



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

Α΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Κ. ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΖΩΓΡΑΦΟΥ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΛΠΕΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΠΑΠΑΛΟΗΣ

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ-(MESENCHYMAL STEM CELLS-MSCs) ΣΕ ΠΡΟΤΥΠΟ ΗΠΑΤΙΚΗΣ
ΒΛΑΒΗΣ ΣΕ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥΣ. ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ

ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΥ Σ. ΚΑΤΣΕΛΗ

ΙΑΤΡΟΥ

ΑΘΗΝΑ, ΜΑΙΟΣ 2017

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα.....	2
Γενικά Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής.....	5
Όρκος του Ιπποκράτη.....	7
Ευχαριστίες.....	9
Συνοπτικό Βιογραφικό Σημείωμα.....	9
Γενικό Μέρος.....	11
Εισαγωγή.....	11
1.1 Επιδημιολογία της ηπατικής τοξικότητας της παρακεταμόλης.....	14
1.2 Παθογένεση Οξείας Ηπατικής Ανεπάρκειας.....	15
1.3 Κλινική εικόνα.....	20
2. Μηχανισμοί Ηπατικής Αναγέννησης.....	21
3. Πολυδύναμα Βλαστικά Κύτταρα και Ηπατική Αναγέννηση.....	38
4. Συμπέρασμα.....	50
Ειδικό μέρος.....	53
Σκοπός της μελέτης.....	53
Υλικά και Μέθοδοι.....	56
Α. Πειραματόζωα.....	56

Ανατομία ήπατος.....	56
1.1 Διαστάσεις και σύνδεσμοι.....	56
1.2 Ηπατικοί λοβοί.....	57
1.3 Ηπατική αιμάτωση.....	59
B. Πρόκληση Οξείας Ηπατικής Βλάβης.....	60
Γ. Απομόνωση και καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων λιπώδους ιστού από αρουραίους.....	61
Δ. Χορήγηση Βλαστικών κυττάρων Λιπώδους Ιστού.....	61
Ε. Διατήρηση πειραματόζων και ευθανασία.....	62
ΣΤ. Ιστολογική Παρασκευή.....	62
Ζ. Ανίχνευση των βλαστικών κυττάρων λιπώδους ιστού με υβριδοποίηση in situ (FISH).....	63
Η. Ανοσοϊστοχημεία του Ηπατικού Αυξητικού Παράγοντα (HGF).....	64
Θ. Εξαγωγή RNA και χρήση της αναστροφής μεταγραφάσης με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (RT-PCR) στην μελέτη των παραγόντων: HGF και HNF4a.....	65
Ι. Στατιστική Ανάλυση.....	66
Αποτελέσματα.....	67
Ιστολογική Εκτίμηση.....	67
Υβριδισμός In Situ (FISH).....	71

Ανοσοϊστοχημεία του ηπατικού αυξητικού παράγοντα (HGF).....	74
Επίπεδα έκφρασης mRNA του ηπατικού πυρηνικού παράγοντα 4α (HNF4a).....	92
Επίπεδα έκφρασης mRNA του ηπατικού αυξητικού παράγοντα (HGF).....	99
Συζήτηση.....	107
Περίληψη.....	110
Summary.....	111
Βιβλιογραφία.....	112

Γενικά Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής

Τίτλος: Πειραματική απομόνωση και μεταμόσχευση μεσεγχυματικών κυττάρων (Mesenchymal Stem Cells –MSCs) σε πρότυπο ηπατικής βλάβης σε αρουραίους. Ιστοπαθολογική μελέτη.

Ημερομηνία αίτησης εκπόνησης διδακτορικής διατριβής του υποψηφίου:

Ημερομηνία και αριθμός πρωτοκόλλου ορισμού της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 7003-24/3/2011

Σύσταση Τριμελούς Επιτροπής:

- 1) κ. Κωνσταντίνος Τούτουζας, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής – Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ
- 2) κ. Γεώργιος Ζωγράφος, Καθηγητής Χειρουργικής
- 3) κ. Γεώργιος Θεοδωρόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής

Ημερομηνία ορισμού θέματός διδακτορικής διατριβής: 10740-20/5/2011

Ημερομηνία χορήγησης και αριθμός πρωτοκόλλου έγκρισης από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου: 15288-15/7/20011

Κέντρο διεξαγωγής του πειραματικού τμήματος της μελέτης: Πειραματικό Εργαστήριο της φαρμακευτικής εταιρίας ΕΛΠΕΝ σε συνεργασία με την Α΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Εκθέσεις προόδου:

