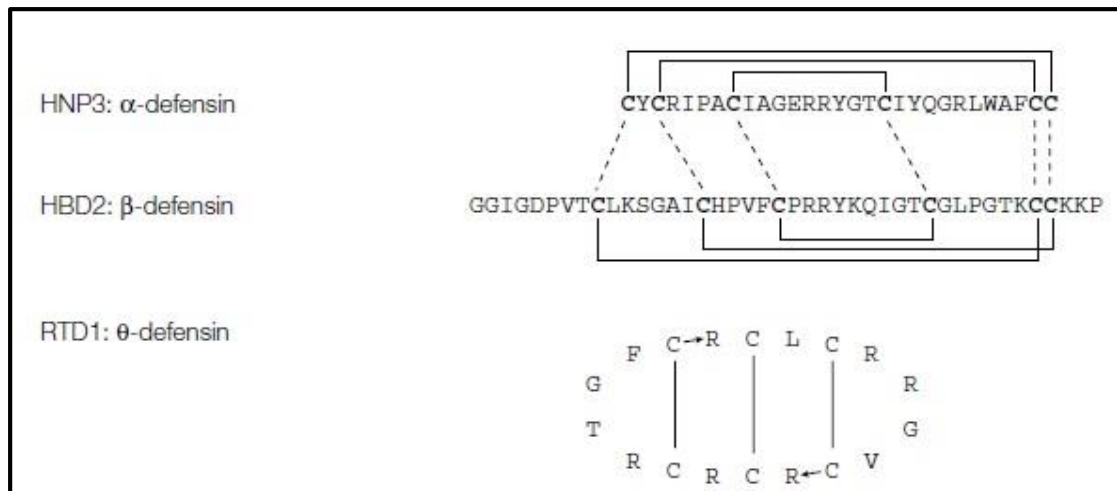
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των ντεφενσινών.

Αριστερα: η ντεφενσίνη 3 των ουδετερόφιλων (HNP-3) απεικονίζεται ως διμερές, πλούσιο σε β-φύλλα (β-sheet-rich dimer).

Στη μέση: η ανθρώπινη hBD-2, η οποία απεικονίζεται ως μονομερές.

Δεξιά: η θ-defensin, η οποία είναι κυκλική και αποτελείται από ένα απλό β-φύλλο.

Τροποποίηση από Wiesner J, Virulence, 2010 [68]



Εικόνα 4: Αλληλουχία και δισουλφιδικοί δεσμοί των α -, β - και θ -defensins.

Οι κυστεΐνες των α - και β -defensins που αντιστοιχούν σημειώνονται με διακεκομμένες γραμμές, ενώ οι δισουλφιδικοί δεσμοί με συνεχείς γραμμές. Η δομή των θ -κυστεϊνών είναι κυκλική χωρίς ελεύθερο αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό άκρο, ενώ διαφέρουν και οι δισουλφιδικοί δεσμοί τους. (HNP3 \rightarrow human neutrophil peptide 3, HBD2 \rightarrow human β -defensin 2, RTD1 \rightarrow rhesus θ -defensin) [67]

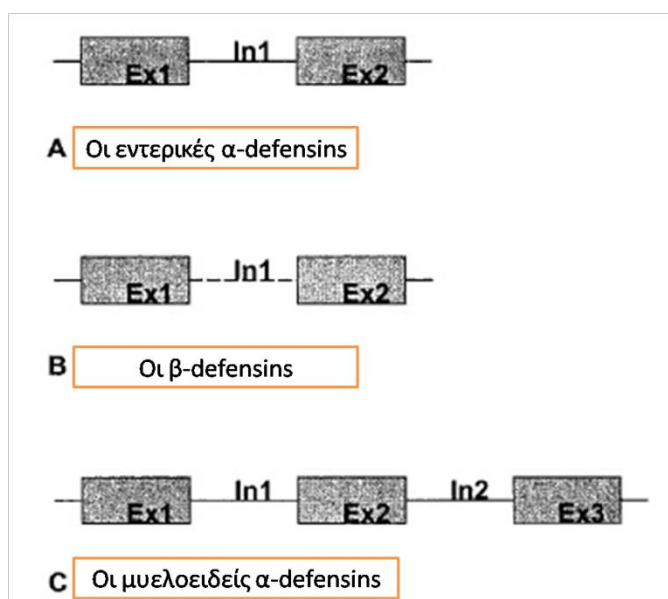
5.2. Η σύνθεση και τα γονίδια που κωδικοποιούν τις ντεφενσίνες

Οι α - και β - ανθρώπινες ντεφενσίνες κωδικοποιούνται από οκτώ τουλάχιστον γονίδια που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 8p23 και παράγονται άλλες ιδιοσυστασιακά κι άλλες κατόπιν φλεγμονής ή λοίμωξης. Τόσο οι α - όσο και οι β - ντεφενσίνες κωδικοποιούνται υπό τη μορφή πρόδρομου πεπτιδίου με την κατιονική ώριμη ντεφενσίνη να βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο, όπως φαίνεται στον πίνακα 2. [67]

Πίνακας 2. Αλληλουχίες των ντεφενσινών ^[67]			
Ντεφενσίνες	Σηματοδοτική αλληλουχία	Ανιονικό τμήμα	Ώριμο πεπτίδιο
α-ντεφενσίνες	αμινοτελική, ~19aa	~45aa	καρβοξυτελικό, ~30aa
β-ντεφενσίνες	ναι	μικρό ή καθόλου	καρβοξυτελικό

Όπου aa : αμινοξέα.

Η δομή των γονιδίων των ντεφενσινών παρουσιάζει ομοιότητα μεταξύ των εντερικών α -ντεφενσινών και των β -ντεφενσινών, όπως παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 5 και περιγράφεται στον πίνακα 3. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλούν οι διαφορές στο μέγεθος των ιντρονίων ανάλογα με το αν η έκφραση της ντεφενσίνης είναι επαγόμενη, όπως της hBD-2 και σε αυτή την περίπτωση το ιντρόνιο είναι 2 kb ή αν η έκφραση είναι ιδιοσυστασιακή, όπως της hBD-1 και το ιντρόνιο είναι 10 kb. [70]



Εικόνα 5: Η δομή των γονιδίων των ντεφενσινών.

Όπου Ex: το εξόνιο και In: το ιντρόνιο.

Τροποποίηση από Cunliffe RN et al, *J Leukoc Biol*, 2004 [70]

Οι ουδετεροφιλικές α -ντεφενσίνες (HNP 1-4) συντίθενται ιδιοσυστασιακά στο μυελό των οστών στα πρόδρομα κύτταρα των ουδετερόφιλων, τα προμυελοκύτταρα. Τα ώριμα ουδετερόφιλα που κυκλοφορούν στο αίμα ή βρίσκονται στους ιστούς είναι γεμάτα από ντεφενσίνες, αλλά δεν μπορούν να τις συνθέσουν εκ νέου ούτε υπό μορφή πεπτιδίων ούτε υπό μορφή mRNA.

Οι εντερικές α -ντεφενσίνες 5 και 6 (HD-5 και HD-6) συντίθενται πιθανώς ιδιοσυστασιακά, αποθηκεύονται και εκκρίνονται κατόπιν μικροβιακής διέγερσης από τα κύτταρα του Paneth του εντέρου. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στη μετατροπή του πρόδρομου μορίου της HD-5 σε ώριμη μορφή είναι οι τρεις μορφές της θρυψίνης που παράγονται από τα ίδια τα κύτταρα του Paneth.

Πίνακας 3. Η δομή των γονιδίων των ντεφενσινών^[70]

Ντεφενσίνες	Αριθμός εξωνίων	Εξώνιο 1	Εξώνιο 2	Εξώνιο 3	Ιντρόνια
HNP1-4	3	5-αμετάφραστη περιοχή	Σηματοδοτική αλληλουχία και προπεπτίδιο	Ώριμο πεπτίδιο	2
HD-5, -6	2	5-αμετάφραστη περιοχή, σηματοδοτική αλληλουχία, προπεπτίδιο	Ώριμο πεπτίδιο	-	1
β-ντεφενσίνες	2	5-αμετάφραστη περιοχή, σηματοδοτική αλληλουχία, προπεπτίδιο	Ώριμο πεπτίδιο	-	1

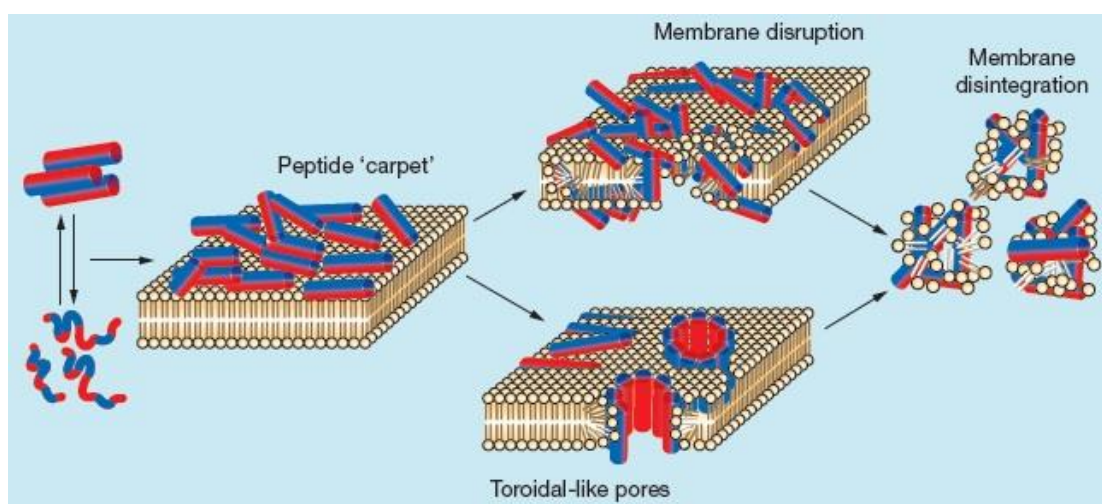
Από τις β-ντεφενσίνες, η β1-ντεφενσίνη (*hBD-1*) φαίνεται να παράγεται ιδιοσυστασιακά από διάφορα επιθηλιακά κύτταρα. Η σύνθεση της β2-ντεφενσίνης (*hBD-2*) είναι επαγόμενη από την παρουσία μικροοργανισμών. Η *hBD-2* περιέχει θέσεις αναγνώρισης πυρηνικών παραγόντων, αφού η επαγωγή του mRNA της *HBD-2* είναι εξαρτώμενη από τον πυρηνικό παράγοντα -κΒ (NF-κΒ). Οι β3- και β4- ντεφενσίνες (*hBD-3* και *hBD-4* αντίστοιχα) δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς, αλλά ρυθμίζονται από μηχανισμούς ανεξάρτητους από τον NF-κΒ. [67, 70]

5.3. Ο τρόπος δράσης των ντεφενσινών

Οι ντεφενσίνες θεωρείται ότι ασκούν την αντιμικροβιακή τους δράση, όπως κι άλλα κατιονικά πεπτίδια, διασπώντας την ακεραιότητα της μικροβιακής μεμβράνης πιθανώς μέσω ενός μηχανισμού που είναι γνωστός ως «Shai-Matsuzaki-Huang model» (εικόνα 6). Οι βακτηριακές κυτταρικές μεμβράνες είναι αρνητικά φορτισμένες εξαιτίας της σύνθεσής τους από μεγάλο ποσοστό όξινων φωσφολιπιδίων, όπως η φωσφατιδυλογλυκερόλη και η καρδιολιπίνη, τα οποία δίνουν ένα αρνητικό φορτίο στην επιφάνεια του κυττάρου. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, οι ντεφενσίνες εξαιτίας του θετικού τους φορτίου αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με αυτές τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες φωσφολιπιδίων της εξωτερικής μεμβράνης των μικροβιακών κυττάρων

στόχων. Συναθροίζονται, λοιπόν, στην επιφάνεια της μεμβράνης και ενσωματώνονται ανάμεσα στις ομάδες των φωσφολιπιδίων, προκαλώντας τάση στη λιπιδιακή διπλοστιβάδα της μεμβράνης. Έτσι, η επιφανειακή περιοχή της εξωτερικής μεμβράνης διαστέλλεται σχετικά με το εσωτερικό φύλλο, ενώ τελικά η τάση εξαλείφεται καθώς τα πεπτίδια μετακινούνται κατά μήκος της μεμβράνης, προκαλώντας ή τη διάσπασή της ή τη δημιουργία πόρων (toroidal pores). Τελικά, η μεμβράνη διασπάται για να σχηματιστούν μικύλλια.

Οι ντεφενσίνες δρουν εκλεκτικά εναντίων των βακτηρίων και δεν προσβάλλουν τα κύτταρα του ξενιστή εξαιτίας και της διαφορετικής σύνθεσης των κυτταρικών μεμβρανών των ευκαρυωτικών κυττάρων που δεν φέρουν σχεδόν καθόλου φορτίο στην επιφάνειά τους, αφού τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια κατανέμονται στο εσωτερικό της λιπιδιακής διπλοστιβάδας. [68, 71]



Εικόνα 6: «*Shai-Matsuzaki-Huang model*» [71]

5.4. Η έκφραση και δράση των ντεφενσινών

Οι ντεφενσίνες ανήκουν στην έμφυτη φυσική ανοσία του οργανισμού για την καταπολέμηση λοιμώξεων και εκφράζονται από διάφορους ιστούς κατόπιν φλεγμονής ή λοίμωξης, ενώ άλλες ιδιοσυστασιακά.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα ιδιοσυστασιακώς εκφραζόμενης ντεφενσίνης σε επιθηλιακά κύτταρα ποικίλων ιστών αποτελεί η *hBD-1*. Εντούτοις, πολλές μελέτες αναφέρονται και στην επαγωγή της, ακόμα και σε μικρό βαθμό, τόσο από μικροβιακά προϊόντα (όπως το LPS) στο δέρμα [72] όσο και από αμινοξέα σε καρκινικά κύτταρα στο κόλον μέσω του c-myc μονοπατιού [73, 74], αν και ο ακριβής μηχανισμός της επαγωγής της *hBD-1* δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Επιπλέον, εκτός από τα επιθηλιακά κύτταρα, η *hBD-1* φαίνεται να αποθηκεύεται και στα αιμοπετάλια, ενώ η διέγερσή τους από μικροβιακά προϊόντα προκαλεί την απελευθέρωσή της. [75]

Αντιθέτως, η *hBD-2* ανήκει στην κατηγορία των επαγόμενων ντεφενσινών και πολλές είναι οι ερευνητικές ομάδες που έχουν ασχοληθεί με το μοριακό μονοπάτι ενεργοποίησής της. Η έκφρασή της έχει δείχθει ότι εξαρτάται από την παρουσία βακτηριακών προϊόντων, όπως το LPS και η PGN, ή/και προφλεγμονωδών κυτταροκινών και αφορά σε επιθηλιακά κύτταρα πολλών συστημάτων του οργανισμού μεταξύ των οποίων το γαστρεντερικό, το αναπνευστικό, το ουροποιητικό σύστημα, το δέρμα. Το πιο γνωστό βιολογικό μονοπάτι που ελέγχει την έκφρασή της είναι του NF-κB, αλλά έχει συσχετιστεί και με εκείνο των MAP κινασών. [73, 76] Επιπλέον, σύμφωνα με τους E. Voss et al, η επαγωγή της *hBD-2* διαμεσολαβείται από το NOD2. Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η ενεργοποίηση του NOD2 με MDP σε κυτταρική σειρά ανθρώπινων νεφρικών κυττάρων που υπερεκφράζουν το NOD2, επάγει την έκφραση της *hBD-2*, ενώ η υπερέκφραση του NOD2 που περιέχει την μετάλλαξη 3020insC, την πιο συχνή μετάλλαξη στη νόσο του Crohn, έχει ως αποτέλεσμα ελαττωμένη επαγωγή της *hBD-2*. [77] Επιπλέον, σύμφωνα με τους P. Vora et al, ο υποκινητής της *HBD-2* ενεργοποιείται μέσω των TLR4 και TLR2 υποδοχέων σε εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, οι οποίοι διεγείρονται από το LPS και την πεπτιδογλυκάνη αντίστοιχα. [78] Η επαγωγή της έκφρασης της *hBD-2* έχει ως αποτέλεσμα την αντιμικροβιακή της δράση, καθώς, η συγκεκριμένη ντεφενσίνη ασκεί τόσο βακτηριοκτόνο, όπως στην περίπτωση των *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* και *Candida albicans*, όσο και βακτηριοστατική, όπως έναντι του *Staphylococcus aureus*, δράση. [71]

Μία ακόμη επαγόμενη ντεφενσίνη είναι η *hBD-3*, της οποίας η έκφραση φαίνεται να εξαρτάται από τα MAPK/p38 και EGFR/ERK μοριακά μονοπάτια. Η σύνθεσή

της από τα επιθηλιακά κύτταρα ενισχύεται από την παρουσία βακτηριακών προϊόντων, όπως το LPS και η PGN, σε διάφορα όργανα ανάμεσα στους οποίους ο στόμαχος (*H. Pylori*), ο οισοφάγος (*C. Albicans*) και το δέρμα (*S. Aureus*). [72, 73, 76, 79]

Από τις μυελοειδείς α-ντεφενσίνες, η έκκριση της *HNP-1* φαίνεται να εξαρτάται από το NOD2, κατόπιν διέγερσής του από το MDP [80], ενώ όλες οι HNPs έχουν συσχετιστεί με με την αντική δραστηριότητα των CD8+ T κυττάρων των ασθενών-φορέων του HIV χωρίς, όμως, να έχει διευκρινιστεί ακριβώς ο τρόπος δράσης τους. [67] Οι εντερικές α-ντεφενσίνες και ειδικότερα η *HD-5* έχουν δράση εναντίον αρκετών παθογόνων μικροοργανισμών, όπως ενδεικτικά η *Listeria monocytogenes*, το *Escherichia coli*, η *Salmonella Typhimurium* και ο μύκητας *Candida albicans*. [71]

Ο ρόλος των ντεφενσινών στην καταπολέμηση των λοιμώξεων καταδεικνύεται επίσης και από την αυξημένη επιρρέπεια στις λοιμώξεις ασθενών με υπολειμματική δράση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων, όπως χαρακτηριστικά συμβαίνει στους ασθενείς με κυστική ίνωση. Οι υψηλές συγκεντρώσεις άλατος στις αναπνευστικές εκκρίσεις αναστέλλουν τη δράση των ντεφενσινών, οι οποίες είναι ευαίσθητες στο άλας, με αποτέλεσμα αυξημένο ποσοστό αναπνευστικών λοιμώξεων. [67]

Έκτος, όμως, από την αντιμικροβιακή τους δράση, έμφαση έχει δοθεί και στην χημειοτακτική ικανότητα των ντεφενσινών σε ορισμένες ομάδες κυττάρων, όπως τα δενδριτικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα ενεργοποιώντας πλήθος ανοσολογικών αποκρίσεων. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα των β-ντεφενσινών, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τον CCR6 υποδοχέα. [81] Παρά την ευεργετική τους δράση στην καταπολέμηση των λοιμώξεων, έχει επισημανθεί ότι η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ντεφενσινών στους ιστούς ενεργοποιεί επίσης και φλεγμονώδεις διεργασίες που καταλήγουν σε ιστικό τραυματισμό. [67]

Έκτος από τον άνθρωπο, ανάλογα των ντεφενσινών πεπτίδια ανευρίσκονται και σε άλλα ζωικά είδη. Επιγραμματικά, ντεφενσίνες ανευρίσκονται και στους μύες, στους επιμύες, στους λαγούς, όπως φαίνεται και στον πίνακα 4, κι ακόμα και στο δηλητήριο των φιδίων υπάρχουν πεπτίδια που ομοιάζουν με ντεφενσίνες. Οι ανθρώπινες ντεφενσίνες και οι αντίστοιχες στους μύες, καθώς

και η έκφρασή τους στο γαστρεντερικό σύστημα και των δύο ειδών φαίνονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 4. Οι ντεφενσίνες σε διάφορα ζωικά είδη^[67]

Είδη	Ντεφενσίνες των ουδετερόφιλων	Εντερικές α-ντεφενσίνες	Ντεφενσίνες από επιθηλιακά κύτταρα
Άνθρωπος	α	α	α και β
Rhesus πίθηκος	α και θ	αδιευκρίνιστο	β
Μυς	-	α	α και β
Επιμύς	α	α	β
Αγελάδα	β	-	β

Τροποποίηση από Ganz T, *Nat Rev Immunol*, 2003

Πίνακας 5. Ντεφενσίνες στον άνθρωπο και στους μύες^[70]

Ανθρώπινες Ντεφενσίνες	Ανάλογα ντεφενσινών στους μύες	Έκφραση στο γαστρεντερικό σύστημα στον άνθρωπο	Έκφραση στο γαστρεντερικό σύστημα στους μύες
HD-5 HD-6	Cryptdins 1-6	Κύτταρα του Paneth	Κύτταρα του Paneth
hBD-1	mBD-1	Στοματική κοιλότητα Σιελογόνοι αδένες Στόμαχος Λεπτό έντερο Κόλον Ήπαρ Πάγκρεας	Γλώσσα Οισοφάγος Ήπαρ
hBD-2	mBD-3	Στόμαχος Λεπτό έντερο Κόλον Πάγκρεας	Λεπτό έντερο Ήπαρ
hBD-3		Στοματική κοιλότητα Οισοφάγος	
hBD-4		Άντρο στομάχου	
	mBD-4		Γλώσσα Οισοφάγος
	mBD-6		Οισοφάγος

5.5. Η έκφραση των ντεφενσινών στο γαστρεντερικό σωλήνα

Τόσο οι α- όσο και οι β-ντεφενσίνες εκφράζονται σε μεγάλο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα με τις HD-5 και -6 να περιορίζουν την έκφρασή τους κυρίως στα κύτταρα Paneth του λεπτού εντέρου, ενώ οι β-ντεφενσίνες να παράγονται σε μεγάλο βαθμό στο παχύ έντερο.

5.5.1. Οι α-ντεφενσίνες των κυττάρων Paneth

Πρόκειται για τις HD-5 και HD-6, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε, παράγονται από τα κύτταρα Paneth των κρυπτών. Ανήκουν στην φυσική ανοσία του εντέρου και πιθανώς ασκούν ρόλο προστατευτικό τόσο ως προς τα αρχέγονα επιθηλιακά κύτταρα στον αυχένα των κρυπτών και ως προς τον ξενιστή αφού ρυθμίζουν τη σύσταση και τον αριθμό των μικροβίων του λεπτού εντέρου, προστατεύοντας και από τα μικρόβια που εισέρχονται με τις τροφές. Εκτός από τα κύτταρα του Paneth, ανευρίσκονται και σε άλλα σημεία του γαστρεντερικού σωλήνα, όπως φαίνεται στην εικόνα 7. [71]

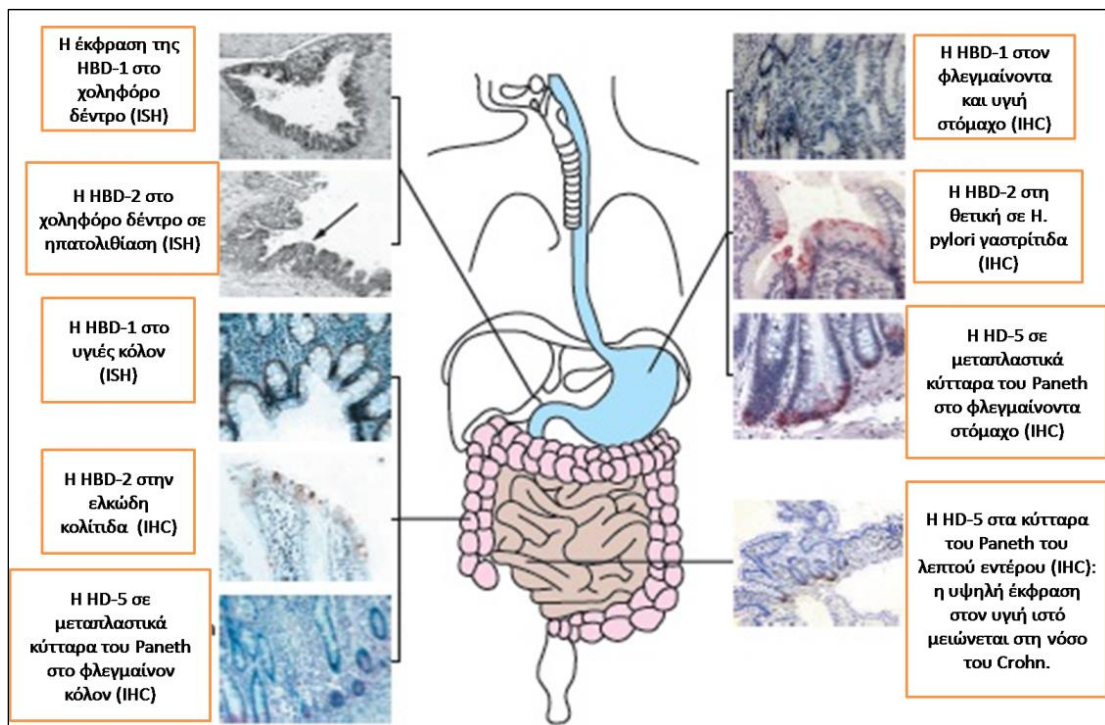
Στη φυσική ανοσία των κυττάρων Paneth, ανήκει επίσης το REG3a, που ανήκει στην οικογένεια των λεκτινών. Η έκφρασή του είναι επαγόμενη μέσω της TLR σηματοδότησης, αναγνωρίζει την πεπτιδογλυκάνη, έχοντας δράση μόνο έναντι στα Gram θετικά βακτήρια, ενώ η κατάχρηση αντιβιοτικών περιορίζει την έκφρασή του. [82]

Η λειτουργική σημασία των εντερικών α-ντεφενσινών έχει αποδειχθεί με δύο ζωικά μοντέλα ποντικών. Στο πρώτο, το ποντίκια είχαν έλλειμμα στη σύνθεση του ειδικού για την ωρίμανση της α5 ντεφενσίνης ενζύμου και αυτή η έλλειψη τα καθιστούσε επιρρεπή στα βακτηριακά παθογόνα. [83] Στο δεύτερο, είχαν παραχθεί διαγονιδιακά για την HD-5 ποντίκια, τα οποία ήταν προστατευμένα ενάντια στις λοιμώξεις. [84]

Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσίασε η μελέτη των αντιμικροβιακών πεπτιδίων, ιδιαίτερα των ντεφενσινών, στη παθογένεση των ιδιοπαθών φλεγμονωδών νόσων του εντέρου (ΙΦΝΕ) και ιδιαίτερα στη συσχέτιση των επιπέδων της HD-5 με τις ΙΦΝΕ και ιδιαίτερα της νόσου του Crohn.