1^η Έκθεση προόδου: 7158-09/05/2012

2^η Έκθεση προόδου: 3270-07/03/2014

3^η Έκθεση προόδου: 1617019604-03/03/2017

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής:

Σύσταση επταμελούς επιτροπής:

1. κ. Ζωγράφος Γεώργιος
2. κ. Κωνσταντουλάκης Μανούσος
3. κ. Τούτουζας Κωνσταντίνος του Γεωργίου
4. κ. Θεοδωρόπουλος Γεώργιος
5. κ. Μενενάκος Ευάγγελος
6. κ. Αλεξάκης Νικόλαος
7. κ. Θεοδώρου Δημήτριος

Ὄρκος του Ιπποκράτη

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγείαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρῃεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, 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 οὐδενὶ Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ. δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνώως δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω 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 ἀνδρώων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπήης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἂ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρῃετα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιπορκοῦντι, 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 κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέρφια 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.

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής κατανοώ σε όλη την έκταση πως η εργασία όλων αυτών των χρόνων είναι αποτέλεσμα τόσο της προσωπικής προσπάθειας όσο και της συνδρομής πολλών ατόμων, στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Γεώργιο Ζωγράφο Διευθυντή και Καθηγητή της Α' Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής, για την ευκαιρία που μου έδωσε αλλά και για τη σημαντική συμβολή του στην περάτωση της παρούσας εργασίας.

Επίσης, εκφράζω τις ευχαριστίες μου

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Όνοματεπώνυμο:

Κατσέλης Χαράλαμπος του Σωτηρίου

Τόπος και Έτος Γεννήσεως: Αθήνα, 2/7/1982
Διεύθυνση: Σερίφου 4, Κάτω Πατήσια, Αθήνα,
Τ.Κ. 11254
Τηλέφωνο: 6979003612, 2102110134
Ηλεκτρονική Διεύθυνση: sokatse@yahoo.gr ,
harry.katselis@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Ημερομηνίες (από-έως)	Οκτώβριος 2000 – Οκτώβριος 2006
Τίτλος	Πτυχίο σχολής Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Βαθμός	8
Ημερομηνίες (από-έως)	Σεπτέμβριος 1997 – Ιούνιος 2000
	Απολυτήριο Λυκείου από το 1 ^ο Ενιαίο Λύκειο Θηβών
Βαθμός	19,6
Ξένες Γλώσσες	Αγγλικά: Certificate of Proficiency In English, University of Michigan (2004)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Επωνυμία του εργοδότη

Ελληνικός Στρατός

Απασχόληση

Ιατρός άνευ ειδικότητας

Ημερομηνίες

Αύγουστος 2007 – Μάϊος 2008

Επωνυμία του εργοδότη

Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο

Αθηνών Ιπποκράτειο

Απασχόληση

Ειδικευόμενος Γενικής Χειρουργικής

Ημερομηνίες

Ιούνιος 2011 – Ιούνιος 2014

Επωνυμία του εργοδότη

Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό

Κέντρο

Απασχόληση

Ειδικευόμενος Χειρουργικής

Θώρακος/Καρδιάς

Ημερομηνίες

Αύγουστος 2014 – Αύγουστος
2016

Επωνυμία του εργοδότη

Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο

Νοσημάτων Θώρακος Σωτηρία

Απασχόληση

Ειδικευόμενος Χειρουργικής

Ημερομηνίες	Θώρακος Νοέμβριος 2016 – Νοέμβριος 2018
Επωνυμία του εργοδότη	Γενικό Νοσοκομείο Μασαχουσέτης, Τμήμα Τραύματος, Επείγουσας Χειρουργικής και Εντατικής Φροντίδας
Απασχόληση	Συμμετοχή στις δραστηριότητες του Τμήματος, διαλέξεις, ιατρική Επίσκεψη στην κλινική, Χειρουργικές επεμβάσεις, Κλινική και πειραματικά Πρωτόκολλα
Ημερομηνίες	Νοέμβριος- Δεκέμβριος 2006

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΙΑΤΡΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Η πρόκληση ηπατικής βλάβης με τη χρήση της παρακεταμόλης είναι υπεύθυνη για την αύξηση του αριθμού των κρουσμάτων φαρμακευτικής τοξικότητας στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική σε σύγκριση με τις αναπτυσσόμενες χώρες. Οι θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση της οξείας ηπατικής ανεπάρκειας παραμένουν περιορισμένες καθώς η φαρμακευτική αντιμετώπιση είναι κυρίως συμπτωματική ενώ η χειρουργική προσκρούει στην έλλειψη ηπατικών μοσχευμάτων. Νέα πειραματικά πρωτόκολλα αναπτύσσονται σε αναζήτηση νέων βιώσιμων μεθόδων στην αντιμετώπιση της οξείας ηπατικής βλάβης καθώς και της ηπατικής νόσου τελικού σταδίου. Η μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων αποτελεί μια νέα υποσχόμενη θεραπευτική μέθοδο για την ανακούφιση της οξείας ηπατικής νόσου.