Η παθογένεια της νόσου του Crohn δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, αλλά έχουν ενοχοποιηθεί πολλοί παράγοντες και μία πιθανή υπόθεση είναι ότι η δυσλειτουργία των Paneth cells μπορεί να οδηγήσει στη φλεγμονή. Ένα από τα υπεύθυνα ενοχοποιούμενα γονίδια είναι το CARD15 που κωδικοποιεί το NOD2, το οποίο αποτελεί ένα ενδοκυττάριο υποδοχέα σύνδεσης του MDP, συστατικό της βακτηριακής πεπτιδογλυκάνης και προκαλεί την ανοσολογική απόκριση έναντι των ενδοκυττάρων βακτηρίων. Μεταλλάξεις του NOD2/CARD15 έχουν βρεθεί στο ένα τρίτο ασθενών που πάσχουν από τη νόσο του Crohn και συνδέεται κυρίως με τη νόσο του Crohn του λεπτού εντέρου. [82, 85]

Οι J. Wehkamp et al ερεύνησαν την έκφραση των εντερικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων στη νόσο του Crohn. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους οι HD-5 και HD-6 δεν επηρεάζονται στην έκφρασή τους στην ελκώδη κολίτιδα και στη νόσο του Crohn παχέος εντέρου, αλλά η έκφρασή τους είναι πολύ μειωμένη τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης στη νόσο του Crohn του τελικού ειλεού ανεξάρτητα από το στάδιο της φλεγμονής. [86] Επίσης, διαπίστωσαν ότι μεταλλάξεις του NOD2 συνδέονται με μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων της HD-5 σε ασθενείς με νόσο του Crohn του τελικού ειλεού. [85] Η υπόθεση συσχέτισης των μεταλλάξεων του NOD2 με την επηρεασμένη έκφραση των ντεφενσινών των κυττάρων του Paneth ενισχύεται και με τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε ζωικά μοντέλα. [87]



Εικόνα 7: Η έκφραση των ντεφενσινών σε διάφορα σημεία του πεπτικού σωλήνα φυσιολογικά και σε διάφορες ασθένειες.

Τροποποίηση από Wehkamp J et al, Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2005^[71]

5.5.2. Οι β-ντεφενσίνες

Οι β-ντεφενσίνες παράγονται από πολλά κύτταρα στον οργανισμό, όπως και τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου και ανήκουν στη φυσική ανοσία του εντερικού επιθηλιακού φραγμού. Όταν η ισορροπία των μικροβίων του παχέος εντέρου διαταραχθεί είτε λόγω φλεγμονής είτε λόγω λοίμωξης, μεταβάλλεται και η έκφραση των ντεφενσινών. Η hBD-1 εμφανίζει ιδιοσυστασιακή έκφραση σχεδόν σε όλο το μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, όπως στο στομάχο και στο χοληφόρο δένδρο και λίγο πιο αυξημένη έκφραση στο κόλον. Σε αντίθεση, η hBD-2 δεν εκφράζεται υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά μόνο κατόπιν λοίμωξης ή φλεγμονής, όπως στην περίπτωση της ελκώδους κολίτιδας στο κόλον και στη γαστρίτιδα που είναι θετική για *Helicobacter pylori*. (εικόνα 7) ^[71, 88, 89]

Όπως και στην περίπτωση της HD-5, έτσι και οι β-ντεφενσίνες έχουν μελετηθεί ως προς την έκφρασή τους στις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου. Σύμφωνα με τους S. Nuding et al, οι ασθενείς με νόσο του Crohn έχουν μειωμένη αντιμικροβιακή δραστηριότητα στο παχύ τους έντερο σε σύγκριση με τους ασθενείς με την ελκώδη κολίτιδα και τους υγιείς μάρτυρες. Στη μελέτη αυτή, συνέκριναν την αντιμικροβιακή δραστηριότητα από βιοψίες παχέος εντέρου ασθενών που αντιστοιχούσαν στις ανωτέρω κατηγορίες έναντι των μικροβίων *Bacteroides vulgatus*, *Enterococcus faecalis*, *E.coli* ATCC 25922 και *S.aureus* ATCC25923 και βρέθηκε εξαιρετικά μειωμένη η αντιμικροβιακή δράση στη νόσο του Crohn έναντι του *Bacteroides vulgatus* και λιγότερο μειωμένη στα άλλα μικρόβια. Αυτή η μειωμένη αντιμικροβιακή δραστηριότητα πιθανώς σχετίζεται με την ελαττωμένη έκφραση της hBD-1 και την μειωμένη επαγωγή των hBD-2, hBD-3 και hBD-4. [90]

Επίσης, έχει βρεθεί ότι η hBD-1 είναι μειωμένη στο φλεγμαίνοντα βλεννογόνο στη νόσο του Crohn και στην ελκώδη κολίτιδα, ενώ η ερευνητική ομάδα των J. Wehkamp υποθέτει ότι η μειωμένη έκφραση της hBD-1 στο κόλον σε ασθενείς συνδυάζεται με την παρουσία της NOD2 μετάλλαξης. [91]

Σύμφωνα με τους M.C. Aldhous et al, η παραγωγή της hBD-2 αυξάνεται ανάλογα με το βαθμό της φλεγμονής στην ελκώδη κολίτιδα, αλλά όχι στη νόσο του Crohn. Επίσης, αυξάνεται κατόπιν διέγερσης με βακτηριακά προϊόντα όπως το LPS τόσο στην ελκώδη κολίτιδα όσο και στη νόσο του Crohn αλλά όχι στους υγιείς μάρτυρες. [92]

5.6. Οι ανθρώπινες ντεφενσίνες σε διάφορα συστήματα του οργανισμού

Εκτός από το γαστρεντερικό σωλήνα, οι ντεφενσίνες εκφράζονται σε επιθηλιακά κύτταρα πολλών συστημάτων του ανθρώπινου οργανισμού. Η μελέτη της έκφρασής τους έχει αποτελέσει το αντικείμενο πλήθους ερευνητικών μελετών, πολλές από τις οποίες αφορούν στους νεφρούς [93], στο δέρμα και στο αναπνευστικό σύστημα.

Στο ουροποιητικό σύστημα, παρατηρείται ιδιοσυστασιακή έκφραση της HD-5 και hBD-1 και υπερέκφρασή τους σε περιπτώσεις πυελονεφρίτιδας με ταυτόχρονη ανίχνευσή της στα ούρα. Στην περίπτωση της hBD-1 τα αποτελέσματα είναι πιο ασαφή, αν και φαίνεται σε μικρό βαθμό να επάγεται η έκφρασή της από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. ^[94, 95, 96] Σε αντίθεση, η hBD-2 εκφράζεται μόνο σε περιπτώσεις πυελονεφρίτιδας με επαγωγή της από φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως TNF-α, η IL-1β και το LPS. ^[96] Οι ουδετεροφιλικές ντεφενσίνες (HNP 1-4) αυξάνονται στη διαβητική νεφροπάθεια στις περιπτώσεις ασθενών με μακροαλβουμινουρία ^[97], όπως επίσης φαίνεται να ασκούν επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στον καρκίνο των νεφρών. ^[98]

Στο αναπνευστικό σύστημα, η ανάπτυξη του πνεύμονα ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από την hBD-2, ενώ η hBD-1 εκφράζεται σε μικρότερο βαθμό στο νεογνικό πνεύμονα. ^[99] Οι ντεφενσίνες αποδεικνύονται και αναπόσπαστο τμήμα των αμυντικών μηχανισμών και του αναπνευστικού συστήματος, όπως υποδηλώνουν οι έρευνες που έγιναν σε πειραματικά μοντέλα. ^[100] Η αύξηση των hBD-1 και hBD-2 στην χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, με την πρώτη να ελέγχεται από τις HDAC ^[101, 102, 103], η επαγωγή της hBD-2 στη φυματίωση^[104] , καθώς και η υπερέκφραση της hBD-3 στην πνευμονία ^[105, 106] αποδεικνύουν τη σημαντικό ρόλο των ντεφενσινών στην φυσική ανοσία.

Δεν θα πρέπει να παραληφθεί και ο ρόλος των ντεφενσινών στα δερματικά νοσήματα, με περίοπτη θέση να καταλαμβάνουν οι hBD-2 και οι hBD-3 στην ψωρίαση ^[107, 108] και την ατοπική δερματίτιδα ^[109], ενώ ιδιαίτερα ενδιαφέρονσα είναι η αύξηση της hBD-3 στη νόσο του Hansen. ^[110]

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι να εξετασθεί η έκφραση των φυσικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων σε ασθενείς με τελικού σταδίου ηπατική νόσο, καθώς επίσης να ελεγχθεί η συσχέτιση των υπό μελέτη πεπτιδίων με την παρουσία βακτηριακής αλλόθεσης και ο κλινικός τους ρόλος ως δείκτες της κλινικής αυτής κατάστασης.

Στη παρούσα έρευνα μελετήθηκαν τα επίπεδα συγκεκριμένων μικροβιακών πεπτιδίων στη συστηματική κυκλοφορία, στις ηπατικές φλέβες και η έκφραση του mRNA σε εντερικό ιστό. Επιπλέον, συσχετίστηκε η έκφραση συγκεκριμένων αντιμικροβιακών πεπτιδίων με καθιερωμένους δείκτες βακτηριακής αλλόθεσης.

2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα και κίρρωση του ήπατος, οι οποίοι παρακολουθούνται από το Εξωτερικό Ηπατολογικό ιατρείο καθώς και ασθενείς νοσηλεύθηκαν στην κλινική Α' Προπαιδευτική Παθολογική και Πανεπιστημιακή Γαστρεντερολογική κλινική του Λαϊκού νοσοκομείου. Η διάγνωση της χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας έγινε με διεθνώς αποδεκτά κριτήρια. (θετικό HBsAg ή anti-HCV με ιαμμία για περισσότερο από έξι μήνες και εμμένουσα ή διαλείπουσα αύξηση των τρανσαμινασών). Όσοι από τους ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα είχαν υποβληθεί σε βιοψία ήπατος είχαν ελάχιστη ηπατική ίνωση και ήπια προς μέτρια φλεγμονή (stage=0-1, grade=2-6, Ishak score)

Η μη αντιρροπούμενη κίρρωση ορίστηκε από την παρουσία τουλάχιστον μίας από τις επιπλοκές της κίρρωσης, όπως η κιρροραγία, ο ασκίτης, η ηπατική εγκεφαλοπάθεια, ο ίκτερος. Τέσσερις από τους κιρρωτικούς ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη είχαν αντιρροπούμενη κίρρωση, η οποία επιβεβαιώθηκε μέσω βιοψίας ήπατος ή/και ελαστογραφίας, με όριο τα 12 kPa.

Η ομάδα των υγιών μαρτύρων αποτελείται από υγιείς εθελοντές που υποβλήθηκαν σε ενδοσκόπηση ως τακτικό έλεγχο με αντιστοιχία στην ηλικία και στο φύλο με την ομάδα της χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας και της κίρρωσης. Επειδή οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα είναι νεότεροι σε ηλικία από τους κιρρωτικούς, οι ηλικίες της ομάδας των υγιών μαρτύρων ποικίλουν από 32 σε 81 έτη.

Ασθενείς με νοσήματα τα οποία είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τα υπό μελέτη μόρια, όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, η ψωρίαση και άλλες ανοσολογικές διαταραχές, αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Η έρευνα ακολούθησε τις Ηθικές Αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι και πήρε έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής του Νοσοκομείου μας. Όλοι οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν για τη διαδικασία και τους σκοπούς της μελέτης και εισήχθησαν σε αυτή μετά από έγγραφη συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Συλλογή των δειγμάτων

Το αίμα συλλέχθηκε από περιφερικές φλέβες των ασθενών και των μαρτύρων και σε μία υποκατηγορία ασθενών, έγινε συλλογή αίματος από τις ηπατικές φλέβες κίρρωτικών ασθενών μετά από καθετηριασμό της μηριαίας φλέβας, της κάτω κοίλης φλέβας και της δεξιάς ηπατικής φλέβας σύμφωνα με την τεχνική Seldiger. Το αίμα φυγοκεντρήθηκε στις 3000 στροφές για δέκα λεπτά, απομονώθηκε το υπερκείμενο (ορός και πλάσμα) και αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Συλλέχθηκαν επίσης βιοψίες από τον εντερικό βλεννογόνο παχέος εντέρου και τελικού ειλεού από κίρρωτικούς ασθενείς και υγιείς μάρτυρες, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε κολονοσκόπηση για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς. Οι βιοψίες τοποθετήθηκαν σε ένα διάλυμα σταθεροποίησης του RNA (RNAlater® AmbionInc., CA), και για 2 ημέρες φυλάχθηκαν στους -4°C για να εμποτιστεί ολόκληρος ο ιστός με το διάλυμα, ενώ έπειτα μεταφέρθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι τη χρήση τους. Το RNA later αποτελεί ένα διάλυμα που σταθεροποιεί και προστατεύει το RNA στους ιστούς και διατηρεί αναλλοίωτο το προφίλ της έκφρασης γονιδίων. Οι βιοψίες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της ανοσοϊστοχημείας, μετά τη συλλογή τους, τοποθετήθηκαν άμεσα σε φορμόλη.

2.2.2. Μέτρηση της συγκέντρωσης της hBD-1 και του sCD14 με ELISA

Η συγκέντρωση της hBD-1 και του sCD14 τόσο στο περιφερικό αίμα όσο και αίμα από τις ηπατικές φλέβες προσδιορίστηκε με ELISA.

Συγκεκριμένα, για την hBD-1, τα βιοτινυλιωμένα πρώτο και δεύτερο anti-hBD-1 αντισώματα αγοράστηκαν από την Peprotech, Inc, UK.

Συνοπτικά, 0.5μg/ml αντι-ανθρώπειου αντι-BD-1 αντισώματος λαγού (αντίσωμα σύλληψης-capture) επώαστηκαν για 12 ώρες σε θερμοκρασία

δωματίου σε μικροπλάκες με επίπεδο πυθμένα. Η μη-ειδική σύνδεση διακόπηκε με την προσθήκη του διαλύματος αποκλεισμού (blocking solution - 1% BSA σε PBS) για 2 ώρες. Μετά από σχολαστικό πλύσιμο, προστέθηκαν 100 μl διαλυμένου πλάσματος ασθενούς σε αραιώση 1:50 και ακολούθησε για 2 ώρες επώαση. Έπειτα από επιπλέον πλύσιμο, προστέθηκε 0.5μg/ml από βιοτινυλιωμένο αντι-ανθρώπειο αντι-BD1 αντίσωμα λαγού (αντίσωμα ανίχνευσης, detection) και επώαστηκε για τις επόμενες 2 ώρες. Τελικά, μετά από επιπλέον πλύσιμο, το avidin-HRP σύμπλοκο (Peprotech, UK) προστέθηκε για 30 λεπτά στο σκοτάδι. Μετά την αφαίρεση του πλεονάζοντος HRP, προστέθηκαν 100 μl ABTS (Sigma, USA). Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 405 nm και διορθώθηκε στα 650 nm συνεχώς ανά χρονικά διαστήματα των 5 λεπτών για περίπου μία ώρα. Η απορρόφηση κάθε δείγματος υπολογίστηκε βάσει της πρότυπης καμπύλης που δημιουργήθηκε μετά από διαδοχικές αραιώσεις της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης BD-1 (Peprotech, UK).

Η συγκέντρωση του sCD14 προσδιορίστηκε με τη χρήση του human CD14 ELISA Development kit (R&D Systems, Abingdon, UK) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, 2μg/ml αντι-ανθρώπειο αντι-CD14 αντισώματος μύος (αντίσωμα σύλληψης-capture) επώαστηκαν για 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε μικροπλάκες με επίπεδο πυθμένα. Η μη-ειδική σύνδεση διακόπηκε με την προσθήκη του διαλύματος αποκλεισμού (blocking solution - 1% BSA σε PBS) για 2 ώρες. Μετά από σχολαστικό πλύσιμο, προστέθηκαν 100 μl αραιωμένου ορού ασθενούς σε 1:10000 αραιώση και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες. Έπειτα από επιπλέον πλύσιμο, προστέθηκαν 200 ng/ml από βιοτινυλιωμένο αντι-ανθρώπειο αντι-CD14 αντίσωμα προβάτου και επώαστηκε για τις επόμενες 2 ώρες. Μετά από επιπλέον πλύσιμο, streptavidin-HRP προστέθηκε για 20 λεπτά στο σκοτάδι. Μετά την αφαίρεση του πλεονάζοντος HRP, προστέθηκαν 100 μl ενός 1:1 μίγματος H₂O₂ και Tetramethylbenzidine (R&D Systems). Μετά από 30 λεπτά, η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm και διορθώθηκε στα 570 nm. Η απορρόφηση κάθε δείγματος υπολογίστηκε βάσει της πρότυπης καμπύλης που δημιουργήθηκε μετά από διαδοχικές αραιώσεις του ανασυνδυασμένου ανθρώπινου CD14 (R&D Systems).

Τόσο για την hBD-1 όσο και για το sCD14, οι συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν μέσω λογαριθμικής ανάλυσης. Όλα τα δείγματα με απορρόφηση χαμηλότερη του μέσου όρου των μηδενικών προτύπων + 2SD (σταθερές αποκλίσεις), θεωρήθηκαν ως μη ανιχνεύσιμα. Για να αποφευχθεί η πιθανή μεταβλητότητα μεταξύ των πειραμάτων, σε κάθε ξεχωριστό ELISA πείραμα συμπεριλήφθηκε παρόμοιος αριθμός δειγμάτων από ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β και C, κίρρωση και υγιών μαρτύρων.

Η συγκέντρωση της LBP μετρήθηκε με μία εμπορικά διαθέσιμη ELISA (USCN), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.3. Προσδιορισμός έκφρασης του mRNA των φυσικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων σε εντερικό ιστό

2.2.3.1. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων (RNA)

2.2.3.1.1. Ομογενοποίηση των ιστών

Προϋπόθεση για να απομονωθεί το RNA από τους ιστούς είναι αρχικά η ομογενοποίηση των βιοψιών παχέος εντέρου και τελικού ειλεού.

Το διάλυμα για την ομογενοποίηση αποτελείται από το Lysis Buffer (το οποίο παρέχεται μαζί με το kit απομόνωσης RNA - RNA extraction kit, Ambion) και από 2-μερκαπτοαιθανόλη. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται 500 μl Lysis buffer μαζί με 5μl 2-μερκαπτοαιθανόλης. Η ομογενοποίηση πραγματοποιείται με το μηχάνημα ομογενοποίησης - rotor stator homogenizator. Πριν από την έναρξη της ομογενοποίησης, η κεφαλή του μηχανήματος απολιμάνθηκε με Rnase zap και ξεπλύθηκε με αποστειρωμένο νερό.

Τα δείγματα φυλάσσονται στον πάγο και κάθε ένα τοποθετείται στο διάλυμα σε στρογγυλού πυθμένα φιαλίδια των 2ml καθαρά από RNάση και DNάση. Αφού εμβυθιστεί ο ιστός στο διάλυμα, ομογενοποιείται για 30-40 δευτερόλεπτα, ενώ μετά από κάθε δείγμα το μηχάνημα απολυμάνθηκε δύο φορές με 100% αιθανόλη και μετά ξεπλύθηκε τρεις φορές με νερό. Έπειτα το ομογενοποίημα

τοποθετείται στον πάγο σύντομα μέχρι το επόμενο στάδιο της απομόνωσης των νουκλεϊκών οξέων που αποτελεί η απομόνωση του RNA.

2.2.3.1.2. Απομόνωση του RNA

Στη συνέχεια από τον ομογενοποιημένο ιστό, το ολικό RNA απομονώθηκε με το Purelink RNA extraction kit (Ambion, Carlsbad, Ca, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Πιο αναλυτικά, τα ομογενοποιημένα δείγματα φυγοκεντρώνται στα 2.600g για 5 λεπτά και κατόπιν το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο, καθαρό RNάση και DNάση και τοποθετείται ίση ποσότητα (500μl) 70% αιθανόλης. Στο δείγμα αναδεύεται με vortex και μεταφέρεται στα ειδικά σωληνάρια που περιέχουν και τη μεμβράνη δέσμησης του RNA (spin cartridges). Τα σωληνάρια φυγοκεντρώνται για 20 δευτερόλεπτα στις 10.000 στροφές και το φυγοκέντημα απορρίπτεται. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να μεταφερθεί όλη η ποσότητα του ομογενοποιημένου δείγματος με την αιθανόλη. Έπειτα, η μεμβράνη ξεπλένεται με 700μl του Wash Buffer II και δύο φορές με 500μl του Wash Buffer I, ενώ μετά από κάθε βήμα τα σωληνάρια φυγοκεντρώνται για 20 δευτερόλεπτα στις 10.000 στροφές και το φυγοκέντημα απορρίπτεται. Τέλος, τοποθετούνται 55μl RNάσης καθαρού ύδατος στο κέντρο της μεμβράνης και μετά από φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 2 λεπτά, απελευθερώνεται και συλλέγεται στο σωληνάριο συλλογής (recovery tube) το RNA, το οποίο φυλάσσεται έπειτα στους -80°C μέχρι τη χρήση του.

2.2.3.2. Μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA

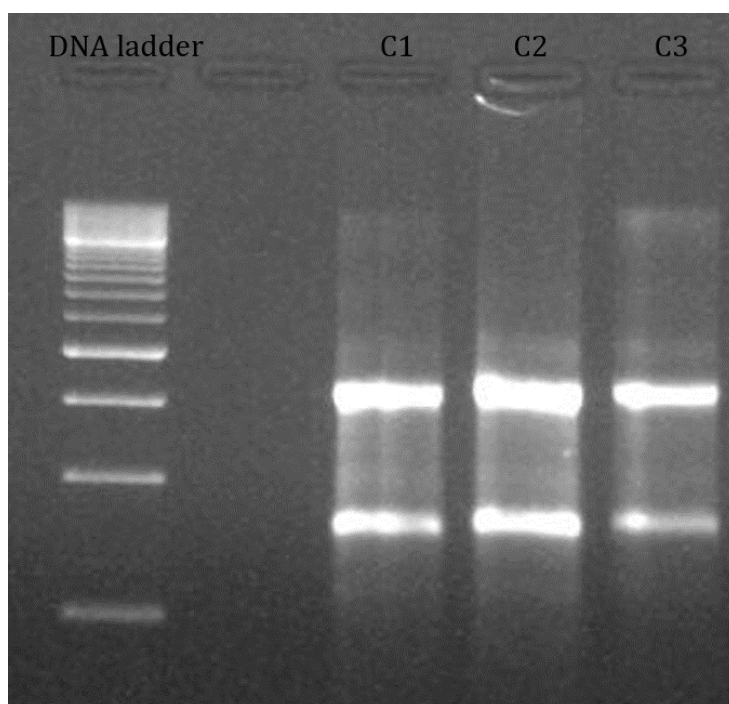
Η μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA έγινε με το Qubit Fluometer. Τα δείγματα, αρχικά, αραιώνονται με νερό σε αραιώση 1:20. Για τη μέτρηση, χρησιμοποιείται ένα διάλυμα που αποτελείται από 199μl του Buffer που παρέχεται με το kit και 1μl από το χρωμογόνο. Κατά τη μέτρηση τοποθετούνται 10μl από το αραιωμένο RNA και 190μl από το διάλυμα μέτρησης σε σωληνάρια των 0,5ml. Η μέτρηση που δείχνει το μηχάνημα πολλαπλασιάζεται με το 20 (όση

είναι και η αρχική αραίωση του δείγματος) και αυτή αποτελείται τη συγκέντρωση του RNA του κάθε δείγματος.

2.2.3.3. Έλεγχος ποιότητας του RNA

Στο επόμενο στάδιο ελέγχεται η ποιότητα του RNA. Αυτό πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης. Η γέλη αγαρόζης αποτελείται από 1,5gr αγαρόζης διαλυμένο σε 150ml TBE 1x και 5μl βρωμιούχο αιθύδιο. Στο ένα πηγαδάκι τοποθετούνται 4μl DNA ladder (τμήματα DNA γνωστού μεγέθους) των 500bp (ζευγών βάσεων), ενώ κάθε δείγμα τοποθετείται σε ξεχωριστό πηγαδάκι ως εξής: 2μl RNA αναμεμειγμένα με 2μl loading dye. Η γέλη τοποθετείται σε ηλεκτρικό πεδίο για 1 ώρα στα 100 Volts.

Κάθε RNA που δεν έχει υποστεί αποικοδόμηση εμφανίζει στη γέλη αγαρόζης δύο διακριτές μπάντες που αντιστοιχούν στις περιοχές 18S και 28S. (εικόνα 8)



Εικόνα 8: Έλεγχος ποιότητας του RNA.

Διακρίνονται οι δύο ευδιάκριτες μπάντες που αντιστοιχούν στις περιοχές 18S και 28S του RNA. DNA ladder: τμήμα DNA γνωστού μεγέθους, 500bp, C1-C3 : RNA που έχει απομονωθεί από ιστό ασθενών.

2.2.3.4. Επεξεργασία του RNA με DNάση

Για να αποφευχθεί η οποιαδήποτε επιμόλυνση του RNA με γενωμικό DNA, το RNA που απομονώθηκε υποβλήθηκε σε επεξεργασία με DNάση (DNase I, Amplification grade, Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Συγκεκριμένα, σε κάθε δείγμα RNA για 1 µg, τοποθετήθηκαν από 1µl buffer και 1 µl DNase I και επώασθηκε το διάλυμα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, τοποθετήθηκε 1µl EDTA και όλο το μείγμα στους 65°C για 10 λεπτά και έπειτα τα δείγματα τοποθετήθηκαν κατευθείαν στον πάγο και φυλάχθηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.2.3.5. Έλεγχος της καθαρότητας του RNA

Μετά τον καθαρισμό του RNA με DNάση (DNase treated RNA) για την απομάκρυνση του γενωμικού DNA, γίνεται έλεγχος αν το DNase treated RNA έχει καθαρίσει αποτελεσματικά.

Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιείται με τη μέθοδο της PCR και ηλεκτροφόρηση.

2.2.3.5.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Το μείγμα για κάθε αντίδραση PCR αποτελούνταν από: 2,5µl PCR Buffer 10x με τελική συγκέντρωση 1x, 0,75µl MgCl₂ (50mM) με τελική συγκέντρωση 1,5mM, 2µl dNTPs (2.5mM το κάθε ένα) με τελική συγκέντρωση 200µM το κάθε ένα, 0,5µl Primer F (25µM) με τελική συγκέντρωση 0,5µM, 0,5µl Primer R (25µM) με τελική συγκέντρωση 0,5µM, 0,125µl Taq Polymerase (5U/µl) με τελική συγκέντρωση 0.625U/µl, 17,625µl H₂O και 1µl από cDNA ή RNA ή H₂O.

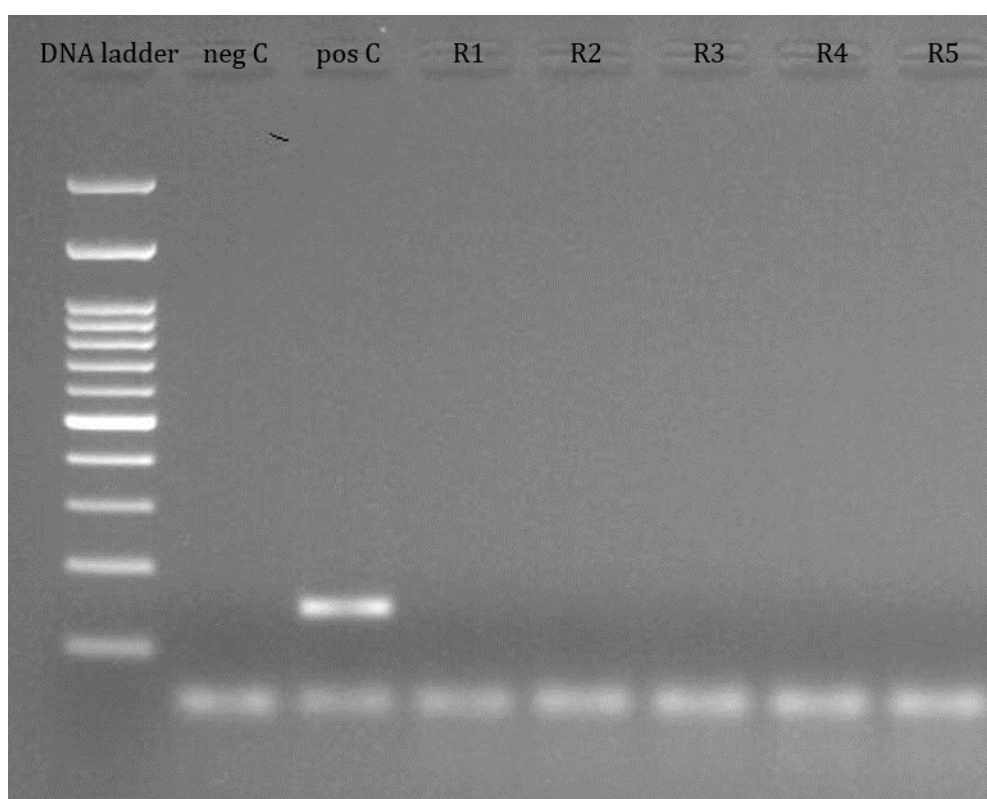
Το μείγμα της αντίδρασης επώαστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή MyCycler, thermal cycler (Biorad, USA) σύμφωνα με τις παρακάτω θερμικές παραμέτρους: 95°C για 5 λεπτά, ακολουθούμενο από 30 κύκλους αποδιάταξης του γενωμικού υλικού στους 95°C, υβριδισμού στους 63°C και επιμήκυνσης στους 72°C. Τέλος, το γενωμικό υλικό επιμηκύνθηκε για άλλα 5 λεπτά στους 72°C.

2.2.3.5.2. Ηλεκτροφόρηση

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 1,5% (150ml TBE 1x, 2,3gr αγαρόζη, 5μl βρωμιούχο αιθύδιο) για μία ώρα στα 100 Volts παρουσία τμημάτων DNA γνωστού μεγέθους (DNA ladder των 100bp).

Τοποθετήθηκαν 4.5μl ladder των 100bp στο πηγαδάκι αναφοράς. Για τα δείγματα, αναμείχθηκαν 2μl loading dye και 10μl από κάθε δείγμα, ενώ τοποθετήθηκαν στο πήγμα από 10μl του διαλύματος που δημιουργήθηκε.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, η γέλη εκτέθηκε σε UV ακτινοβολία για την ανίχνευση των τμημάτων και φωτογραφήθηκε. (εικόνα 9)



Εικόνα 9: Έλεγχος καθαρότητας του RNA.

Η αποτελεσματικότητα του καθαρισμού του RNA από γενωμικό DNA ελέγχεται με PCR και ηλεκτροφόρηση.

DNA ladder: τμήμα DNA γνωστού μεγέθους, 100bp, neg C: negative control-αρνητικός μάρτυρας, pos C: positive control- θετικός μάρτυρας, R1-R5: DNase treated RNA που έχουν απομονωθεί από εντερικό ιστό ασθενών.

2.2.3.6. Σύνθεση cDNA – αντίστροφη μεταγραφή

Το RNA λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση του DNA με μία διαδικασία που ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή και το ένζυμο που καταλύει αυτή την διαδικασία ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση. Η τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για τη σύνθεση cDNA από mRNA.

Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 250 ng ολικό RNA για να πραγματοποιηθεί η σύνθεση cDNA με τη χρήση του Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Για τη σύνθεση κάθε δείγματος cDNA χρησιμοποιήθηκαν: 2μl τυχαίων εκκινητών (Random Hexamer Primers), 4μl ρυθμιστικού διαλύματος (Buffer), 0,5μl αναστολέα της RNάσης (RNase inhibitor), 2μl τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), 0,5μl αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcriptase) και 11μl RNA σε τελικό όγκο 20μl.

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίστροφη μεταγραφή είναι οι ακόλουθες:

- 25°C για 10 min.
- 50°C για 1 ώρα.
- 85°C για 5 min. (Στο στάδιο αυτό γίνεται απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης.)

Η αντίδραση τελικά σταματάει με την τοποθέτηση των σωληναρίων που περιέχουν τα δείγματα σε πάγο. Τέλος, τα δείγματα αραιώνονται με την προσθήκη H₂O ελεύθερου από RNάσες.

Στη σύνθεση cDNA προστίθενται και δείγματα στα οποία αντί για αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιείται απλό H₂O. Τα δείγματα αυτά χρησιμεύουν ως αρνητικά controls.

2.2.3.7. Πραγματικού χρόνου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Real - Time RT-PCR)

Η έκφραση των επιπέδων των υπό μελέτη γονιδίων μετρήθηκε με βάση τα επίπεδα της έκφρασης εσωτερικού μάρτυρα (γονίδιο αναφοράς) RPLP0^[111] του οποίου η έκφραση παραμένει σταθερή ανεξάρτητα από την υποκείμενη νόσο. Για τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Η σχετική έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων σε κάθε δείγμα μετρήθηκε με τη Real-time RT-PCR με τη χρήση του KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Kapa Biosystems, Boston, MA, USA) σε θερμικό κυκλοποιητή CFX96 Thermocycler (Biorad, USA). Ο πολλαπλασιασμός των γονιδίων στόχων πραγματοποιήθηκε με εκκινητές (primers) που σχεδιάστηκαν να απέχουν τουλάχιστον απόσταση ίση ενός ιντρονίου. (πίνακας 6)

Πολλαπλασιάστηκαν 250ng cDNA σε διάλυμα που περιείχε για κάθε δείγμα 10μl 2x SYBR Green (KapaBiosystems), 7,6μl H₂O, 0,2μl Primer F (20μM), 0,2μl Primer R (20μM), 2μl cDNA σε τελικό όγκο 20μl. Οι συνθήκες ενίσχυσης του cDNA ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη (initial denaturation) στους 95°C για 3 λεπτά, ακολουθούμενη από 40 κύκλους με αποδιάταξη στους 95°C για 3 δευτερόλεπτα και υβριδισμό (annealing) και ενίσχυση (extension) στους 63°C για 30 δευτερόλεπτα. Μετά το πέρας της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης (melting curve analysis) από τους 70°C στους 95°C με ρυθμό άυξης της θερμοκρασίας 0.5°C. Οι μετρήσεις των δειγμάτων έγιναν εις διπλούν.

Πίνακας 6. Αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην real time RT-PCR

Γονίδιο	Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων (5'-3')	
DEFB1	Forward	GAG ATG GCC TCA GGT GGT AA
	Reverse	ACA GGT GCC TTG AAT TTT GG
DEFA5	Forward	ACC TCA GGT TCT CAG GCA AGA G
	Reverse	GGG ACT CAC GGG TAG CAC AA
DEFA6	Forward	GCA GGC AAA AGC TTA TGA GG
	Reverse	TTG TTG AGC CCA AAG CTC TAA
REG3A	Forward	CCA TAT CCC ACC AGA GAG TGA
	Reverse	TGG GGT TCT TCA CCT TGA AC
RPLP0	Forward	GCG ACC TGG AAG TCC AAC TA
	Reverse	TCT CCA GAG CTG GGT TGT TT

2.2.4. Απομόνωση βακτηριακού DNA

Βακτηριακό DNA απομονώθηκε από 200μl ορού κίρρωτικών ασθενών σύμφωνα με τις οδηγίες του QIAamp DNA Mini and Blood Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Το βακτηριακό 16s ριβοσωμικό RNA (16S rRNA) ανιχνεύθηκε με τη χρήση γενικών καθολικών εκκινητών: F: 5'- AGAGTTTGGATCATGGCTCAG -3' και R: 5'- ACCGCGACTGCTGCTGGCAC -3', οι οποίοι ενισχύουν τμήμα του γονιδίου μεγέθους 540 βάσεων.^[39]

Το μείγμα αντίδρασης για την ανίχνευση του 16S rRNA γονιδίου με τη μέθοδο της PCR ήταν το ακόλουθο: 2,5μl 10x PCR Buffer, 0,75μl MgCl₂ (50mM), 2μl dNTPs (2.5mM το κάθε ένα), 0,5μl Primer F (25 μM), 0,5μl Primer R (25 μM), 0,125μl Taq Polymerase (5U/ μl), 16,125μl H₂O και 2,5μl DNA.

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι παρακάτω:

- 94°C 30sec
- 55°C 30sec
- 72°C 60sec

2.2.5. Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μέθοδος εντοπισμού πρωτεϊνών σε κύτταρα σε μία τομή ιστού με βάση την ιδιότητα των αντισωμάτων να προσδένονται ειδικά με αντιγόνα σε βιολογικούς ιστούς.

Για τα πειράματα της ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης από βιοψίες τελικού ειλεού που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια ενδοσκοπήσεων για διαγνωστικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς μικρού αριθμού κίρρωτικών ασθενών και υγιών μαρτύρων.

Εφαρμόστηκε το ακόλουθο πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας:

Οι τομές αποπαραφινολογήθηκαν και ενυδατώθηκαν με εμβύθιση διαδοχικά σε ξυλόλη 2 φορές για 15 λεπτά, 100% αιθανόλη 2 φορές για 3 λεπτά, και από 3 λεπτά σε 95% αιθανόλη, 70% αιθανόλη, απεσταγμένο νερό (dH₂O) και 1x PBS. Έπειτα οι τομές επώαστηκαν σε διάλυμα 30% H₂O₂ σε μεθανόλη για 30 λεπτά στο σκοτάδι, στάδιο που απενεργοποιεί την ενδογενή υπεροξειδάση και ξεπλύθηκαν με 1x PBS 2 φορές για 15 λεπτά. Ακολούθησε η εμβύθιση των ιστών σε διάλυμα κιτρικού οξέος για 20 λεπτά στους 80°C για την αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων (antigen retrieval). Έπειτα οι ιστοί ξεπλύθηκαν με dH₂O για 10min και μετά με 1x PBS για 10min και οι τομές περιγράφηκαν με DAKO pen. Ο κορεσμός των ελευθέρων ενεργών θέσεων προκειμένου να εμποδιστούν οι μη ειδικές συνδέσεις καθώς και η διευκόλυνση εισόδου των αντισωμάτων έγινε με επώαση των τομών σε 1x PBS με 0,1% Triton X-100 και 10% FBS (blocking buffer) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια επώαστηκαν στους 4°C για ένα βράδυ με το ειδικό πρωτογενές αντίσωμα για την A5 defensin (mouse anti-HD-5, συγκέντρωση 1mg/ml, Millipore) αραιωμένο 1:100 σε 1x PBS στη μία τομή και στη δεύτερη τομή ανοσοσφαιρίνη τάξης IgG του ζώου στο οποίο έχει παραχθεί το πρωτογενές αντίσωμα και στην ίδια συγκέντρωση με το πρωτογενές αντίσωμα για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο μη ειδικής σύνδεσης του πρωτογενούς αντισώματος. Ακολούθως, ξεπλύθηκαν με 1x PBS 2 φορές για 15 λεπτά και επώαστηκαν με το δευτερογενές αντίσωμα (anti-mouse σε αραιώση 1:800 σε PBS) για 1 ώρα, ξεπλύθηκαν με 1x PBS 2 φορές για 10 λεπτά. Κατόπιν, ακολούθησε η αντίδραση ειδικής χρώσης με τη χρωμοφόρο ένωση 3,3' diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories, SK-4100) σύμφωνα με

το πρωτόκολλο του κατασκευαστή περίπου για 3 λεπτά και η αντίδραση σταμάτησε με την εμβύθιση των ιστών σε H₂O. Έγινε χρώση των τομών με αιματοξυλίνη και ξεπλύθηκαν με H₂O, ενώ ακολούθησε η αφυδάτωσή τους με την διαδοχική εμβύθισή τους σε 70% αιθανόλη, 95% αιθανόλη, 100% αιθανόλη 2 φορές από 3 λεπτά, ξυλόλη 2 φορές από 3 λεπτά στο καθένα. Τέλος, οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν με κάλυψη με καλυπτρίδα με την ειδική μονιμοποιητική κόλλα DPX (BDH, 360294H). Οι τομές παρατηρήθηκαν σε ορθό οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση x20 και x40.

2.2.6. Καλλιέργεια ολικού αίματος

Για τα πειράματα κυτταροκαλλιιεργειών, συλλέχθηκε ολικό αίμα από περιφερικές φλέβες και τοποθετήθηκε σε ηπαρινισμένο (15-20 USP ηπαρίνης/ml ολικού αίματος) αποστειρωμένο σωληνάριο. Σε κάθε 'πηγάδι' καλλιέργειας, τοποθετήθηκαν 500μl ολικού αίματος και διεγέρθηκαν ξεχωριστά με λιποπολυσακχαρίτη διαφορετικών υποτύπων (LPS O111:B4 και LPS K-235, Sigma) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) και υπήρχαν και δείγματα που δεν υποβλήθηκαν σε διέγερση με κανένα βακτηριακό προϊόν. Τα χρονικά σημεία του πειράματος ήταν οι 24 και 48 ώρες και η επώαση έγινε στους 37°C και 5% CO₂ σε κλίβανο. Με την πάροδο του χρόνου επώασης, τα δείγματα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 3.000 στροφές για 10 λεπτά ώστε να διαχωριστεί ο ορός από τα έμμορφα συστατικά του αίματος. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και φυλάχθηκε στους -80°C μέχρι τη χρήση του. Σε κάθε πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τόσο από υγιείς μάρτυρες όσο και από κίρρωτικούς ασθενείς και όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν εις διπλούν. Η μέτρηση των επιπέδων των ντεφενσίνων στα υπερκείμενα έγινε με τη μέθοδο ELISA.

2.2.7. Ιστοική καλλιέργεια

Η συλλογή των βιοψιών παχέος εντέρου που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα των ιστοικών καλλιιεργειών έγινε κατά τη διάρκεια ενδοσκοπήσεων στις οποίες υποβλήθηκαν οι ασθενείς για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς. Αμέσως μετά τη συλλογή τους εμβυθίστηκαν στο διάλυμα HBSS με αντιβιοτικά, το οποίο αποτελούνταν από HBSS, Herpes 1M, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 1,5μg/ml αμφοτερικίνη B και 50μg/ml γενταμυκίνη με pH 7,3.

Οι ιστοί αναδεύτηκαν και ξεπλύθηκαν τρεις φορές στο ανωτέρω διάλυμα. Έπειτα τοποθετήθηκε το κάθε τεμαχίδιο σε ξεχωριστό 'πηγάδι' καλλιέργειας και χρησιμοποιήθηκε ως καλλιιεργητικό μέσο το διάλυμα RPMI, το οποίο παρασκευάστηκε με RPMI, 10% FBS, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 1,5μg/ml αμφοτερικίνη B και 50μg/ml γενταμυκίνη και L-Glutamine 200mM.

Η διέγερση πραγματοποιήθηκε με LPS O111:B4 και LPS K-235 σε συγκεντρώσεις 10ng/ml, 100ng/ml και 500 ng/ml, καθώς επίσης και με το θερμικά απενεργοποιημένο πρότυπο στέλεχος *Klebsiella pneumonia* ATCC 107. Οι καλλιιεργειες επώαστηκαν για 20 ώρες στους 37°C και 5% CO₂ σε υγροποιημένο κλίβανο. Κατόπιν, έγινε η συλλογή των καλλιιεργειών και τα υπερκείμενα συλλέχτησαν μετά από φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 10 λεπτά και φυλάχτηκαν στους -80°C μέχρι τη χρήση τους. Η μέτρηση των επιπέδων των ντεφενσίνων στα υπερκείμενα έγινε με τη μέθοδο ELISA.

3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Kolmogorov–Smirnov δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν για να καθοριστεί αν οι υπό μελέτη μεταβλητές (hBD-1, sCD14) ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Οι συγκεντρώσεις τόσο της hBD-1 όσο και του sCD14 παρουσίαζαν ιδιαίτερα ασύμμετρη κατανομή. Γι αυτό το λόγο, χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές δοκιμασίες για τη στατιστική ανάλυση. Η σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες έγινε με τις δοκιμασίες Mann-Whitney (αφορά σε σύγκριση 2 ομάδων) και το Kruskal-Wallis (αφορά σε σύγκριση περισσότερων από 2 ομάδων). Η δοκιμασία Spearman's r-test χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχούν οι συσχετίσεις μεταξύ των διαφόρων μεταβλητών. Σε όλες τις περιπτώσεις, το επίπεδο σημαντικότητας $\alpha < 0.05$ θεωρήθηκε σημαντικό.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Χαρακτηριστικά των ασθενών

Στην παρούσα μελέτη, συμμετείχαν 47 ασθενείς (άνδρες/γυναίκες 34/13) με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα [ηλικία 41 ± 12.4 (27-70), μέση τιμή \pm SD, διακύμανση] και 64 ασθενείς (άνδρες/γυναίκες 45/19) με κίρρωση του ήπατος [ηλικία 62.9 ± 12.3 (35-89), μέσος όρος \pm SD, διακύμανση]. Από τους ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα, 22 ασθενείς έπασχαν από χρόνια ιογενή ηπατίτιδα Β και 25 ασθενείς από χρόνια ιογενή ηπατίτιδα C. Από τους ασθενείς με κίρρωση του ήπατος, 9 ασθενείς είχαν χρόνια ιογενή ηπατίτιδα Β, 20 χρόνια ιογενή ηπατίτιδα C, 20 αλκοολική κίρρωση του ήπατος. Στην πλειοψηφία τους οι κίρρωτικοί ασθενείς είχαν μη αντιρροπούμενη κίρρωση του ήπατος (47 ασθενείς) και μόνο 4 είχαν αντιρροπούμενη νόσο. Στην ομάδα των κίρρωτικών ασθενών συμπεριλαμβάνονται και 13 ασθενείς με ΗΚΚ. Η ομάδα των μαρτύρων αποτελείται από 40 υγιείς μάρτυρες (άνδρες/γυναίκες 25/15) [ηλικία 48 ± 15.29 , 32-81 (μέση τιμή \pm SD, διακύμανση)]. Τα δημογραφικά στοιχεία και οι κλινικές πληροφορίες φαίνονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7. Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

	Χρόνια ηπατίτιδα	Κίρρωση (+/- ΗΚΚ)
Ασθενείς	47	64
Ηλικία (έτη, μέσος όρος \pm SD, διακύμανση)	43.6 \pm 12.4 (27-70)	62.9 \pm 12.3 (35-89)
Άνδρες	34	45
HBV	22	9
HCV	25	20
Αλκοολική		20
Κρυψιγενής		7
Άλλη αιτία		8
TBil (μέσος όρος \pm SD, διακύμανση)	0.89 \pm 0.66 (0.2-2.8)	2.47 \pm 3.53 (0.28-17.52)
AST (μέσος όρος \pm SD, διακύμανση)	70.6 \pm 145.6 (13-750)	63.3 \pm 53.7 (17-248)
ALT (μέσος όρος \pm SD, διακύμανση)	73 \pm 124.3 (12-660)	49.5 \pm 47.3 (8-237)
γ -GT (μέσος όρος \pm SD, διακύμανση)	69.9 \pm 100.7 (10-436)	78.7 \pm 81 (10-448)
Crea (μέσος όρος \pm SD, διακύμανση)	0.82 \pm 0.14 (0.6-1.1)	1.05 \pm 0.48 (0.6-2.6)
INR (μέσος όρος \pm SD, διακύμανση)	1.07 \pm 0.09 (1-1.33)	1.42 \pm 0.37 (1-2.59)
MELD score (μέσος όρος \pm SD, διακύμανση)		13.7 \pm 5.9 (6-28)

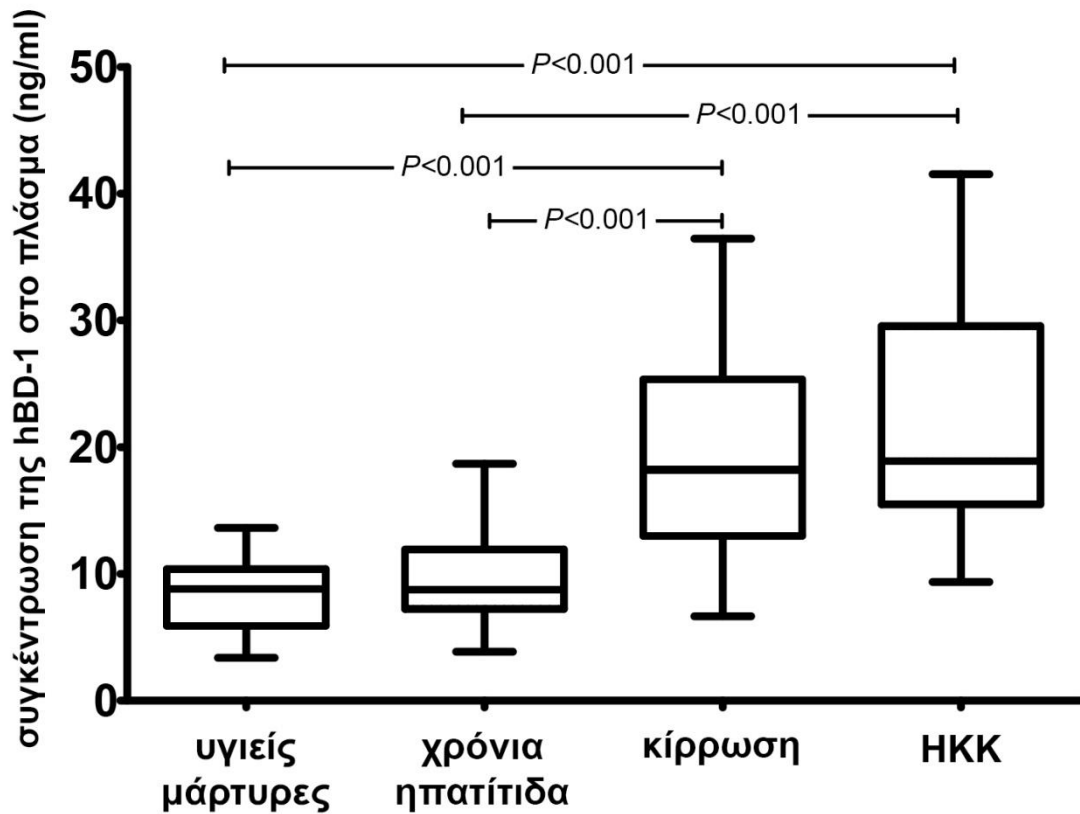
4.2. Η διαλυτή hBD-1 είναι αυξημένη στους ασθενείς με κίρρωση του ήπατος

Αρχικά, μετρήθηκε η συγκέντρωση της hBD-1 στο πλάσμα των ασθενών με κίρρωση του ήπατος σε σύγκριση με ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα και τους υγιείς μάρτυρες. Βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της hBD-1 στο πλάσμα των κίρρωτικών ασθενών (18.26 ng/ml, 16.65-21.94, διάμεσος, 95%CI) ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (8.85 ng/ml, 7.46-9.69, $P < 0.0001$), και τους ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (8.87 ng/ml, 9.09-12.88, $P < 0.0001$). (Γράφημα 1) Παρομοίως, οι ασθενείς με ΗΚΚ είχαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα hBD-1 στο πλάσμα (20.76 ng/ml, 17.44-34.26,

$P < 0.0001$ για τη σύγκριση είτε με τους υγιείς μάρτυρες είτε με τους ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της κίρρωσης και του ΗΚΚ ούτε ανάμεσα της χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας και των υγιών μαρτύρων. Επιπροσθέτως, συγκρίθηκαν οι ασθενείς με ιογενή ηπατίτιδα και κίρρωση με εκείνους χωρίς κίρρωση. (Γράφημα 2) Όπως φαίνεται και από την εικόνα, η συγκέντρωση της hBD-1 στο πλάσμα είναι στατιστικώς σημαντικά αυξημένη στην κίρρωτική ιογενή ηπατίτιδα (20.46 ng/ml, 15.65-26.51, διάμεσος, 95%CI) σε σύγκριση με τους μη κίρρωτικούς ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (8.87 ng/ml, 9.09-12.88, $P < 0.0001$).

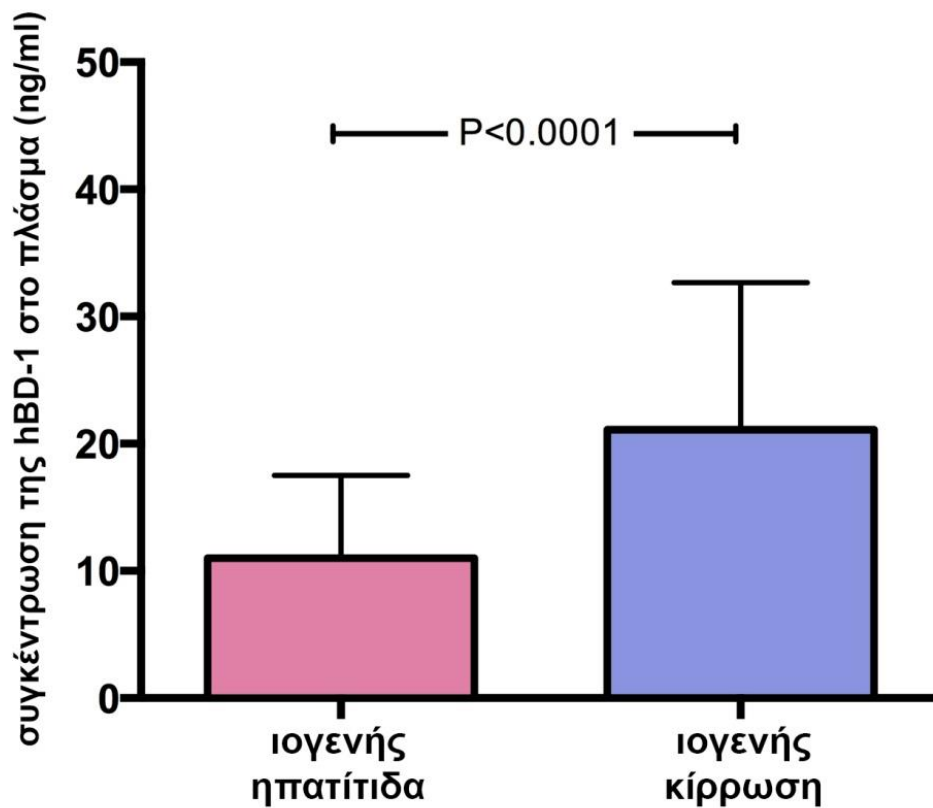
Εξετάστηκε επίσης αν η αύξηση της hBD-1 στο πλάσμα σχετιζόταν με κάποια συγκεκριμένη αιτιολογία της κίρρωσης ή αν η ίδια η κίρρωτική διαδικασία ήταν η αιτία της αυξημένης συγκέντρωσης. Για να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση, χωρίστηκαν οι ασθενείς με κίρρωση σε ομάδες ανάλογα με την υποκείμενη αιτία της κίρρωσης και έγινε σύγκριση των συγκεντρώσεων της hBD-1 ανάμεσα στις προαναφερθείσες ομάδες. (Γράφημα 3) Όπως φαίνεται και στην εικόνα, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για καμία από τις συγκρίσεις. Έγινε σύγκριση επίσης μεταξύ των ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα Β ή C. Ομοίως, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της hBD-1 (Γράφημα 3). Αντιθέτως, όταν έγινε ξεχωριστή ανάλυση στις υποομάδες της ηπατικής νόσου που σχετίζεται με την HBV ή HCV ηπατίτιδα, και στις δύο περιπτώσεις, υπήρχε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της hBD-1 στο πλάσμα στους κίρρωτικούς ασθενείς σε σύγκριση με εκείνους με χρόνια ηπατίτιδα.

Συμπερασματικά, αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα της hBD-1 σχετίζονται άμεσα με την παρουσία της ίδιας της κίρρωσης, ανεξάρτητα από την αιτιολογία της.



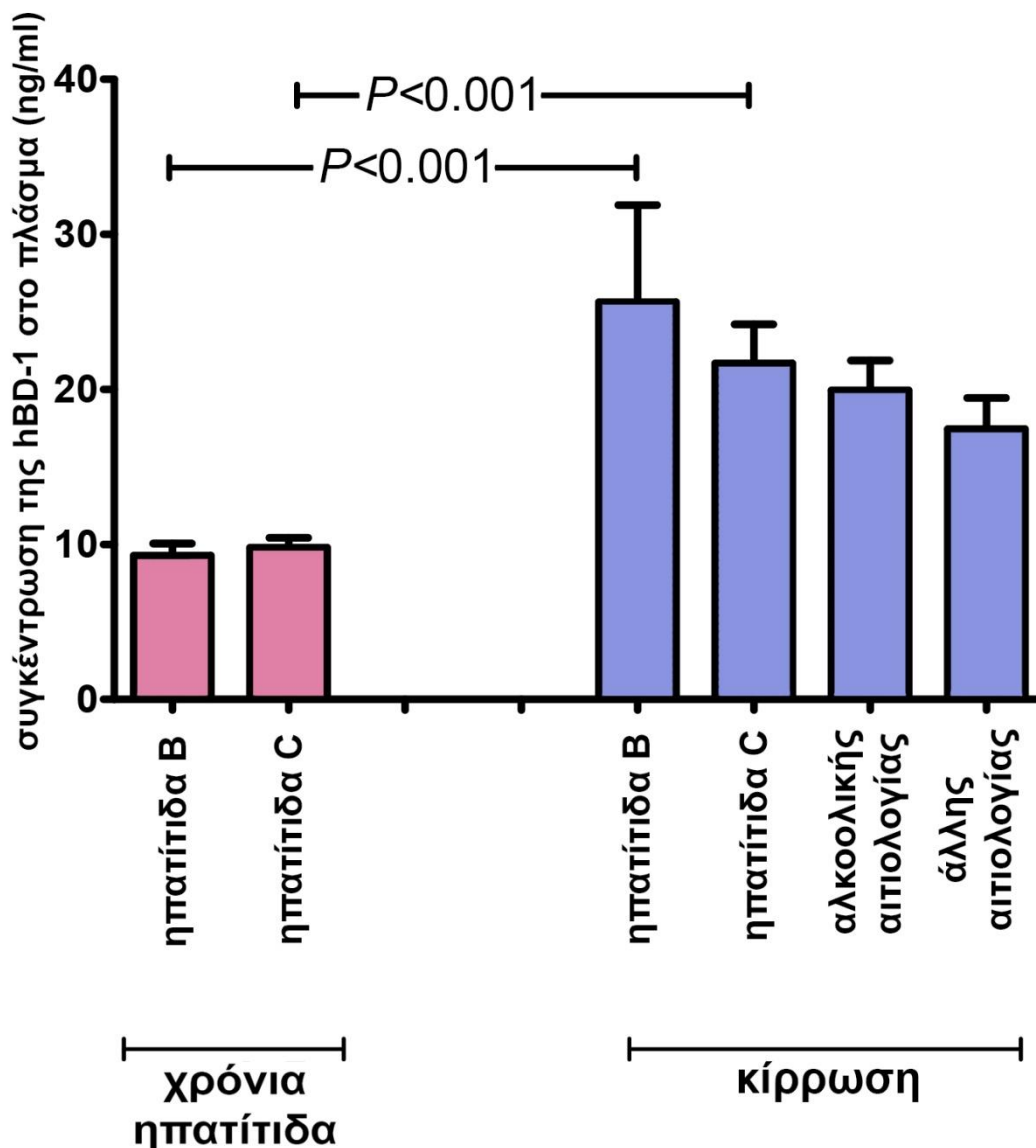
Γράφημα 1: Αυξημένα επίπεδα της hBD-1 στους κίρρωτικούς ασθενείς.

Η συγκέντρωση της hBD-1 στο πλάσμα των κίρρωτικών ασθενών (n=64) (συμπεριλαμβανομένου του ΗΚΚ(n=13)) είναι αυξημένη σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο σε σχέση με τους ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (n=47, $P < 0.001$) και τους υγιείς μάρτυρες (n=40, $P < 0.001$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με Whisker box-plots.



Γράφημα 2: Αυξημένα επίπεδα της hBD-1 στους κίρρωτικούς ασθενείς με ιογενή ηπατίτιδα.

Η συγκέντρωση της hBD-1 στο πλάσμα των κίρρωτικών ασθενών με ιογενή ηπατίτιδα ($n=20$) είναι αυξημένη σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο σε σχέση με τους ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα χωρίς κίρρωση ($n=47$, $P<0.0001$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με Whisker box-plots.



Γράφημα 3: Τα αυξημένα επίπεδα της hBD-1 στους κίρρωτικούς ασθενείς είναι ανεξάρτητα από την αιτιολογία της κίρρωσης.

Παριστάνεται η συγκέντρωση της hBD-1 ανάλογα με την ειδική αιτιολογία της ηπατικής νόσου. [χρόνια ηπατίτιδα B (n=22), χρόνια ηπατίτιδα C (n=25), HBV κίρρωση (n=9), HCV κίρρωση (n=20), αλκοολική κίρρωση (n=20), κίρρωση άλλης αιτιολογίας (n=15)]. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με Whisker box-plots.

4.3. Η hBD-1 στο πλάσμα σχετίζεται με τα επίπεδα του sCD14 στους κίρρωτικούς ασθενείς

Στη συνέχεια τέθηκε το ερώτημα αν η αυξημένη έκφραση της hBD-1 στους κίρρωτικούς ασθενείς αντανακλά την παρουσία βακτηριακής αλλόθεσης. Για να εξεταστεί αυτή η πιθανότητα, μελετήθηκε αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της hBD-1 με αποδεκτούς δείκτες βακτηριακής αλλόθεσης. Ένας αποδεκτός, έμμεσος δείκτης βακτηριακής αλλόθεσης είναι το sCD14. Το sCD14, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί έναν δείκτη της δραστηριότητας του LPS αφού η έκφρασή του είναι αποτέλεσμα της επαγόμενης από το LPS ενεργοποίησης των μυελοειδών κυττάρων, κατά συνέπεια η παρουσία του sCD14 υποδηλώνει βακτηριαμία λόγω βακτηριακής αλλόθεσης.

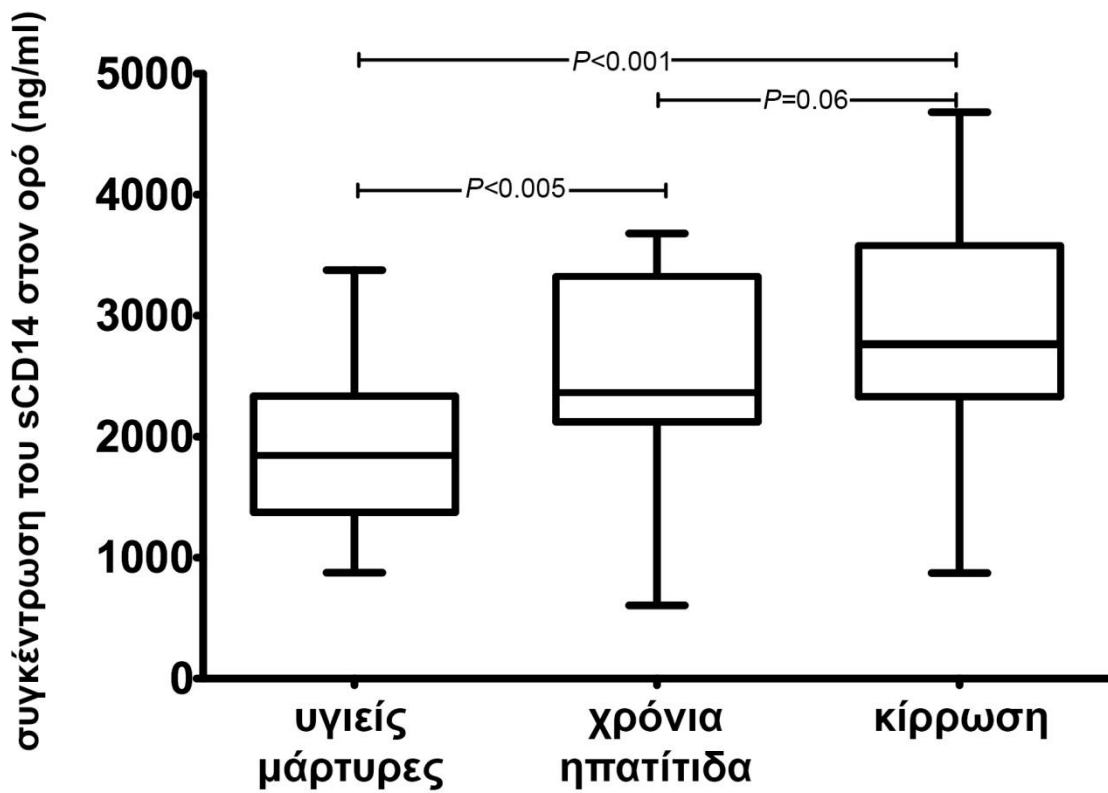
Αρχικά, μετρήθηκαν τα επίπεδα του sCD14 στον ορό των ίδιων ασθενών. Η συγκέντρωση του sCD14 στη συστηματική κυκλοφορία, όπως και της hBD-1, ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με κίρρωση (2777 ng/ml, 2701-3133, διάμεσος, 95%CI), σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (1671 ng/ml, 1574-2026, διάμεσος, 95%CI) ($P < 0.0001$). Σε αντίθεση με την hBD-1, οι ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα εξέφραζαν υψηλότερα επίπεδα sCD14 σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (Γράφημα 4). Τα επίπεδα του sCD14, όπως και της hBD-1, δεν επηρεαζόταν από κάποια συγκεκριμένη αιτία της κίρρωσης. (Γράφημα 5)

Η υπόθεση ότι τα αυξημένα επίπεδα των hBD-1 και sCD14 στους κίρρωτικούς ασθενείς υποδεικνύουν την παρουσία βακτηριακής αλλόθεσης θα ήταν σωστή αν υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο μορίων, όταν αναλύονταν οι μετρήσεις σε κάθε ασθενή ξεχωριστά. Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε η συγκεκριμένη συσχέτιση στον πληθυσμό των κίρρωτικών που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, η συσχέτιση ήταν πιο ισχυρή στις συγκεντρώσεις των δύο μορίων στο αίμα που απομονώθηκε από τις ηπατικές φλέβες (Spearman $r=0.6$, $P=0.0045$) (Γράφημα 6β). Η συσχέτιση της hBD-1 με το sCD14 στο περιφερικό αίμα ήταν οριακά σημαντική ($P=0.0528$) (Γράφημα 6α).

Επιπροσθέτως, για να ελεγχθεί σε μεγαλύτερο βαθμό η συσχέτιση των ανωτέρω μορίων με τη βακτηριακή αλλόθεση, εξετάστηκε αν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα

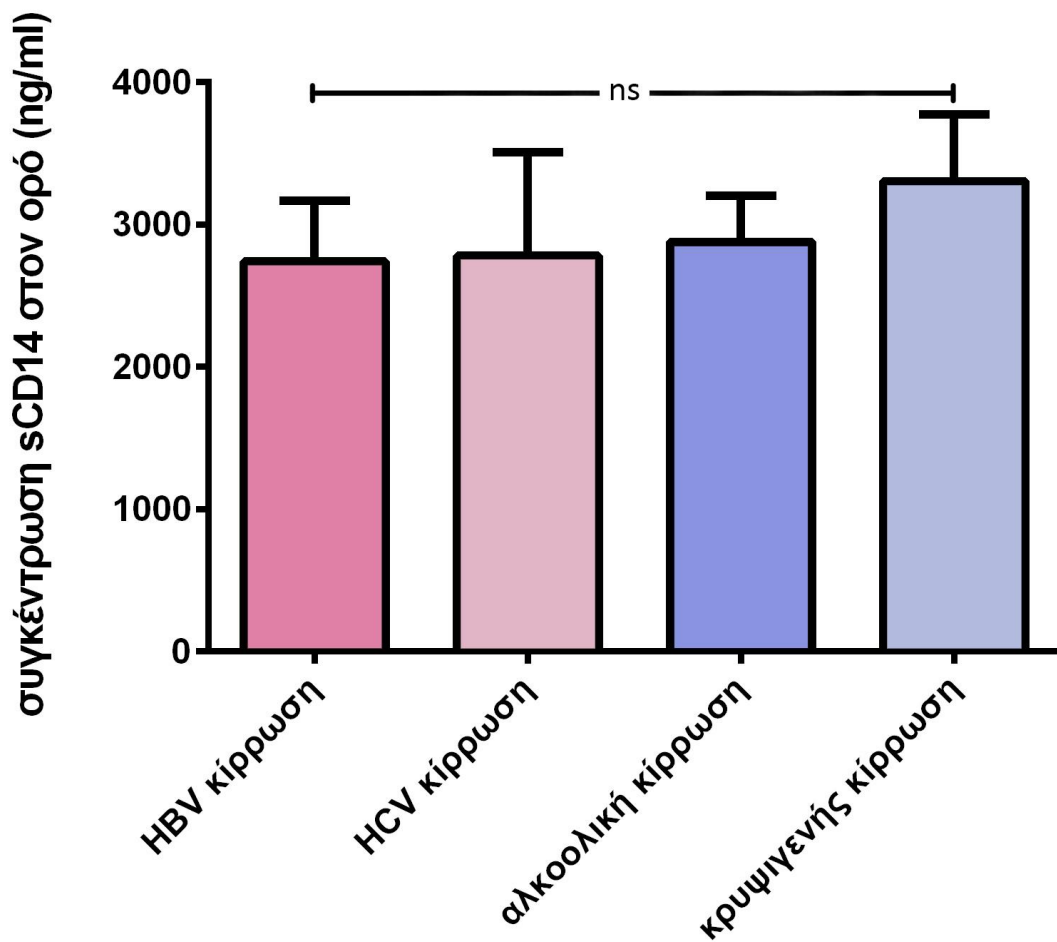
στο sCD14 και την LBP, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί συχνά από την ερευνητική κοινότητα ως έμμεσος δείκτης βακτηριακής αλλόθεσης. Η ανάλυση σε μία υποκατηγορία των υπό μελέτη κίρρωτικών ασθενών ανέδειξε μία πολύ υψηλή στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο μορίων. (Γράφημα 7)

Συμπερασματικά, μία πιθανή ερμηνεία των ανωτέρω αποτελεσμάτων θα ήταν ότι η αύξηση της hBD-1 στην κίρρωση μπορεί να είναι αποτέλεσμα της βακτηριακής αλλόθεσης.



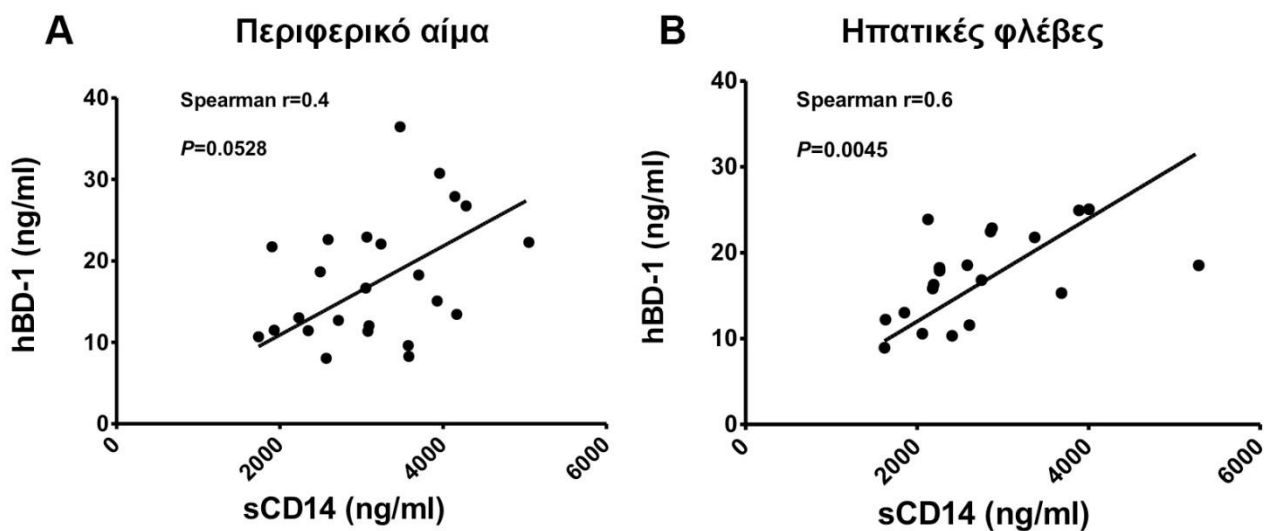
Γράφημα 4: Αυξημένα επίπεδα του *sCD14* στον ορό των κίρρωτικών ασθενών.

Η συγκέντρωση του *sCD14* στον ορό των κίρρωτικών ασθενών ($n=50$, $P<0.001$) και των ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα ($n=26$, $P<0.005$) είναι αυξημένη σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες ($n=31$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με *Whisker box-plots*.



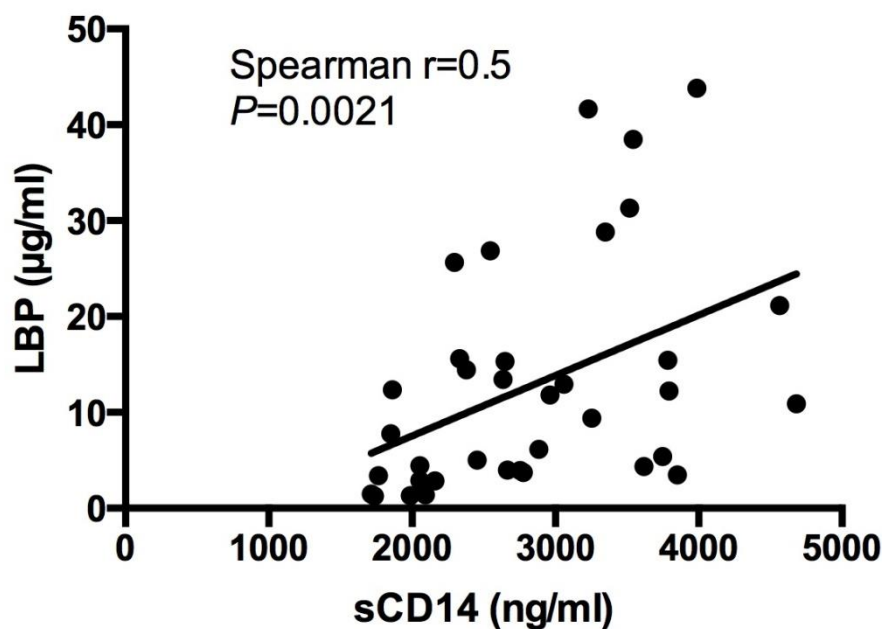
Γράφημα 5: Τα αυξημένα επίπεδα του sCD14 στους κίρρωτικούς ασθενείς είναι ανεξάρτητα από την αιτιολογία της κίρρωσης.

Παριστάνεται η συγκέντρωση του sCD14 ανάλογα με την ειδική αιτιολογία της ηπατικής νόσου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με Whisker box-plots ως μέση τιμή με 95%CI.



Γράφημα 6: Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της hBD-1 και του sCD14 στις ηπατικές φλέβες των κίρρωτικών ασθενών. (Γράφημα 6β)

Οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση των hBD-1 και sCD14 στη συστηματική κυκλοφορία των κίρρωτικών ασθενών (Γράφημα 6α). Κάθε τελεία αντιπροσωπεύει ξεχωριστό ασθενή με κίρρωση του ήπατος. Η ανάλυση έγινε σε δείγματα που συλλέχθηκαν από τις περιφερικές φλέβες ($n=25$, Γράφημα 6α) και από τις ηπατικές φλέβες ($n=20$, Γράφημα 6β).



Γράφημα 7: Υψηλή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της LBP και του sCD14 στον ορό των κίρρωτικών ασθενών.

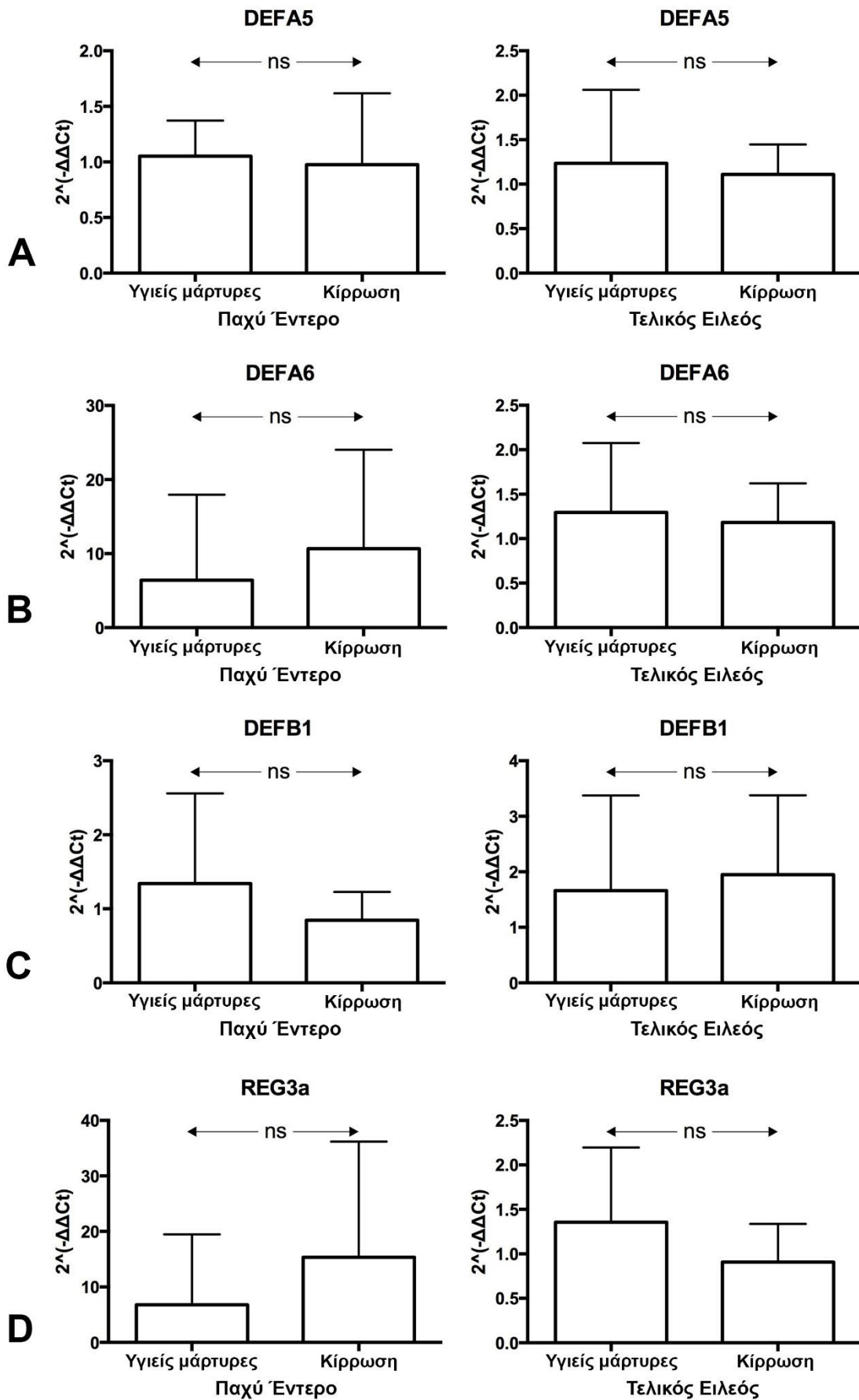
Οι συγκεντρώσεις των LBP και sCD14 στον ορό των κίρρωτικών ασθενών έχουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P=0.0021$). Κάθε τελεία αντιπροσωπεύει ξεχωριστό ασθενή με κίρρωση του ήπατος ($n=36$). Η ανάλυση έγινε σε δείγματα που συλλέχθηκαν από τις περιφερικές φλέβες.

4.4. Η έκφραση του mRNA των φυσικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων στον τελικό ειλεό ή στο παχύ έντερο δεν μεταβάλλεται στους ασθενείς με κίρρωση του ήπατος

Μία πιθανή αιτία παθογένεσης της βακτηριακής αλλόθεσης είναι η δυσλειτουργία του επιθηλιακού φραγμού του εντέρου και η έκπτωση των αμυντικών μηχανισμών στην ηπατική νόσο τελικού σταδίου. Μέρος της φυσικής ανοσίας του εντέρου αποτελούν και τα αντιμικροβιακά πεπτίδια. Σκοπός αυτού του τμήματος της μελέτης ήταν να εξεταστεί αν η παρουσία της κίρρωσης επηρεάζει την έκφραση των φυσικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων τοπικά στο εντερικό επιθήλιο του λεπτού ή του παχέος εντέρου σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες.

Έγινε σύγκριση της σχετικής έκφρασης του mRNA για διάφορα αντιμικροβιακά πεπτίδια από ολικό RNA εντερικών βιοψιών, οι οποίες ελήφθησαν μέσω ενδοσκοπήσεων. Για κανένα από τα αντιμικροβιακά πεπτίδια που μελετήθηκαν (HD-5, HD-6, hBD-1, REG3a), δεν υπήρχαν διαφορές στην έκφραση μεταξύ των υγιών μαρτύρων και των κίρρωτικών ούτε στον τελικό ειλεό ούτε στο παχύ έντερο (Γράφημα 8). Βάσει των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων, συμπεραίνεται ότι ένα ποσοτικό έλλειμμα στην τοπική από το εντερικό σωλήνα παραγωγή των αντιμικροβιακών πεπτιδίων δε λαμβάνει χώρα στην κίρρωση. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι τόσο στους ασθενείς με κίρρωση του ήπατος όσο και στους υγιείς μάρτυρες, η HD-5 εκφράζεται σε στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στον τελικό ειλεό σε σύγκριση με το παχύ έντερο (Γράφημα 9), αποτελέσματα που συμφωνούν με τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την σχεδόν αποκλειστική παραγωγή της A5 ντεφενσίνης από τα κύτταρα του Paneth στον τελικό ειλεό. Στην περίπτωση της hBD-1, έχει αποδειχθεί ότι μεταξύ άλλων κυττάρων, παράγεται και από τα επιθηλιακά κύτταρα κυρίως του παχέος εντέρου. Στην παρούσα μελέτη, τα αποτελέσματα συμφωνούν με την υψηλότερη έκφραση σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο της hBD-1 στο παχύ έντερο σε σχέση με τον τελικό ειλεό στους υγιείς μάρτυρες. Αντιθέτως στους ασθενείς με κίρρωση του ήπατος, αυτή η διαφορά φαίνεται να εκλείπει, καθώς η hBD-1 εκφράζεται σε παρόμοια επίπεδα τόσο στον τελικό ειλεό όσο και στο παχύ

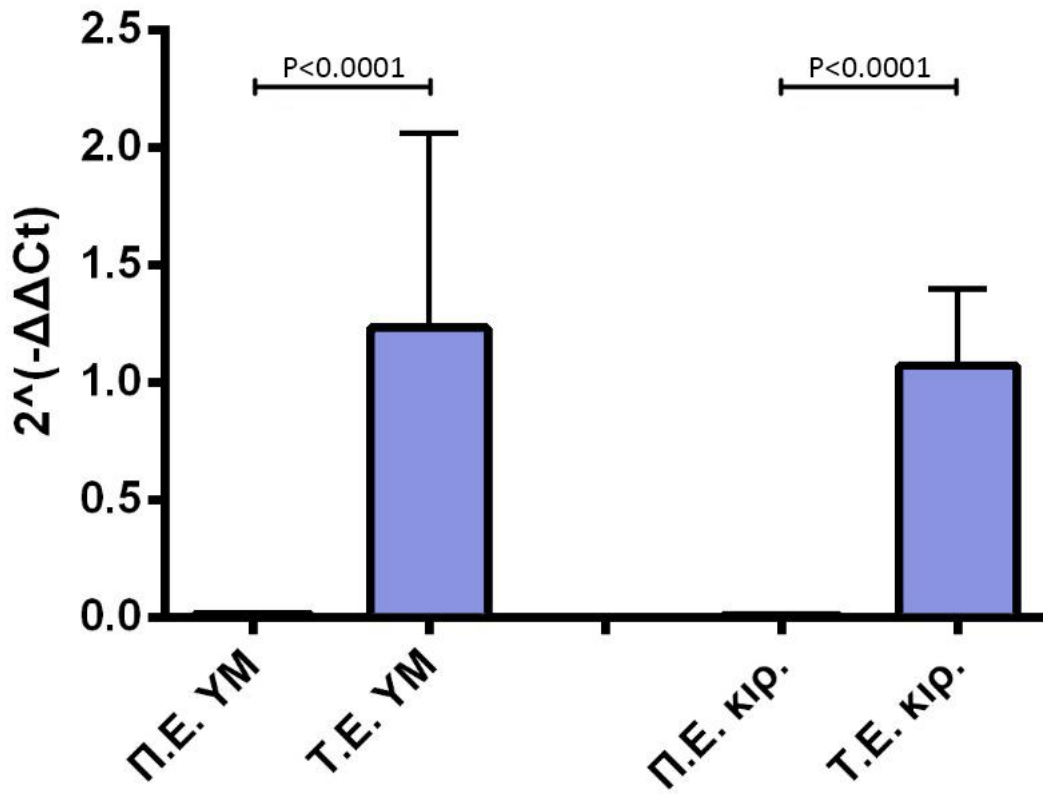
έντερο των κίρρωτικών ασθενών. (Γράφημα 10) Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα εγείρει το ερώτημα αν στην περίπτωση των κίρρωτικών ασθενών υπάρχει μεγαλύτερη παραγωγή της hBD-1 από τα κύτταρα του τελικού ειλεού και αυτή η παραγωγή αντανακλά στα αυξημένα επίπεδα της hBD-1 στην περιφερική κυκλοφορία των κίρρωτικών ασθενών. Είναι, επίσης πιθανό αυτή η αύξηση να οφείλεται στην πιθανή παρουσία μεταπλαστικών κυττάρων στον τελικό ειλέο ασθενών με χρόνια ηπατική νόσο.



Γράφημα 8: Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση του mRNA των αντιμικροβιακών πεπτιδίων στον εντερικό βλεννογόνο μεταξύ κίρρωτικών ασθενών και υγιών μαρτύρων.

Η έκφραση του mRNA για τις (A) *defa5*, (B) *defa6*, (C) *defb1*, και (D) *reg3a* υπολογίστηκε σε ολικό RNA που απομονώθηκε από εντερικές βιοψίες που συλλέχθηκαν μέσω ενδοσκόπησης από κίρρωτικούς ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Η σχετική έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων υπολογίστηκε με τη $2^{-\Delta\Delta Ct}$ μέθοδο, χρησιμοποιώντας το RPLP0 ως γονίδιο αναφοράς. Δεν ανευρέθησαν διαφορές μεταξύ των υγιών μαρτύρων και των κίρρωτικών ασθενών για κανένα από τα αντιμικροβιακά πεπτίδια που μελετήθηκαν τόσο στον τελικό ειλέο όσο και στο παχύ έντερο.

DEFA5

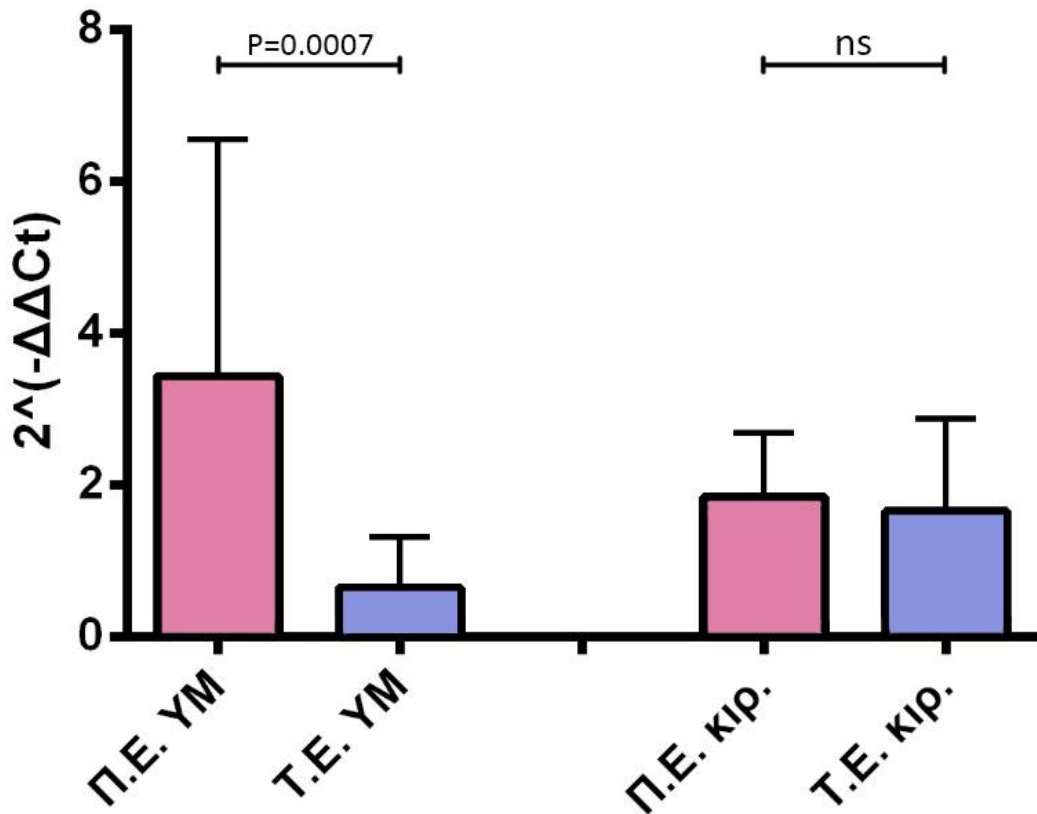


Γράφημα 9: Η A5 ντεφενσίνη εκφράζεται αποκλειστικά στον τελικό ειλεό.

Η έκφραση του mRNA για την *defa5* υπολογίστηκε σε ολικό RNA που απομονώθηκε από εντερικές βιοψίες που συλλέχθηκαν μέσω ενδοσκόπησης από κίρρωτικούς ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Η σχετική έκφραση της DEFA5 υπολογίστηκε με τη $2^{-\Delta\Delta Ct}$ μέθοδο, χρησιμοποιώντας το RPLP0 ως γονίδιο αναφοράς. Η DEFA5 εκφράζεται κατ'εξοχήν από τον τελικό ειλεό τόσο στους κίρρωτικούς ασθενείς όσο και στους υγιείς μάρτυρες, ενώ παρατηρείται πολύ μικρή έκφραση στο παχύ έντερο.

Π.Ε. παχύ έντερο, Τ.Ε. τελικός ειλεός, ΥΜ υγιείς μάρτυρες, κίρ κίρρωση του ήπατος.

DEFB1



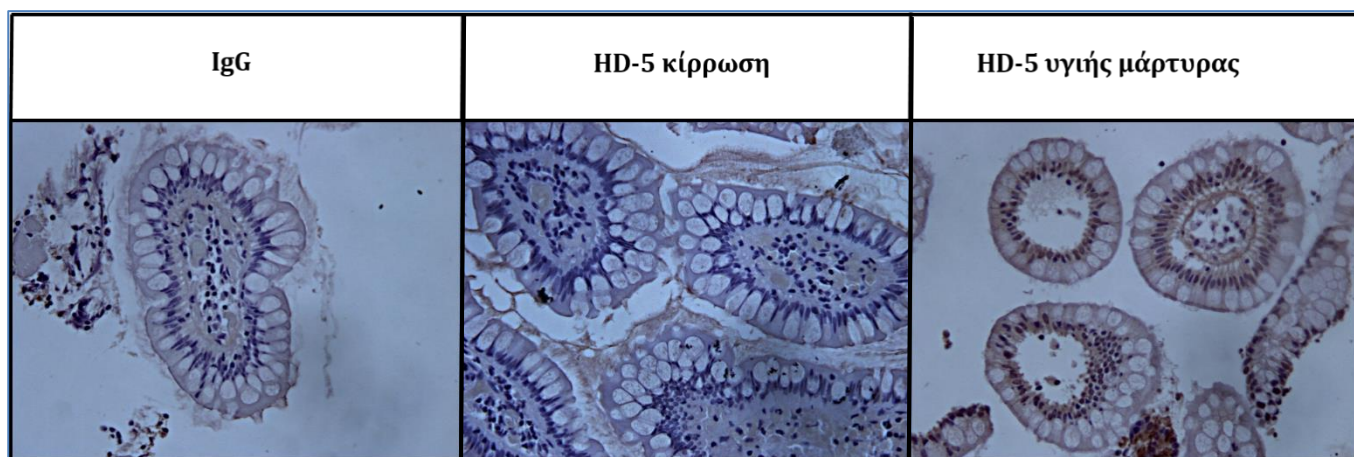
Γράφημα 10: Η B1 ντεφενσίνη εκφράζεται κυρίως στο παχύ έντερο των υγιών μαρτύρων.

Η έκφραση του mRNA για την *defb1* υπολογίστηκε σε ολικό RNA που απομονώθηκε από εντερικές βιοψίες που συλλέχθηκαν μέσω ενδοσκόπησης από κίρρωτικούς ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Η σχετική έκφραση της *DEFB1* υπολογίστηκε με τη $2^{-\Delta\Delta Ct}$ μέθοδο, χρησιμοποιώντας το *RPLP0* ως γονίδιο αναφοράς. Η *DEFB1* εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στο παχύ έντερο από τον τελικό ειλέο στους υγιείς μάρτυρες, ενώ στους κίρρωτικούς έχει την ίδια έκφραση και στους δύο ιστούς.

Π.Ε. παχύ έντερο, Τ.Ε. τελικός ειλέος, ΥΜ υγιείς μάρτυρες, κίρ κίρρωση του ήπατος, ns non significant (όχι στατιστικά σημαντικό)

4.5. Η έκφραση της HD-5 σε επίπεδο ιστού.

Στα πειράματα ανοσοϊστοχημείας, μελετήθηκε η ιστική έκφραση σε επίπεδο πρωτεΐνης της HD-5. Όπως φαίνεται ενδεικτικά στην Εικόνα 10, παρατηρείται έκφραση της πρωτεΐνης ενδοκυτταρικά (καφέ χρώση) στη βιοψία από τον υγιή μάρτυρα, ενώ είναι μειωμένη στον κίρρωτικό ασθενή. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δεν είναι σαφή, καθώς δεν υπάρχει ουσιώδης διαφορά ανάμεσα στους κίρρωτικούς ασθενείς και στους υγιείς μάρτυρες σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν. Ενδεχομένως, λόγω της ιδιαιτερότητας της λήψης βιοψιών μέσω ενδοσκοπήσεων, τον μικρό αριθμό δειγμάτων (τρεις ασθενείς και τρεις υγιείς μάρτυρες) στα οποία εφαρμόστηκε η συγκεκριμένη μέθοδος, τον μικρό ποσοστό των απεικονιζομένων κυττάρων και της διαφορετικής διατομής λήψης του τεμαχιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να συναχθούν με ασφάλεια όσον αφορά στην απεικονιστική μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Σε κάθε δείγμα, εξετάστηκε και το αρνητικό κοντρόλ (αντί για πρωτογενές αντίσωμα τοποθετήθηκε IgG του ζώου που είχε παραχθεί το αντίσωμα) για να αποκλειστεί η πιθανότητα της μη ειδικής σύνδεσης.

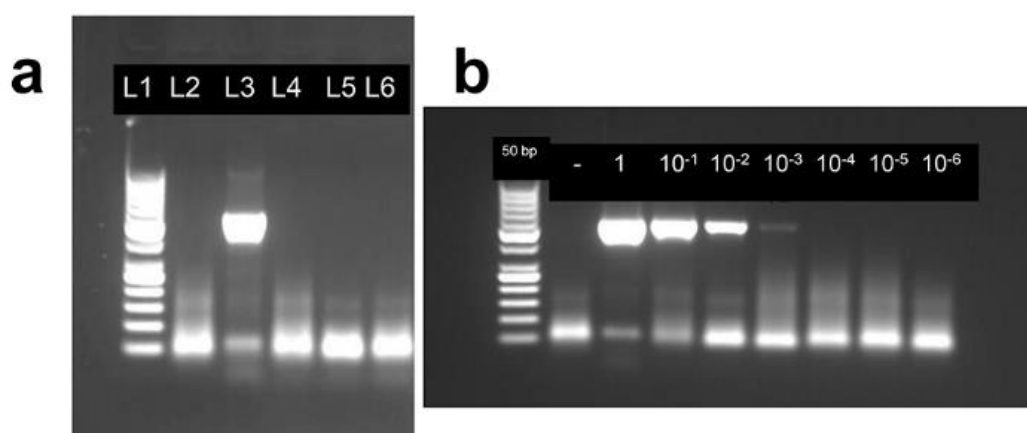


Εικόνα 10: Η έκφραση της A5 defensin με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας.

Αριστερά, το αρνητικό κοντρόλ, χωρίς το πρωτογενές αντίσωμα, μόνο IgG. Στο κέντρο, η A5 defensin σε βιοψία τελικού ειλεού από κίρρωτικό ασθενή. Δεξιά, η A5 defensin σε βιοψία τελικού ειλεού από υγιή μάρτυρα. Με καφέ χρωματισμό, τα κύτταρα που είναι θετικά σε A5 defensin.

4.6. Αδυναμία ανίχνευσης του βακτηριακού DNA.

Δεν κατέστη εφικτή η ανίχνευση του βακτηριακού DNA στον ορό των κίρρωτικών ασθενών, όπως φαίνεται στην εικόνα 11α. Μία πιθανή ερμηνεία είναι το όριο ανίχνευσης του βακτηριακού DNA με βάση τη χρησιμοποιηθείσα μέθοδο, το οποίο αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 15.8 pg/μl, όπως φαίνεται στην εικόνα 11β.



Εικόνα 11: Το βακτηριακό DNA δεν ανιχνεύεται στον ορό των κίρρωτικών ασθενών.

Δεν ανιχνεύθηκε βακτηριακό DNA στον ορό των κίρρωτικών ασθενών. Το ολικό DNA απομονώθηκε από τον ορό των κίρρωτικών ασθενών και ενισχύθηκε το βακτηριακό 16S ριβοσωμικό DNA (rRNA) με καθολικούς εκκινητές, όπως περιγράφηκε στην ενότητα Ασθενείς και Μέθοδοι.

L1, 50bp κλίμακα εκκινητή, L2, αρνητικός μάρτυρας, L3, θετικός μάρτυρας, καλλιέργεια από χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο (*S. Aureus*, 540bp), L4-6, κίρρωτικοί ασθενείς. (Εικόνα 11α)

Το ολικό DNA απομονώθηκε από διαδοχικές αραιώσεις καλλιεργημένου *S. Aureus*. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν έναν ουδό (15.8 pg/μl) στην ανίχνευση του βακτηριακού DNA. (Εικόνα 11β)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κίρρωση του ήπατος αποτελεί μία νοσολογική οντότητα με πλήθος επιπλοκών, η πλειονότητα των οποίων έχουν σοβαρές συνέπειες τόσο ως προς την ποιότητα ζωής των κίρρωτικών ασθενών όσο ως προς την ίδια την επιβίωσή τους. Στην καθημερινή κλινική πρακτική, ασθενείς με τελικού σταδίου ηπατική νόσο νοσηλεύονται για την αντιμετώπιση των επιπλοκών της νόσου, όπως οι ανακουφιστικές παρακεντήσεις του ασκίτικού υγρού, η αντιμετώπιση των αιμορραγιών δεδομένης της αιμορραγικής διάθεσης των κίρρωτικών ασθενών, οι λοιμώξεις αφού εκπίπτει η ανοσολογική τους απόκριση.

Πεδίο συστηματικής έρευνας στο τομέα της Ηπατολογίας, αποτελεί η ανεύρεση μεθόδου πρώιμης διάγνωσης των ασθενών υψηλού κινδύνου εμφάνισης επιπλοκών, όπως των λοιμώξεων, όπως επίσης και κατανόηση των βιολογικών μονοπατιών, των μορίων που εμπλέκονται και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους με σκοπό την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων σε πρώιμο στάδιο της νόσου. Μέχρι σήμερα, η διατήρηση του ιού (στις περιπτώσεις ιογένους αιτιολογίας ηπατικής νόσου) σε χαμηλά επίπεδα ήταν η κύρια θεραπευτική παρέμβαση για την αναστολή της εξέλιξης της χρόνιας ηπατοπάθειας. Κατανοώντας, όμως, σε βάθος τους μηχανισμούς που ενέχονται σε μοριακό επίπεδο στην εξέλιξη της ίνωσης, στην ανάπτυξη της πυλαίας υπέρτασης, στην βακτηριακή αλλόθεση θα έδινε τη δυνατότητα ανεύρεσης νέων πιθανών θεραπευτικών στόχων σε μοριακό επίπεδο. Επιπλέον, η ύπαρξη δεικτών βακτηριακής αλλόθεσης, οι οποίοι θα είναι εύκολα μετρήσιμοι ακόμη και στο περιφερικό αίμα, θα παρείχε τη δυνατότητα προσυμπτωματικού ελέγχου του πληθυσμού με τελικού σταδίου ηπατικής νόσου, πρώιμης διάγνωσης και πρόληψης-αντιμετώπισης των υποτροπών σε ασθενείς υψηλού κινδύνου. Εξαιτίας της σοβαρότητας των επιπλοκών και των ουσιαστικών οφελών της πρώιμης διάγνωσης, η έρευνα στον συγκεκριμένο τομέα αναδεικνύεται σε ζωτικής σημασίας.

Η παρούσα ερευνητική προσπάθεια αφορά στην μελέτη της έκφρασης των φυσικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων, με ιδιαίτερη έμφαση στη hBD-1, σε ασθενείς με τελικού σταδίου ηπατική νόσο και της συσχέτισής τους με έμμεσους

δείκτες βακτηριακής αλλόθεσης. Από τα πειραματικά δεδομένα, καταγράφεται η αύξηση των επιπέδων στη συστηματική κυκλοφορία του αντιμικροβιακού πεπτιδίου hBD-1 στους ασθενείς με κίρρωση του ήπατος. Αυτή η αύξηση φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της ίδιας της κίρρωτικής διαδικασίας, ανεξάρτητα από την αιτιολογία της ηπατικής νόσου. Παράλληλα, αυξημένα στους κίρρωτικούς ασθενείς εμφανίζονται και τα επίπεδα του sCD14, ενός δείκτη του κυκλοφορούντος LPS και της βακτηριαμίας από gram αρνητικά μικρόβια στην κίρρωση. Επιπλέον, η συγκέντρωση της hBD-1 αποδεικνύεται να έχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την αντίστοιχη του sCD14 στις ηπατικές φλέβες, ενώ στο περιφερικό αίμα είναι οριακά σημαντική. Αυτή η συσχέτιση ενισχύει την υπόθεση ότι η ενισχυμένη έκφραση της hBD-1 πιθανώς αποτελεί απάντηση στην ύπαρξη βακτηριακής αλλόθεσης και κατά συνέπεια την ανάδειξη της hBD-1 ως εμμέσου δείκτη της.

Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει την έκφραση του sCD14 στις χρόνιες ηπατοπάθειες. Οι Sandler et al είχαν δείξει συσχέτιση των επιπέδων του sCD14 με την εξέλιξη της ηπατοπάθειας σε ασθενείς με λοίμωξη από HBV ή HCV και πρότειναν επίσης το sCD14 ως δείκτη διαχωρισμού των ασθενών με σοβαρή ίνωση. Η αύξηση αυτή δεν παρατηρήθηκε μόνο στο περιφερικό αίμα, αλλά και τοπικά στο ήπαρ ως θετικά στο CD14 κύτταρα. Επιπροσθέτως, κατέγραψαν τη θεωρία ότι η παρουσία LPS, όπως υποδηλώνεται μέσω του sCD14, πιθανώς προάγει την ινωτική διαδικασία ενεργοποιώντας ένα μονοπάτι παραγωγής προ-ινωτικών παραγόντων μέσω των HSCs. [62] Παρόμοια συσχέτιση του sCD14 με το βαθμό της ηπατικής ίνωσης, τόσο στο περιφερικό αίμα όσο και στο ηπατικό παρέγχυμα, έχει επιβεβαιωθεί και στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος. [65] Αυξημένα περιφερικά επίπεδα του sCD14 έχουν παρατηρηθεί και σε άλλης αιτιολογίας χρόνιες ηπατοπάθειες, όπως στην αλκοολική ηπατοπάθεια [56] και στην HIV-ηπατοπάθεια είτε με συλλοίμωξη του HCV ιού είτε χωρίς κάποιον άλλο ηπατοτρόπο ιό. [63, 64] Ενώ ενδιαφέρουσα είναι και η συσχέτιση ενός συγκεκριμένου γονοτύπου του, CD14/-159TT, με την πρόοδο της αλκοολικής ηπατικής νόσου. [112] Το sCD14 δεν έχει προταθεί μόνο ως δείκτης προόδου της νόσου, αλλά και ως δείκτης βακτηριακής αλλόθεσης, αφού ερευνητικές ομάδες

συσχετίζουν σημαντικά τα επίπεδα του βακτηριακού DNA στο ήπαρ με την τοπική έκφραση του CD14 στην αλκοολική ηπατοπάθεια [61].

Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώνεται ότι το sCD14 υπερεκφράζεται στους ασθενείς με χρόνια ηπατοπάθεια, ανεξάρτητα από την αιτιολογία της νόσου, σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, δεδομένα που συνάδουν με άλλες ερευνητικές ομάδες. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα του sCD14 ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα στον όρο τόσο των ασθενών με κίρρωση του ήπατος όσο και στη χρόνια ιογενή ηπατίτιδα σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Οι προαναφερθείσες δημοσιεύσεις αφορούν η κάθε μία σε ξεχωριστή αιτιολογία της χρόνιας ηπατοπάθειας και καταλήγουν σε συναφή αποτελέσματα. Στην παρούσα μελέτη σε μία προσπάθεια να αποφευχθούν οι διακυμάνσεις εξαιτίας των διαφορετικών εργαστηρίων και συνθηκών, συμπεριλήφθηκαν στην ίδια έρευνα ασθενείς με διαφόρων αιτιών χρόνια ηπατοπάθεια (χρόνια ηπατίτιδα B και C, αλκοολική, κρυψιγενής ηπατική νόσος). Με αυτό τον τρόπο η αύξηση του sCD14 συσχετίζεται με την ίδια την ηπατική νόσο και όχι με την αιτία που την προκαλεί. Συγχρόνως, για να αποδειχθεί η χρησιμότητα του sCD14 ως δείκτη βακτηριακής αλλόθεσης, έγινε συσχέτιση της έκφρασης του σε μία υποομάδα κίρρωτικών ασθενών με την LBP. Η LBP, όπως προαναφέρθηκε, προσδένει το LPS και παρουσία του αυξάνεται η έκφρασή της, εμμέσως λοιπόν υποδηλώνει την παρουσία βακτηριακής αλλόθεσης από gram αρνητικά μικρόβια. Συνεπακόλουθα, το sCD14 θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ομοίως ως έμμεσος δείκτης βακτηριακής αλλόθεσης.

Παράλληλα, η συγκεκριμένη έρευνα πραγματεύεται την έκφραση ενός αντιμικροβιακού πεπτιδίου στη χρόνια ηπατική νόσο. Μέχρι σήμερα, ελάχιστες είναι οι ερευνητικές προσπάθειες στο τομέα της ηπατολογίας όσον αφορά στα αντιμικροβιακά πεπτίδια, τα οποία αποτελούν μέρος της φυσικής ανοσίας του οργανισμού έναντι βακτηρίων, μυκήτων και ιών. Για την αντική τους δράση εναντίον ορισμένων ιών, μεταξύ άλλων του HSV και του HIV, έχουν προταθεί συγκεκριμένοι μηχανισμοί δράσης. [113] Προσφάτως, οι Aceti et al καταγράφουν επίσης την αυξημένη έκφραση των ουδετερόφιλων ντεφενσινών (HNP) από τα μονοκύτταρα ασθενών που πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα C. Συγκεκριμένα, τονίζουν ότι η πρωτεΐνη του πυρήνα του ιού της ηπατίτιδας C επάγει τη

μεταγραφή των α-ντεφενσινών και ότι τα κυκλοφορούντα επίπεδα των HNPc συσχετίζονται με το βαθμό της ίνωσης του ηπατικού παρεγχύματος. [114] Ενώ λίγο νωρίτερα, μία άλλη έρευνα αναφέρεται στο ρόλο των β-ντεφενινών ως της φυσικής ανοσίας του χοληφόρου δέντρου. [115]

Στην παρούσα μελέτη, επισημαίνεται η αύξηση του φυσικού αντιμικροβιακού πεπτιδίου hBD-1 στη συστηματική κυκλοφορία των κίρρωτικών ασθενών. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η συγκεκριμένη υψηλή έκφραση της hBD-1 συνδέεται με την κίρρωση του ήπατος. Πρωτίστως, οι κίρρωτικοί ασθενείς εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις της hBD-1 στο πλάσμα, σε σύγκριση τόσο με τους υγιείς μάρτυρες όσο και με τους ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα. Ειδικότερα, η αύξηση της hBD-1 ήταν ανεξάρτητη με την αίτια της κίρρωσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι ανάμεσα στους ασθενείς με ηπατική νόσο που σχετίζεται με τον ιό της ηπατίτιδας Β ή C, μόνο οι ασθενείς με κίρρωση (και όχι εκείνοι με χρόνια ηπατίτιδα) είχαν αυξημένα επίπεδα της hBD-1. Εξ όσων είναι γνωστό, η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί την πρώτη αναφορά αυξημένης έκφρασης ενός αντιμικροβιακού πεπτιδίου στους κίρρωτικούς ασθενείς. Συμπληρωματικά, από τα ευρήματα αυτής της έρευνας και των προηγούμενων μελετών, καθίσταται φανερό ότι διάφοροι παράγοντες επαγόμενοι από βακτήρια υπερεκφράζονται στην κίρρωση και οι συγκεντρώσεις τους γίνονται ανιχνεύσιμες ή αυξάνονται στη συστηματική κυκλοφορία των ασθενών. Αυτό αποτελεί μία έμμεση απόδειξη της ύπαρξης βακτηριακής αλλόθεσης σε αυτή την κατηγορία των ασθενών.

Αξίζει να τονισθεί εκ νέου ο ρόλος της πυλαίας υπέρτασης στην παθογένεια της βακτηριακής αλλόθεσης. Έκτος από την έκπτωση της ανοσολογικής απόκρισης των ασθενών με τελικού σταδίου ηπατική νόσο που τους καθιστά πιο επιρρεπείς στις λοιμώξεις, όπως έχει περιγραφεί νωρίτερα, διάφορες μελέτες τόσο σε ζωικά πειραματικά μοντέλα όσο και σε ανθρώπους, τόνιζουν το συσχετισμό μεταξύ πυλαίας υπέρτασης και βακτηριακής αλλόθεσης. Πειράματα σε μύς με προκλητή πυλαία υπέρταση παρουσιάζουν αυξημένη βακτηριακή αλλόθεση [116], εν μέρει ως αποτέλεσμα την αυξημένη εντερική επιθηλιακή διαπερατότητα. [117] Στον ανθρώπινο πληθυσμό, η πυλαία υπέρταση έχει συσχετιστεί όχι μόνο με τις τροποποιημένες ανοσολογικές αποκρίσεις [118], αλλά

και με την βακτηριακή υπερανάπτυξη, την αυξημένη εντερική διαπερατότητα και επηρεασμένη κινητικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη της βακτηριακής αλλόθεσης. [119] Αλλά και η ίδια η βακτηριακή αλλόθεση πυροδοτεί την επιδείνωση της πυλαίας υπέρτασης, διατηρώντας με αυτό τον τρόπο ένα μηχανισμό ανατροφοδότησης της μίας νοσολογικής οντότητας προς την άλλη. Η παρουσία του LPS με την πρόκληση αγγειοδιαστολής, και η ταυτόχρονη ενέργηση παραγόντων που ενέχονται στη διαδικασία της ίνωσης, όπως ο NF-κΒ [120, 121], μπορεί να οδηγήσουν στην επιδείνωση της πυλαίας υπέρτασης. [50, 51]

Η βακτηριακή αλλόθεση, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί μία σοβαρή κατάσταση, καθώς προδιαθέτει σε σοβαρές επιπλοκές της κίρρωσης. Συγχρόνως, η διάγνωση της λανθάνει στην πλειονότητα των περιπτώσεων, ελλείψει σαφούς κλινικής συμπτωματολογίας, αλλά και κάποιου δείκτη ανίχνευσής της καθημερινή κλινική πρακτική. Επομένως, η πρώιμη αναγνώρισή της με τη χρήση εύκολα μετρήσιμων, υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, βιολογικών δεικτών είναι εξέχουσας σημασίας. Συχνά, κατά τις συνήθεις μικροβιολογικές μεθόδους, καλλιέργειες αίματος και ασκίτικου υγρού, κανένας οργανισμός δεν απομονώνεται, ίσως λόγω υψηλής βακτηριακής οψωνινοποίησης, που τα καθιστά μη βιώσιμα στις συνήθεις καλλιέργειες και η ανάγκη ανεύρεσης νέων μεθόδων ανίχνευσης των βακτηρίων ακόμα και σε αρνητικές καλλιέργειες ήταν επιτακτική εξαιτίας της φτωχής πρόγνωσης των ασθενών με βακτηριακή αλλόθεση ακόμα κι αν κλινικά ήταν ασυμπτωματικοί. [39, 122, 123] Το βακτηριακό DNA, το οποίο είχε προταθεί ως πολλά υποσχόμενος δείκτης βακτηριακής αλλόθεσης [25, 39, 41, 122, 123], παρουσιάζει τεχνικές δυσκολίες στην ανίχνευσή του και μεταβολές στα διαφορετικά εργαστήρια. [42] Ειδικότερα, και στην παρούσα μελέτη, η προσπάθεια απομόνωσης βακτηριακού DNA με τη μέθοδο του 16S ριβοσωμικού RNA από τον ορό κίρρωτικών ασθενών δεν στέφθηκε με επιτυχία. Πιθανή ερμηνεία της αδυναμίας ανίχνευσης του βακτηριακού DNA είναι το κατώτερο όριο ανίχνευσης της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε (15.8 pg/μl), ενώ συγκεντρώσεις μικρότερες από το συγκεκριμένο όριο παραμένουν μη ανιχνεύσιμες. Ένας άλλος πιθανός δείκτης βακτηριακής αλλόθεσης, η καλπροτεκτίνη των κοπράνων, υπόκειται επίσης σε

αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ των εργαστηρίων και των ερευνητικών ομάδων. [124, 125]

Στην παρούσα έρευνα, διαπιστώνεται η υψηλή συσχέτιση μεταξύ της hBD-1 και του sCD14, καθιστώντας την πρώτη ως πιθανό έμμεσο δείκτη βακτηριακής αλλόθεσης. Η μεγαλύτερη συσχέτιση των δύο μορίων στις ηπατικές φλέβες, ίσως να υποδεικνύει και το πιθανό σημείο παραγωγής ή/και μεγαλύτερης συγκέντρωσης της hBD-1. Η οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση στο περιφερικό αίμα έχει ως πιο πιθανή εξήγηση τον μικρό αριθμό των δειγμάτων, ενώ αύξηση του πλήθους των μελετηθέντων ασθενών πιθανώς να ισχυροποιούσε τη συσχέτιση. Ενδιαφέρον προκαλεί μία μελέτη των Loo et al που αναφέρεται σε συνδυασμούς πολυμορφισμών των γονιδίων που κωδικοποιούν τις δύο πρωτεΐνες, hBD-1 και sCD14 και προδιαθέτουν σε μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης περιοδοντίτιδας.[126] Τα δεδομένα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι μία πιθανή σχέση μεταξύ των δύο μορίων υφίσταται και σε άλλα συστήματα. Ταυτόχρονα, τίθεται το ερώτημα αν παρόμοιοι πολυμορφισμοί των συγκεκριμένων γονιδίων, θα μπορούσαν να ανιχνευθούν και να συσχετιστούν με την ηπατική νόσο, καθώς επίσης αν συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί καθιστούν υποκατηγορία των κίρρωτικών ασθενών πιο επιρρεπείς στην ανάπτυξη βακτηριακής αλλόθεσης και, κατά συνέπεια, στις λοιμώξεις. Αλληλεπίδραση μεταξύ του CD14 και των ντεφενσινών φαίνεται να υπάρχει και στο αναπνευστικό σύστημα, καθώς μία άλλη ντεφενσίνη, η hBD-2 υπερεκφράζεται στο τραχειοβρογχικό δέντρο ως απάντηση στην παρουσία του LPS μέσω του CD14 και του υποδοχέα TLR4. [127, 128] Από τα προηγούμενα συνάγεται ότι μεταξύ του CD14 και των ντεφενσινών φαίνεται να υπάρχει αλληλεπίδραση και συσχετίσεις, αν και ακόμη δεν είναι γνωστό το βιολογικό μονοπάτι αυτών. Είναι πιθανό είτε η έκφραση του ενός μορίου να επάγει την παραγωγή του άλλου, είτε να υπόκεινται σε κοινούς σηματοδοτικούς μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασής τους παρουσία βακτηριακών προϊόντων ή/και φλεγμονής.

Ένα σημαντικό σημείο που θα έπρεπε να τονιστεί είναι ότι η ακριβής αιτιολογία αύξησης της hBD-1 στην κίρρωση, τα ακριβή σημεία παραγωγής της και το ακριβές ανοσολογικό μονοπάτι που εμπλέκεται δεν έχουν αποσαφηνιστεί

πλήρως. Η σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην hBD-1 και το sCD14 υποστηρίζει τη θεωρία ότι βακτηριακά προϊόντα οδηγούν στην υπερέκφρασή τους. Τα μικροβιακά προϊόντα που υπάρχουν στον εντερικό αυλό και στην περιτοναϊκή κοιλότητα είναι πιθανόν να επάγουν την σύνθεση και των δύο πρωτεϊνών, δεδομένης της σημαντικά υψηλότερης συσχέτισής τους στις ηπατικές φλέβες από τη συστηματική κυκλοφορία. Τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα παράγουν την hBD-1 σε κάποιο βαθμό και μετά από διέγερση με παράγοντες που προέρχονται από βακτήρια.^[129] Επίσης, τροποποιημένη έκφραση των ντεφενσινών έχει αναφερθεί και στις ΙΦΝΕ. Στη νόσο του Crohn τελικού ειλεού η HD-5 έχει ελαττωμένη έκφραση ^[86], όπως και η hBD-1 στο παχύ έντερο στην ελκώδη κολίτιδα ^[71], ενώ αυξάνεται η έκφραση της hBD-2 στην τελευταία νόσο. ^[92] Επιπλέον, η hBD-2 έχει συσχετιστεί με την παρουσία βακτηριακής αλλόθεσης σε ασθενείς με νόσο του Crohn, οι οποίοι φέρουν το φυσιολογικό γονότυπο NOD2/CARD15. ^[130] Ήταν δόκιμη, λοιπόν, η υπόθεση ότι πηγή της αυξημένης έκφρασης της hBD-1 ήταν τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, αφού είναι γνωστό ότι οι ντεφενσίνες αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα της έμφυτης ανοσίας του εντέρου και προσδίδουν ακεραιότητα στον ανοσολογικό εντερικό επιθηλιακό φραγμό. ^[70] Εντούτοις, τα πειράματα που έγιναν στην παρούσα έρευνα για την έκφραση του mRNA, δεν απέδειξαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση στο εντερικό επιθήλιο της hBD-1, καθώς και άλλων αντιμικροβιακών πεπτιδίων, όπως η HD-5 μεταξύ των κίρρωτικών ασθενών και των υγιών μαρτύρων. Αυτό τα αποτελέσματα δεν αποκλείει, όμως, την πιθανότητα ότι ελλείμματα στην έκκριση των πρωτεϊνών ή στη μικροβιοκτόνο δραστηριότητα των εκκρινόμενων ντεφενσινών μπορεί να συναντώνται στην κίρρωση. Παρόμοια ελλείμματα φαίνεται να λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια φλεγμονής του εντερικού σωλήνα.^[131] Υπάρχει επίσης η πιθανότητα να τροποποιείται η έκφραση κάποιου αντιμικροβιακού πεπτιδίου ανάλογα με συγκεκριμένα τμήματα του εντέρου. Πράγματι, οι Teltschik et al αναφέρουν αυξημένη έκφραση του RNA της hBD-1 στο τυφλό, ενώ εμφανίζεται ελαττωμένο στον κόλον αρουραίων με προκλητή κίρρωση.^[132] Αναλόγως, είναι πιθανόν η hBD-1 να εκφράζεται με διαφορετικό τρόπο στα διάφορα τμήματα του παχέος εντέρου των κίρρωτικών ασθενών και εξαιτίας αυτού του περιορισμού να μην ήταν δυνατή η ανεύρεση διαφοράς στην έκφραση των αντιμικροβιακών

πεπτιδίων από τα δείγματα που ελήφθησαν από όλο το μήκος του παχέος εντέρου στην παρούσα μελέτη. Επιπλέον, δεν ανιχνεύθηκε διαφορά στην έκφραση της HD-5 στον τελικό ειλεό των κίρρωτικών ασθενών σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, μολονότι στο άρθρο των Teltschik, καταγράφεται μειωμένη έκφραση των α-κρυπτιδινών (α-cryptdins) 5 και 7 αρουραίων με κίρρωση του ήπατος και βακτηριακή αλλόθεση.^[132] Οι α-κρυπτιδίνες αποτελούν τα ανάλογα των ανθρώπινων α-ντεφενσινών των κυττάρων του Paneth για τους αρουραίους. Μία πιθανή εξήγηση θα ήταν ότι η έκφραση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων στον ανθρώπινο πληθυσμό διαφοροποιείται σε σύγκριση με τα πειραματικά μοντέλα και υπόκεινται σε άλλους ρυθμιστικούς παράγοντες.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όσον αφορά στην έκφραση των α-ντεφενσινών αποκλειστικά σχεδόν από τα κύτταρα του Paneth, έρχονται σε πλήρη συμφωνία με τις προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές ^[133, 134] Η έκφραση της α5-ντεφενσίνης είναι αυξημένη στατιστικώς σημαντικά στον τελικό ειλεό των υγιών μαρτύρων σε σύγκριση με το παχύ έντερο των ίδιων ασθενών. Όμοια είναι και η κατανομή της έκφρασης της προαναφερθείσας ντεφενσίνης και στους κίρρωτικούς ασθενείς. Ενδιαφέροντα επίσης είναι τα αποτελέσματα για την hBD-1. Ενώ στους υγιείς μάρτυρες, η hBD-1 υπερεκφράζεται στο παχύ έντερο σε σύγκριση με τον τελικό ειλεό, όπως είναι ήδη γνωστό, στους κίρρωτικούς ασθενείς αυτή η διαφορά στην έκφραση της hBD-1 μεταξύ τελικού ειλεού και παχέος εντέρου τείνει να εκλείψει. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι αυτό το πειραματικό αποτέλεσμα μπορεί να εξηγήσει εν μέρει την αυξημένη παρουσία της hBD-1 στη συστηματική κυκλοφορία. Ενδεχομένως, τα κύτταρα του τελικού ειλεού να υφίστανται κάποιου είδους μεταπλασία και ενισχύεται η έκφραση της hBD-1 από τον τελικό ειλεό, όπως γίνεται και από το παχύ έντερο. Πιθανή αιτία για αυτή την έκφραση μεταξύ άλλων, θα μπορούσε να είναι και η υπερανάπτυξη βακτηρίων στο λεπτό έντερο ^[27, 28], η οποία έχει παρατηρηθεί στους κίρρωτικούς ασθενείς και έχει προταθεί ως μία πιθανή αιτία βακτηριακής αλλόθεσης.

Σε ιστικό επίπεδο, δεν ανευρέθησαν σαφείς διαφορές μεταξύ κίρρωτικών ασθενών και υγιών μαρτύρων ούτε σε επίπεδο πρωτεΐνης. Η ανοσοϊστοχημεία

που πραγματοποιήθηκε στις εντερικές βιοψίες μικρού αριθμού ασθενών και υγιών μαρτύρων δεν ανέδειξε σημαντικά τροποποιημένη απεικόνιση της α5-ντεφενσίνης στον τελικό ειλεό, όπως ήταν φυσικά αναμενόμενο, καθώς διαφορές δεν είχαν ανιχνευθεί ούτε σε επίπεδο γονιδιακό, όπως προαναφέρθηκε. Αναγκαίως περιορισμός των πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας ήταν ο τρόπος λήψης των ιστικών τεμαχιδίων. Προκειμένου να απεικονίζονται περισσότερα κύτταρα ανά οπτικό πεδίο και σε συγκεκριμένη διατομή, θα έπρεπε τα δείγματα να αφορούν σε μεγαλύτερο ιστικό τεμαχίδιο, το οποίο θα ήταν εφικτό μετά από εκτομή τμήματος του εντερού, γεγονός το οποίο θα επιτρεπόταν ηθικά και δεοντολογικά μόνο για θεραπευτικούς ή διαγνωστικούς σκοπούς. Εξαιτίας της συγκεκριμένης ιδιαιτερότητας αυτού του τμήματος της μελέτης, οι ιστικές βιοψίες που χρησιμοποιήθηκαν για την απεικόνιση των πρωτεϊνών, λήφθηκαν ως βιοψίες κατά τη διάρκεια της διαγνωστικής ενδοσκόπησης που υποβλήθηκαν οι ασθενείς και αντιστοιχούσαν σε ένα μικρό τμήμα ιστού με μικρότερο αριθμό απεικονισθέντων κυττάρων ανά οπτικό πεδίο και με διαφορετικές διατομές.

Τέθηκε, επίσης, το ερώτημα των πιθανών επιπρόσθετων πηγών των κυκλοφορούντων μορίων hBD-1. Πρωτίστως, η έκφραση της hBD-1 από τα μονοκύτταρα φαίνεται να αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό μετά από τη διέγερσή τους από βακτηριακούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, η διέγερσή τους από το MDP, το οποίο προσδένει τον ενδοκυττάριο βακτηριακό υποδοχέα NOD2, οδηγούσε στην υπερέκφραση του miRNA129-5p, το οποίο στην συνέχεια ενίσχυε την έκφραση της hBD-1/DEFB1 ^[135]. Επιπλέον, προσφάτως έχει αποδειχθεί ότι και τα αιμοπετάλια παράγουν και αποθηκεύουν την hBD-1. Η απελευθέρωσή της γίνεται μόνο μετά από τη διέγερση των αιμοπεταλίων από μικροβιακά προϊόντα, τα οποία αυξάνουν την κυτταρική διαπερατότητα ^[75]. Εκ των ανωτέρω συνάγεται ότι τα υψηλά επίπεδα των συστηματικών επιπέδων της hBD-1 στους κίρρωτικούς ασθενείς πιθανώς να προέρχονται από τα μονοκύτταρα ή/και τα αιμοπετάλια ως απάντηση στη διαδικασία της βακτηριακής αλλόθεσης και την απελευθέρωση βακτηριακών προϊόντων, όπως το LPS ή το MDP. Βάσει αυτών των δεδομένων, στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν πειράματα καλλιέργειών αίματος και ιστού για την

ανάδειξη της πιθανής διέγερσης των αντιμικροβιακών πεπτιδίων από το LPS. Δυστυχώς, τα συγκεκριμένα πειράματα δεν ολοκληρώθηκαν με επιτυχία. Είναι πιθανό η αδυναμία διέγερσης να οφείλεται είτε σε άλλους υποτύπους LPS που ίσως επιδρούν στα αντιμικροβιακά πεπτίδια, είτε σε διαφορετικό τρόπο δράσης και αλληλεπίδρασης των μορίων *in vivo* και *in vitro*, είτε σε διαφορετικά χρονικά σημεία στα οποία γίνεται η διέγερση και αυξάνονται παροδικά τα επίπεδα των υπό μέτρηση πρωτεϊνών. Απόρροια των ανωτέρω είναι ότι οι τεχνικές δυσκολίες που αντιμετωπίστηκαν, καθώς και η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είναι πιθανό να επηρεάζουν την ορθότητα των αποτελεσμάτων και να καθιστούν επισφαλή την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την επίδραση του LPS στην έκφραση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων και συγκεκριμένα τις βήτα-ντεφενσίνες.

Σκόπος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η : *Μελέτη του ρόλου των φυσικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων στην παθογένεση των λοιμώξεων σε κίρρωτικούς ασθενείς.* Η έρευνα αυτή είναι πρωτότυπη στον τομέα της ηπατολογίας, καθώς δεν προϋπήρχε γνωστή αναφορά της έκφρασης των εν λόγω μορίων στην κίρρωση. Η έκφραση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων στους ασθενείς με τελικού σταδίου ηπατική νόσο ερευνήθηκε τόσο σε επίπεδο πρωτεϊνών, όσο και σε μοριακό επίπεδο, όχι μόνο στο περιφερικό αίμα, αλλά και συγκεκριμένα στις ηπατικές φλέβες και σε ιστικό επίπεδο. Χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος ερευνητικής μεθοδολογίας, όπως πειράματα μέτρησης πρωτεϊνών ποσοτικά (ELISA), απεικόνισης πρωτεϊνών (ανοσοϊστοχημεία), σχετικής έκφρασης γονιδίων (Real-time RT-PCR), απομόνωσης βακτηριακού DNA (PCR), διέγερσης κυττάρων με βακτηριακά προϊόντα (κυτταροκαλλιέργειες). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν και οι συσχετίσεις ελέγχθηκαν βάσει της στατιστικής επιστήμης με χρήση του στατιστικού προγράμματος Graph Pad.

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή παρέχει στοιχεία ως προς την αυξημένη έκφραση των συστηματικών επιπέδων της hBD-1 και του sCD14 στην κίρρωση του ήπατος, ανεξάρτητα από την αιτία της ηπατικής νόσου. Καταγράφεται η σημαντική συσχέτιση των δύο μορίων στις ηπατικές φλέβες, αλλά και στη συστηματική κυκλοφορία σε μικρότερο βαθμό. Η hBD-1 προτείνεται ως ένας νέος, πιθανός δείκτης βακτηριακής αλλόθεσης, με το πλεονέκτημα της εύκολης

μέτρησής της στο περιφερικό αίμα. Η συνέχιση της έρευνας προς την κατεύθυνση της αποσαφήνισης του ρόλου της hBD-1 στην κίρρωση και της χρησιμότητάς της ως δείκτη βακτηριακής αλλόθεσης θα προσέφερε σημαντική βελτίωση στην πρώιμη διαγνωστική προσέγγιση και θεραπευτική παρέμβαση στους κίρρωτικούς ασθενείς με οφέλη ως προς την πρόληψη των επιπλοκών, τη βελτίωση της ποιότητάς ζωής, τη νοσηρότητα και την επιβίωση των ασθενών με τελικού σταδίου ηπατική νόσο.

6. ΣΥΝΟΨΗ

Τα φυσικά αντιμικροβιακά πεπτίδια αποτελούν μέρος της έμφυτης ανοσίας του οργανισμού εναντίον βακτηρίων, ιών και μυκήτων. Τροποποίηση της έκφρασής τους λαμβάνει χώρα σε πολλές νοσολογικές οντότητες και σε καταστάσεις λοίμωξης ή φλεγμονής.

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη αποδεικνύεται η αύξηση των επιπέδων της hBD-1 στη συστηματική κυκλοφορία των ασθενών με κίρρωση του ήπατος σε σύγκριση με τους ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα και τους υγιείς μάρτυρες. Πιθανή αιτία της αυξημένης έκφρασης τους αποτελεί η παρουσία βακτηριακών προϊόντων, όπως του LPS, ενώ φαίνεται να είναι ανεξάρτητη με την υποκείμενη αιτία της ηπατικής νόσου.

Τα επίπεδα των αντιμικροβιακών πεπτιδίων (HD-5, HD-6, hBD-1, REG3a) τοπικά στον εντερικό ιστό δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ κίρρωτικών ασθενών και υγιών μαρτύρων. Επισημαίνεται επίσης ο διαφορετικός τρόπος έκφρασής τους μεταξύ τελικού ειλεού και παχέος εντέρου, με την HD-5 να εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στον τελικό ειλέο τόσο των κίρρωτικών ασθενών όσο και των υγιών μαρτύρων. Στην περίπτωση της hBD-1, διακρίνεται υψηλότερη έκφραση στο παχύ έντερο των υγιών μαρτύρων σε σχέση με τον τελικό ειλέο, ενώ στους κίρρωτικούς ασθενείς αυτή η διαφορά τείνει να εκλείψει. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα εγείρει το ερώτημα μίας πιθανής νέας πηγής παραγωγής hBD-1 από τον τελικό ειλέο των κίρρωτικών ασθενών ως απάντηση σε βακτηριακά προϊόντα.

Επιπροσθέτως, μελετήθηκε και η έκφραση του sCD14 στην κυκλοφορία των ασθενών με χρόνια ηπατική νόσο. Αυτό το διαλυτό μόριο υπερεκφράζεται σε ασθενείς με χρόνια ηπατοπάθεια (χρόνια ιογενή ηπατίτιδα και κίρρωση του ήπατος) σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες ανεξάρτητα από την υποκείμενη αιτία.

Τα επίπεδα της hBD-1 και του sCD14 στις ηπατικές φλέβες των κίρρωτικών ασθενών παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση, η οποία εμφανίζεται οριακά σημαντική στο περιφερικό αίμα. Δεδομένου του χαρακτηρισμού του sCD14 ως εμμέσου δείκτη βακτηριακής αλλόθεσης και της προαναφερθείσας

σημαντικής συσχέτισης μεταξύ των δύο μορίων, θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα επίπεδα hBD-1 αντιπροσωπεύουν εμμέσως και την παρουσία βακτηριακών προϊόντων, όπως το LPS, στη συστηματική κυκλοφορία των κίρρωτικών ασθενών. Είναι πιθανόν η hBD-1 να αποτελεί έναν έμμεσο δείκτη βακτηριακής αλλόθεσης στους ασθενείς με τελικού σταδίου ηπατική νόσο.

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα φυσικά αντιμικροβιακά πεπτιδία με κύριο εκπρόσωπό τους την οικογένεια των ντεφενσινών φαίνεται να κατέχουν σημαντική θέση στην παθοφυσιολογία των λοιμώξεων στους ασθενείς με τελικού σταδίου ηπατική νόσο.

Η αύξηση της hBD-1 στη συστηματική κυκλοφορία των ασθενών με κίρρωση του ήπατος σχετίζεται με την παρουσία της κίρρωσης και όχι με τον αιτιολογικό παράγοντα της ηπατικής νόσου.

Η συσχέτιση της hBD-1 με το sCD14 στην κίρρωση του ήπατος αναδεικνύει την πιθανότητα η αύξηση της hBD-1 να αποτελεί συνέπεια της ύπαρξης βακτηριακής αλλόθεσης σε αυτή την κατηγορία των ασθενών. Ο μηχανισμός με τον οποίο η παρουσία του LPS και άλλων βακτηριακών προϊόντων ενεργοποιεί την παραγωγή της hBD-1 δεν έχει αποσαφηνιστεί.

Η παρούσα μελέτη, εξ όσων γνωρίζουμε, αποτελεί την πρώτη μελέτη που αφορά στην έκφραση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων σε ασθενείς με τελικού σταδίου ηπατική νόσο. Η διεξαγωγή περισσότερων μελετών με στόχο την αποσαφήνιση του μοριακού μηχανισμού με τον οποίο οι ανθρώπινες ντεφενσίνες εμπλέκονται στην βακτηριακή αλλόθεση και του ακριβές σημείου παραγωγής τους στην κίρρωση του ήπατος καθιστάται ουσιώδους σημασίας. Η πιθανή χρήση της hBD-1 ως εμμέσου δείκτη βακτηριακής αλλόθεσης, θα διευκόλυνε τη διαγνωστική προσέγγιση των κίρρωτικών ασθενών σε πρώιμο στάδιο με στόχο την πιο αποτελεσματική θεραπευτική τους προσέγγιση.

III. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η μελέτη της έκφρασης των φυσικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων στη χρόνια ηπατική νόσο και η υπάρξη ή όχι συσχέτισης με την αιτιολογία της ηπατικής νόσου. Επιπλέον, η συσχέτισή τους με παράγοντες που σχετίζονται με τη βακτηριακή αλλόθεση και η ανάδειξη του πιθανού ρόλου των αντιμικροβιακών πεπτιδίων στη παθογένεση των λοιμώξεων στους κίρρωτικούς ασθενείς ή/και του ρόλου τους ως δείκτη βακτηριακής αλλόθεσης στους ασθενείς με τελικού σταδίου ηπατική νόσο.

Ασθενείς και Μέθοδοι: Οι συγκεντρώσεις της hBD-1 και του sCD14 στο πλάσμα και στον ορό αντίστοιχα ασθενών με κίρρωση του ήπατος, με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα και σε υγιείς μάρτυρες, καθώς και στις ηπατικές φλέβες κίρρωτικών ασθενών, μετρήθηκαν με ELISA. Η σχετική έκφραση του mRNA διαφόρων αντιμικροβιακών πεπτιδίων προσδιορίστηκε Real-time PCR σε βιοψίες από τον τελικό ειλέο και το παχύ έντερο. Επίσης, διενεργήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας και καλλιέργειών σε ιστικά τεμαχίδια και πειράματα καλλιέργειών ολικού αίματος.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της hBD-1 και του sCD14 στο περιφερικό αίμα των ασθενών με κίρρωση του ήπατος (18.26 ng/ml, 16.65-21.94, διάμεσος, 95%CI για την hBD-1 και 2777 ng/ml, 2701-3133, διάμεσος, 95%CI για το sCD14) σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (8.85 ng/ml, 7.46-9.69, διάμεσος, 95%CI, $P < 0.0001$ για την hBD-1 και 1671 ng/ml, 1574-2026, διάμεσος, 95%CI, $P < 0.0001$ για το sCD14) και όσον αφορά στην hBD-1 και με τους ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (8.87 ng/ml, 9.09-12.88, διάμεσος, 95%CI, $P < 0.0001$). Η υποκείμενη αιτία της κίρρωσης δεν επηρέαζε τη συγκέντρωση καμίας εκ των δύο πρωτεϊνών. Τα επίπεδα της hBD-1 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα του sCD14 στον ορό που συλλέχθηκε από τις ηπατικές φλέβες των κίρρωτικών ασθενών (Spearman $r = 0.6$, $P = 0.0045$). Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ κίρρωτικών ασθενών και υγιών μαρτύρων στην τοπική έκφραση του mRNA ούτε της A5 ντεφενσίνης ή της hBD-1 στο εντερικό επιθήλιο.

Συμπεράσματα: Η hBD-1 υπερεκφράζεται στους ασθενείς με κίρρωση του ήπατος και σχετίζεται σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο με το sCD14, ενός

μορίου του οποίου η έκφραση επάγεται από την παρουσία του λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Η συσχέτιση της hBD-1 με την παρουσία μικροβιαμίας από gram αρνητικά μικρόβια, αναδεικνύει τον πιθανό ρόλο της hBD-1 ως δείκτη βακτηριακής αλλόθεσης σε ασθενείς με κίρρωση του ήπατος.

IV. SUMMARY

Objective: To investigate the expression of natural antimicrobial peptides in chronic liver disease and the presence or not of a correlation with the etiology of liver disease. Moreover, to elucidate the correlation with factors related to bacterial translocation and the possible role of antimicrobial peptides (AMPs) in the pathogenesis of infections in cirrhotic patients and/or the role of AMPs as a biomarker of bacterial translocation in patients with end stage liver disease.

Patients and Methods: The concentrations of hBD-1 and sCD14 in plasma and sera of patients with liver cirrhosis, chronic viral hepatitis and healthy controls, and in hepatic veins of cirrhotic patients, were measured by ELISA. The relative mRNA expression of various natural antimicrobial peptides was determined by Real-time PCR in biopsies from the terminal ileum and colon. Moreover, experiments concerning immunohistochemistry and blood and tissue cultures were performed.

Results: hBD-1 and sCD14 were significantly upregulated in peripheral blood of cirrhotic patients (18.26 ng/ml, 16.65-21.94, median, 95%CI for hBD-1 and 2777 ng/ml, 2701-3133, median, 95%CI for sCD14) compared to healthy controls (8.85 ng/ml, 7.46-9.69, median, 95%CI, $P < 0.0001$ for hBD-1 and 1671 ng/ml, 1574-2026, median, 95%CI, $P < 0.0001$ for sCD14) and concerning hBD-1 to patients with chronic viral hepatitis too (8.87 ng/ml, 9.09-12.88, median, 95%CI, $P < 0.0001$). The etiology of cirrhosis did not affect the concentration of either protein. The levels of hBD-1 protein correlated significantly with the levels of sCD14 in blood collected from hepatic veins of cirrhotic patients (Spearman $r = 0.6$, $P = 0.0045$). In contrast, no significant differences were observed in the intestinal mucosal mRNA expression of the Paneth cell specific defensin A5 or hBD-1 between patients with cirrhosis and healthy controls.

Conclusions: hBD-1 is upregulated in patients with cirrhosis and highly correlates with LPS-induced protein, sCD14. The correlation of hBD-1 with the presence of gram negative bacteremia indicates a possible role of hBD-1 as a biomarker of bacterial translocation in patients with cirrhosis.

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ράπτης Σ.Α. (2006), Εσωτερική Παθολογία, Αθήνα: Εκδόσεις Παρισιάνου.
2. Jay H. Stein et al. Stein Παθολογία. Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης Π.Κ.Τούτουζας-Σ.Ι.Χατζηγιάννης-Γ.Γ.Καρβουτζής. Εκδόσεις Πασχαλίδης 1997.
3. Damjanov I. Παθοφυσιολογία. Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης Χαράλαμπος Μουτσόπουλος. Εκδόσεις Παρισιάνου 2009.
4. Anthony P.P. et al; The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification; Bulletin of World Health Organization; 1977; 55: 521-540.
5. Iwakiri Y. Pathophysiology of Portal Hypertension. Clin Liver Dis 2005;18(2):281-291
6. Iwakiri Y, Groszmann RJ. The Hyperdynamic Circulation of Chronic Liver Diseases: From the Patient to the Molecule. Hepatology 2006;43:S121-S131.
7. Low G, Alexander GJM, Lomas DJ. Hepatorenal Syndrome: Aetiology, Diagnosis, and Treatment. Gastroenterology Research and Practice 2015;2015:207012.
8. Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, Frangos JA, Mennone A, Groszmann RJ, Sessa WC. Liver Sinusoidal Endothelial Cells Are Responsible for Nitric Oxide Modulation of Resistance in the Hepatic Sinusoids. J. Clin. Invest. 1997;100:2923-2930.
9. Rockey D. The Cellular Pathogenesis of Portal Hypertension: Stellate Cell Contractility, Endothelin, and Nitric Oxide. Hepatology 1997;25(1):2-5.
10. Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Caldero H, Fernandez M, Bosch J, Garcia-Pagan J.C. Increased Oxidative Stress in Cirrhotic Rat Livers: A Potential Mechanism Contributing to Reduced Nitric Oxide Bioavailability. Hepatology 2008;47:1248-1256.
11. Graupera M, March S, Engel P, Rodes J, Bosch J, Garcia-Pagan J.C. Sinusoidal endothelial COX-1-derived prostanoids modulate the hepatic vascular tone of cirrhotic rat livers. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005;288:G763-G770.
12. Bauer M, Zhang JX, Bauer I, Clemens MG. ET-1 induced alterations of hepatic microcirculation: sinusoidal and extrasinusoidal sites of action. Am J Physiol. 1994;267(1 Pt 1):G143-9.
13. Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. Eur. J. Biochem 1993;213:815-823.
14. Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. Gut 2002;50:891-896.
15. Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic Stellate Cells: Unique Characteristics in Cell Biology and Phenotype. Cell Structure and Function 2003;28:105-112.

16. Lee JS, Semela D, Iredale J, Shah VH. Sinusoidal remodeling and Angiogenesis: A New Function for the Liver-Specific Pericyte? *Hepatology* 2007;45(3):817-825.
17. Jagavelu K, Routray C, Shergill U, O'Hara SP, Faubion W, Shah VH. Endothelial cell Toll-like receptor 4 regulates fibrosis associated angiogenesis in liver. *Hepatology* 2010; 52(2):590-601.
18. Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O. Hypoxia-Induced VEGF and Collagen I Expressions Are Associated With Angiogenesis and Fibrogenesis in Experimental Cirrhosis. *Hepatology* 2002;35:1010-1021.
19. Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, Parola M, Colombatto S, Novo E, Vizzutti F, Anania F, Milani S, Rombouts K, Laffi G, Pinzani M, Marra F. Upregulation of Proinflammatory and Proangiogenic Cytokines by Leptin in Human Hepatic Stellate Cells. *Hepatology* 2005;42:1339-1348.
20. Thabut D, Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: New targets for the treatment of portal hypertension? *Journal of Hepatology* 2010;53:976-980.
21. Taura K, De Minicis S, Seki E, Hatano E, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Miura K, Ikai I, Uemoto S, Brenner DA. Hepatic stellate cells secrete angiopoietin 1 that induces angiogenesis in liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008;135(5):1729-38.
22. Thalheimer U, Triantos CK, Samonakis DN, Patch D, Burroughs AK. Infection, coagulation and variceal bleeding in cirrhosis. *Gut* 2005;54:556-563.
23. Vaquero J, Polson J, Chung C, Helenowski I, Schiodt FV, Reisch J, Lee WM, Blei AT. Infection and the progression of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Gastroenterology* 2003;125:755-764.
24. Sidhu SS, Goyal O, Mishra BP, Sood A, Chhina RS, Soni RK. Rifaximin improves psychometric performance and health-related quality of life in patients with minimal hepatic encephalopathy (the RIME Trial). *The American journal of gastroenterology* 2011;106 307-316.
25. Bellot P, Frances R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver International* 2013;33:31-39.
26. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial Translocation (BT) in Cirrhosis. *Hepatology* 2005;41(3):422-433.
27. Morencos FC, de las Heras Castano G, Martin Ramos L, Lopez Arias MJ, Ledesma F, Pons Romero F. Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Digestive diseases and sciences* 1995;40:1252-1256.
28. Chang CS, Chen GH, Lien HC, Yeh HZ. Small Intestine Dysmotility and Bacterial Overgrowth in Cirrhotic Patients With Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Hepatology* 1998;28:1187-1190.
29. Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. *Gastroenterology* 2014;146:1513-1524.

30. Gomez-Hurtado I, Santacruz A, Peiro G, Zapater P, Gutierrez A, Perez-Mateo M, Sanz Y, Frances R. Gut microbiota dysbiosis is associated with inflammation and bacterial translocation in mice with CCl₄-induced fibrosis. *PLoS One* 2011;6:e23037.
31. Such J, Guardiola JV, de Juan J, Casselas JA, Pascual S, Aparicio JR, Sola-Vera J, Perez-Mateo M. Ultrastructural characteristics of distal duodenum mucosa in patients with cirrhosis. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2002;14:371-376.
32. Pascual S, Such J, Esteban A, Zapater P, Casellas JA, Aparicio JR, Girona E, Gutierrez A, Carnices F, Palazon JM, Sola-Vera J, Perez-Mateo M. Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis. *Hepato-gastroenterology* 2003;50:1482-1486.
33. Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 1986;6:252-262.
34. Bolognesi M, Merkel C, Bianco S, Angeli P, Sacerdoti D, Amodio P, Gatta A. Clinical significance of the evaluation of hepatic reticuloendothelial removal capacity in patients with cirrhosis. *Hepatology (Baltimore Md)* 1994;19:628-634.
35. Panes J, Perez-del-Pulgar S, Casadevall M, Salas A, Pizcueta P, Bosch J, Anderson DC, Granger DN, Pique JM. Impaired mesenteric leukocyte recruitment in experimental portal hypertension in the rat. *Hepatology (Baltimore, Md)* 1999;30:445-453.
36. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2014;60:197-209.
37. Caruntu FA, Benea L. Spontaneous Bacterial Peritonitis: Pathogenesis, Diagnosis, Treatment. *J Gastrointest Liver Dis.* 2006;15:51-56.
38. Rimola A, Garcia-Tsao G, Navasa M, Piddock LJV, Planas R, Bernard B, Inadomi JM, and the International Ascites Club. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. *Journal of Hepatology* 2000; 32:142-153.
39. Such J, Frances R, Munoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, Rodriguez-Valera F, Pascual S, Sola-Vera J, Carnicer F, Uceda F, Palazon JM, Perez-Mateo M. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2002;36:135-141.
40. Guarner C, Gonzalez-Navajas JM, Sanchez E, Soriando G, Frances R, Chiva M, Zapater P, Benlloch S, Munoz C, Pascual S, Balanzo J, Perez-Mateo M, Such J. The detection of bacterial DNA in blood of rats with CCl₄-induced cirrhosis with ascites represents episodes of bacterial translocation. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2006;44:633-639.
41. Zapater P, Frances R, Gonzalez-Navajas JM, de la Hoz MA, Moreu R, Pascual S, Monfort D, Montoliu S, Vila C, Escudero A, torras X, Cirera I, Llanos L,

- Guarner-Argente C, palazon JM, Carnicer F, Bellot P, Guarner C, Planas R, Sola R, Serra MA, Munoz C, Perez-Mateo M, Such J. Serum and ascetic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2008;48:1924-1931.
42. Vlachogiannakos J, Daikos G, Thalheimer U, Burroughs AK, Ladas SD. Is bacterial DNA a better marker than endotoxin of bacterial translocation in decompensated cirrhosis? *Hepatology (Baltimore, Md)* 2011; 53:2140-2141.
 43. Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Basil V, Espevik T, Finlay BB, Wright SD. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine* 1992;176:1665-1671.
 44. Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90:2744-2748.
 45. Yu B, Wright S. Catalytic Properties of Lipopolysaccharide (LPS) Binding Protein. Transfer of LPS to soluble CD14. *The Journal of Biological Chemistry* 1996;271(8):4100-4105.
 46. Hailman E, Lichtenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding Protein Accelerates the Binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 1994;179:269-277.
 47. Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica chimica acta; international journal of chemistry* 2002;323:59-72.
 48. Le Roy D, Di Padova F, Adachi Y, Glauser MP, Calandra T, Heumann D. Critical role of lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in immune responses against gram-negative bacteria. *Journal of Immunology* 2001;167:2759-2765.
 49. Correia JS, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide Is in Close Proximity to Each of the Proteins in Its Membrane Receptor Complex. Transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276(24):21129-21135.
 50. Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR. Cutting Edge: Lipopolysaccharide Induces Physical Proximity Between CD14 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Prior to Nuclear Translocation of NF- κ B. *J Immunol* 2000;165:3541-3544.
 51. Seki E, Schnabl B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *The Journal of physiology* 2012; 590:447-458.
 52. Dziarski R, Tapping RI, Tobias PS. Binding of Bacterial Peptidoglycan to CD14. *The Journal of Biological Chemistry* 1998;273(15):8680-8690.
 53. Lin RS, Lee FY, Lee SD, Tsai YT, Lin HC, Hsh WC, Huang CC, Wang SS, Lo KJ. Endotoxemia in patients with chronic liver diseases: relationship to severity of liver diseases, presence of esophageal varices, and hyperdynamic circulation. *Journal of Hepatology* 1995;22:165-172.

54. Hanck C, Rossol S, Bocker U, Tokus M, Singer MV. Presence of plasma endotoxin is correlated with tumor necrosis factor receptor levels and disease activity in alcoholic cirrhosis. *Alcohol and alcoholism* 1998;33:606-608.
55. Fukui H, Brauner B, Bode JC, Bode C. Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease:reevaluation with an improved chromogenic assay. *Journal of hepatology* 1991;12:162-169.
56. Kaser A, Ludwiczek O, Waldenberger P, Jaschke W, Vogel W, Tilg H. Endotoxin and its binding proteins in chronic liver disease: the effect of transjugular intrahepatic portosystemic shunting. *Liver* 2002;22:380-387.
57. Albillos A, de la Hera A, Gonzalez M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, Ruiz-del-Arbol L, Alvarez-Mon M. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2003;37:208-217.
58. Albillos A, de-la-Hera A, Alvarez-Mon M. Serum lipopolysaccharide-binding protein prediction of severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites. *Lancet* 2004;363:1608-1610.
59. McGinley, Narhi LO, Kelley MJ, Davy E, Robinson J, Rohde MF, Wright SD, Lichenstein HS. CD14: Physical Properties and Identification of an Exposed Site That Is Protected by Lipopolysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry* 1995; 270(10): 5213-5218.
60. Landmann R, Knopf HP, Link S, Sansano S, Schuman R, Zimmerli W. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infection and immunity* 1996;64:1762-1769.
61. Tuomisto S, Pessi T, Collin P, Vuento R, Aittoniemi J, Karhunen PJ. Changes in gut bacterial populations and their translocation into liver and ascites in alcoholic liver cirrhotics. *BMC gastroenterology* 2014;14:40.
62. Sandler NG, Koh C, Roque A, Eccleston JL, Siegel RB, Demino M, Kleiner DE, Deeks SG, Liang TJ, Heller T, Douek DC. Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology* 2011;141:1220-1230.
63. Balagopal A, Philip FH, Astemborski J, Bloch TM, Mehta A, Long R, Kirk GD, Mehta SH, Cox AL, Thomas DL, Ray SC. Human immunodeficiency virus-related microbial translocation and progression of hepatitis C. *Gastroenterology* 2008;135:226-233.
64. French AL, Evans CT, Agniel DM, Cohen MH, Peters M, Landay AL, Desai SN, Microbial translocation and liver disease progression in women infected with HIV and hepatitis C virus. *The Journal of infectious diseases* 2013;208:679-689.
65. Ogawa Y, Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, Tomeno W, Shinohara Y, Kato S, Mawatari H, Nozaki Y, Fujita K, Kirikoshi H, Maeda S, Saito S, Wada K, Nakajima A. Soluble CD14 levels reflect liver inflammation in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *PloS One* 2013;8:e65211.

66. Abu-Shanab A, Quigley EMM. The role of gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2010;7:691-701.
67. Ganz T. Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity. *Nature Reviews Immunology* 2003;3:710-720.
68. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides. The ancient arm of the human immune system. *Virulence* 2010;1:5:1-25.
69. Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Pharmac Ther* 1995;66:191-205.
70. Cunliffe RN, Mahida YR. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J Leukoc Biol* 2004;75:49-58.
71. Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Bevins CL, Stange EF. Mechanisms of Disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nature clinical practice gastroenterology and hepatology* 2005;2(9):406-415.
72. Sorensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol* 2005;174:4870-4879.
73. Menendez A, Finlay BB. Defensins in the immunology of bacterial infections. *Current Opinion in Immunology* 2007;19:385-391.
74. Sherman H, Chapnik N, Froy O. Albumin and amino acids upregulate the expression of human beta-defensin 1. *Mol Immunol* 2006;43:1617-1623.
75. Kraemer BF, Campbell RA, Schwertz H, Cody MJ, Franks Z, Tolley ND, Kahr WH, Lindemann S, Seizer P, Yost CC, Zimmerman GA, Weyrich AS. Novel anti-bacterial activities of beta-defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. *Plos pathogens* 2011;7:e1002355.
76. Steubesand N, Kiehne K, Brunke G, Pahl R, Reiss K, Herzig KH, Schubert S, Schreiber S, Folsch UR, Rosenstiel P, Arlt A. The expression of the β -defensins hBD-2 and hBD-3 is differentially regulated by NF- κ B and MAPK/A-1 pathways in an *in vitro* model of *Candida* esophagitis. *BMC Immunology* 2009;10:36.
77. Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, Stange EF, Schroder JM, Harder J. NOD2/CARD15 Mediates Induction of the Antimicrobial Peptide Human Beta-defensin-2. *The Journal of Biological Chemistry* 2006;281:4:2005-2011.
78. Vora P, Youdim A, Thomas LS, Fukata M, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, Wada A, Hirayama T, Arditi M, Abreu MT. β -Defensin-2 Expression is Regulated by TLR Signaling in Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* 2004;173:5398-5405.
79. Menzies BE, Kenoyer A. Signal transduction and nuclear responses in *Staphylococcus aureus*-induced expression of human beta-defensin 3 in skin keratinocytes. *Infect Immun* 2006;74:6847-6854.
80. Yamamoto-Furusho JK, Barnich N, Hisamatsu T, Podolsky DK. MDP-NOD2 stimulation induces HNP-1 secretion which contributes to NOD2 anti-bacterial function. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16(5):736-742.

81. Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, Yang D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis* 2003;62 (Suppl II):ii17-ii21.
82. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* 2011;9:356-368.
83. Wilson CL, Quellet AJ, Satchell DP, Ayabe T, Lopez-Boado YS, Stratman JL, Hultgren SJ, Matrisian LM, Parks WC. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 1999;286(5437):113-7.
84. Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 2003;422(6931):522-6.
85. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schroder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal α -defensin expression. *Gut* 2004;53:1658-1664.
86. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease. *PNAS* 2005;102(50):18129-18134.
87. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005;307(5710):731-4.
88. Frye M, Bargon J, Lembcke B, Wagner TOF, Gropp R. Differential expression of human α - and β -defensins mRNA in gastrointestinal epithelia. *European Journal of Clinical Investigation* 2000;30:695-701.
89. Wehkamp J, Stange EF. A New Look at Crohn's disease. Breakdown of the Mucosal Antibacterial Defense. *Annals New York Academy of Sciences* 2006;1072:321-331.
90. Nuding S, Fellermann K, Wehkamp J, Stange EF. Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut* 2007;56:1240-1247.
91. Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, Stange EF. Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *Journal of Leukocyte Biology* 2005;77:460-465.
92. Aldhous MC, Noble CL, Satsangi J. Dysregulation of Human β -Defensin-2 Protein in Inflammatory Bowel Disease. *Plos One* 2009;4(7):e6285.
93. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB Jr, Ganz T. Human β -Defensin-1: An Antimicrobial Peptide of Urogenital Tissues. *J. Clin. Invest.* 1998;101(8):1633-1642.

94. Spencer JD, Hains DS, Porter E, Bevins CL, DiRosario J, Becknell B, Wang H, Schwaderer AL. Human Alpha Defensin 5 Expression in the Human Kidney and Urinary Tract. *Plos One* 2012;7(2):e31712.
95. Hiratsuka T, Nakazato M, Ihi T, Minematsu T, Chino N, Nakanishi T, Shimizu A, Kangawa K, Matsukura S. Structural analysis of human beta-defensin-1 and its significance in urinary tract infection. *Nephron* 2000;85(1):34-40.
96. Lehmann J, Retz M, Harder J, Krams M, Kellner U, Hartmann J, Hohgrawe K, Raffenberg U, Gerber M, Loch T, Weichert-Jacobsen K, Stockle M. Expression of human beta-defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. *BMC Infectious Diseases* 2002;2:20:1-10.
97. Saraheimo M, Forsblom C, Pettersson-Fernholm, Flyvbjerg A, Groop P-H, Frystyk J. Increased levels of α -defensins (-1 -2 and -3) in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:914-918.
98. Muller CA, Markovic-Lipkovski J, Klatt T, Gamper J, Schwarz G, Beck H, Deeg M, Kalbacher H, Widmann S, Wessels JT, Becker V, Muller GA, Flad T. Human α -Defensins HNPs -1, -2, and -3 in Renal Cell Carcinoma. Influences on Tumor Cell Proliferation. *American Journal of Pathology* 2002;160(4):1311-1324.
99. Starner TD, Agerberth B, Gudmundsson GH, McCray PB. Expression and Activity of β -Defensins and LL-37 in the Developing Human Lung. *The Journal of Immunology* 2005;174:1608-1615.
100. Moser C, Weiner DJ, Lysenko E, Bals R, Weiser JN, Wilson JM. β -Defensin 1 Contributes to Pulmonary Innate Immunity in Mice. *Infection and immunity* 2002;70(6):3068-3072.
101. Andresen E, Gunther G, Bullwinkel J, Lange C, Heine H. Increased Expression of Beta-Defensin-1 (DEFB1) in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PlosOne* 2011;6(7):e21898.
102. Kallsen K, Andresen E, Heine H. Histone Deacetylase (HDAC) 1 Controls the Expression of Beta Defensin 1 in Human Lung Epithelial Cells. *Plos One* 2012;7(11):e50000.
103. Pace E, Ferraro M, Minervini MI, Vitulo P, Pipitone L, Chiappara G, Siena L, Montalbano AM, Johnson M, Gjomarkaj M. Beta Defensin-2 Is Reduced in Central but Not in Distal Airways of Smoker COPD Patients. *Plos One* 2012;7(3):e33601.
104. Rivas-Santiago B, Schwander SK, Sarabia C, Diamond G, Klein-Patel ME, Herrnandez-Pando R, Ellner JJ, Sada E. Human β -Defensin 2 Is Expressed and Associated with Mycobacterium tuberculosis during Infection of Human Alveolar Epithelial Cells. *Infection and immunity* 2005;73(8):4505-4511.
105. Ishimoto H, Mukae H, Date Y, Shimbara T, Mondal MS, Ashitani J, Hiratsuka T, Kubo S, Kohno S, Nakazato M. Identification of hBD-3 in respiratory tract and serum: the increase in pneumonia. *Eur Respir J* 2006;27:253-260.

106. Scharf S, Vardarova K, Lang F, Schmeck B, Opitz B, Flieger A, Heuner K, Hippenstiel S, Suttorp N, N'Guessan PD. Legionella pneumophila induces human beta Defensin-3 in pulmonary cells. *Respiratory Research* 2010;11:93.
107. Jansen PAM, Rodijk-Olthuis D, Hollox EJ, Kamsteeg M, Tjabringa GS, de Jongh GJ, van Vlijmen-Willems IMJJ, Bergboer JGM, van Rossum MM, de Jong EMGJ, den Heijer M, Evers AWM, Bergers M, Armour JAL, Zeeuwen PLJM, Schalkwijk J. β -Defensin-2 Protein Is a Serum Biomarker for Disease Activity in Psoriasis and Reaches Biologically Relevant Concentrations in Lesional Skin. *Plos One* 2009;4(3):e4725.
108. Hollox EJ, Huffmeier U, Zeeuwen PLJM, Palla R, Lascorz J, Rodijk-Olthuis D, van de Kerkhof PCM, Traupe H, de Jongh G, den Heijer M, Reis A, Armour JAL, Schalkwijk J. Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nat Genet.* 2008;40(1):23-25.
109. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DYM. Endogenous Antimicrobial Peptides and Skin Infections in Atopic Dermatitis. *The New England Journal of Medicine* 2002;347(15):1151-1160.
110. Cogen AL, Walker SL, Roberts CH, Hagge DA, Neupane KD, Khadge S, Lockwood DNJ. Human Beta-Defensin 3 Is Up-Regulated in Cutaneous Leprosy Type 1 Reactions. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2012;6(11):e1869.
111. Bamias G, Goukos D, Laoudi E, Balla IG, Siakavellas SI, Daikos GL, Ladas SD. Comparative study of candidate housekeeping genes for quantification of target gene messenger RNA expression by real-time PCR in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19(13):2840-7.
112. Campos J, Gonzalez-Quintela A, Quintero C, Gude F, Perez LF, Torre JA, Vidal C. The -159C/T polymorphism in the promoter region of the CD14 gene is associated with advanced liver disease and higher serum levels of acute-phase proteins in heavy drinkers. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2005;29:1206-1213.
113. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19(3):491-511.
114. Aceti A, Mangoni ML, Pasquazzi C, Fiocco D, Marangi M, Miele R, Zachini B, Borro M, Versace I, Simmaco M. α -Defensin increase in peripheral blood mononuclear cells from patients with hepatitis C virus chronic infection. *Journal of Viral Hepatitis* 2006;1(3):821-827.
115. Harada K, Ohba K, Ozaki S, Isse K, Hirayama T, Wada A, Nakanuma Y. Peptide Antibiotic Human Beta-Defensin-1 and -2 Contribute to Antimicrobial Defense of the Intrahepatic Biliary Tree. *Hepatology* 2004;40:925-932.
116. Vauthey JN, Duda P, Wheatley AM, Gertsch P. Portal hypertension promotes bacterial translocation in rats mono- and non mono-associated with Escherichia coli C25. *HPB surgery* 1994;8:95-100.

117. Yao GX, Shen ZY, Xue XB, Yang Z. Intestinal permeability in rats with CCl₄-induced portal hypertension. *World Journal of Gastroenterology* 2006;12:479-481.
118. Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM. Granulocyte colony-stimulating factor improves deficient in vitro neutrophil transendothelial migration in patients with advanced liver disease. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2002;9:433-439.
119. Ramachandran A, Balasubramanian KA. Intestinal dysfunction in liver cirrhosis: Its role in spontaneous bacterial peritonitis. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2001;16:607-612.
120. Sunami Y, Leithauser F, Gul S, Fiedler K, Guldiken N, Espenlaub S, Holzmann KH, Hipp N, Sindrilaru A, Luedde T, Baumann B, Wissel S, Kreppel F, Schneider M, Scharffetter-Kochanek K, Kochanek S, Strnad P, Wirth T. Hepatic activation of IKK β /NF- κ B signaling induces liver fibrosis via macrophage-mediated chronic inflammation. *Hepatology* 2012;56(3):1117-28.
121. Luedde T, Schwabe RF. NF- κ B in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8(2):108-118.
122. Fagan KJ, Rogers GB, Melino M, Arthur DM, Costello ME, Morrison M, Powell EE, Irvine KM. Ascites Bacterial Burden and Immune Cell Profile Are Associated with Poor Clinical Outcomes in the Absence of Overt Infection. *PlosOne* 2015;10(3):e0120642.
123. Rogers GB, van der Gast CJ, Bruce KD, Marsh P, Collins JE, Sutton J, Wright M. Ascitic Microbiota Composition Is Correlated with Clinical Severity in Cirrhosis with Portal Hypertension. *PlosOne* 2013;8(9):e74884.
124. Montalto M, Gallo A, Ferrulli A, Visca D, Campobasso E, Cardone S, D'Onofrio F, Santoro L, Covino M, Mirijello A, Leggio L, Gasbarrini G, Addolorato G. Fecal calprotectin concentrations in alcoholic patients: a longitudinal study. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2001;23:76-80.
125. Gundling F, Schmidtler F, Hapfelmeier A, Schulte B, Schmidt T, Pehl C, Schepp W, Seidl H. Fecal calprotectin is a useful screening parameter for hepatic encephalopathy and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis. *Liver international* 2011;31:1406-1415.
126. Loo WT, Bai LJ, Fan CB, Yue Y, Dou YD, Wang M, Liang H, Cheung MN, Chow L, Li JL, Tian Y, Qing L. Clinical application of human beta-defensin and CD14 gene polymorphism in evaluating the status of chronic inflammation. *Journal of translational medicine* 2012;10 Suppl 1:S9.
127. Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* 2004;23:327-333.
128. Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH. CD-14 dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem* 2000;275:29731-29736.

129. O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. Expression and Regulation of the Human β -Defensins hBD-1 and hBD-2 in Intestinal Epithelium. *J Immunol* 1999;163:6718-6724.
130. Gutiérrez A, Holler E, Zapater P, Sempere L, Jover R, Pérez-Mateo M, Schoelmerich J, Such J, Wiest R, Francés R. Antimicrobial Peptide Response to Blood Translocation of Bacterial DNA in Crohn's Disease Is Affected by NOD2/CARD15 Genotype. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17(8):1641-1650.
131. Hosomi S, Kaser A, Blumberg RS. Role of endoplasmic reticulum stress and autophagy as interlinking pathways in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2015;31:81-88.
132. Teltschik Z, Wiest R, Beisner J, Nuding S, Hofmann C, Schoelmerich J, Bevins CL, Stange EF, Wehkamp J. Intestinal bacterial translocation in rats with cirrhosis is related to compromised Paneth cell antimicrobial host defense. *Hepatology* 2012;55:1154-1163.
133. Shi J. Defensins and Paneth Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1284-1292.
134. Mallow EB, Harris A, Salzman N, Russell JP, DeBerardinis RJ, Ruchelli E, Bevins CL. Human Enteric Defensins. Gene structure and developmental expression. *The Journal of Biological Chemistry* 1996;271(8):4038-4045.
135. Hasler R, Jacobs G, Till A, Grabe N, Cordes C, Nikolaus S, Lao K, Schreiber S, Rosenstiel P. Microbial pattern recognition causes distinct functional micro-RNA signatures in primary human monocytes. *PlosOne* 2012;7:e31151.