Τα βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών τύπων. Φλεγμονώδεις και ειδικοί ηπατικοί παράγοντες επηρεάζουν τη μετατροπή των πολυδύναμων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs) σε ηπατικά. Τα διαφοροποιημένα βλαστικά κύτταρα αποκτούν μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά ηπατικών

κυττάρων. Επιπρόσθετα τα βλαστικά κύτταρα επάγουν την ηπατική αναγέννηση (LG) και περιορίζουν την ηπατική ίνωση. Πρόσφατα πειραματικά πρωτόκολλα σε αρουραίους και ποντίκια δίνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα παρόλο που αρκετά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα όπως το είδος και η ποσότητα των (MSCs), η οδός χορήγησης καθώς και η επώαση ή όχι των βλαστικών κυττάρων με αυξητικούς παράγοντες πριν τη μεταμόσχευσή τους. Κλείνοντας αυτό το εισαγωγικό σημείωμα θα πρέπει να τονίσουμε πως ο κίνδυνος απόκλισης των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων προς την καρκινογένεση είναι εξαιρετικά μικρός.

1.1 Επιδημιολογία της ηπατικής τοξικότητας της παρακεταμόλης

Η παρακεταμόλη αποτελεί το συχνότερα χρησιμοποιούμενο αναλγητικό το οποίο χορηγείται τα τελευταία χρόνια σε συνδυασμό και με οπιοειδή. Η ελάχιστη απαιτούμενη δόση για την πρόκληση ηπατικής τοξικότητας αγγίζει τα 7 έως 10 γραμμάρια στους ενήλικες και στα παιδιά τα 150 έως 200 χιλιοστά του γραμμαρίου ανά χιλιόγραμμο βάρους σώματος.

Τα νέα περιστατικά ηπατικής τοξικότητας κατ' έτος ανέρχονται σε 30 έως 70 χιλιάδες στις ανεπτυγμένες χώρες της Ευρώπης και της Αμερικής. Το ήμισυ των περιστατικών (48%) δηλώνει ακούσια λήψη αυξημένης δόσης παρακεταμόλης ενώ το (52%) εκούσια λήψη ^[101]. Οφείλουμε να σημειώσουμε ότι παρότι η πλειονότητα των περιστατικών παρουσιάζει ήπια συμπτωματολογία, όπως ηπατίτιδα, χολόσταση και ασυμπτωματική κίνηση ηπατικών ενζύμων, η τοξικότητα από παρακεταμόλη ευθύνεται για το 48% των διαγνώσεων οξείας ηπατικής ανεπάρκειας (AHI). Επίσης μελέτες καταδεικνύουν ότι το 29% των ασθενών που διαγιγνώσκονται με (AHI) λόγω της παρακεταμόλης χρήζουν ηπατικής μεταμόσχευσης ενώ η θνησιμότητα σε αυτή την ομάδα ανέρχεται σε 26% ^[101].

Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί πως σε μια προσπάθεια προληπτικού περιορισμού νέων περιστατικών τοξικότητας από παρακεταμόλη έχει μειωθεί η περιεκτικότητα των εμπορικών φαρμακευτικών σκευασμάτων. Παρόλα αυτά λόγω του μεγάλου όγκου νέων συνταγών σε παρακεταμόλη ή σε συνδυασμό με οπιοειδή ένα ποσοστό 6% αυτών ενέχει τον κίνδυνο να αυξάνει τα επίπεδα της χορηγούμενης παρακεταμόλης σε επίπεδα άνω των 4 γραμμαρίων ανά δόση και αυτό αποτελεί πηγή πρόσθετης ανησυχίας. Κλείνοντας, επιδημιολογικές μελέτες διαπιστώνουν πως υπάρχει έλλειμα γνώσης σχετικά με τις επιβλαβείς δράσεις της παρακεταμόλης (APAP) καθώς και στον πιθανό συνεργικό κίνδυνο που ενέχουν όταν λαμβάνονται με μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη.

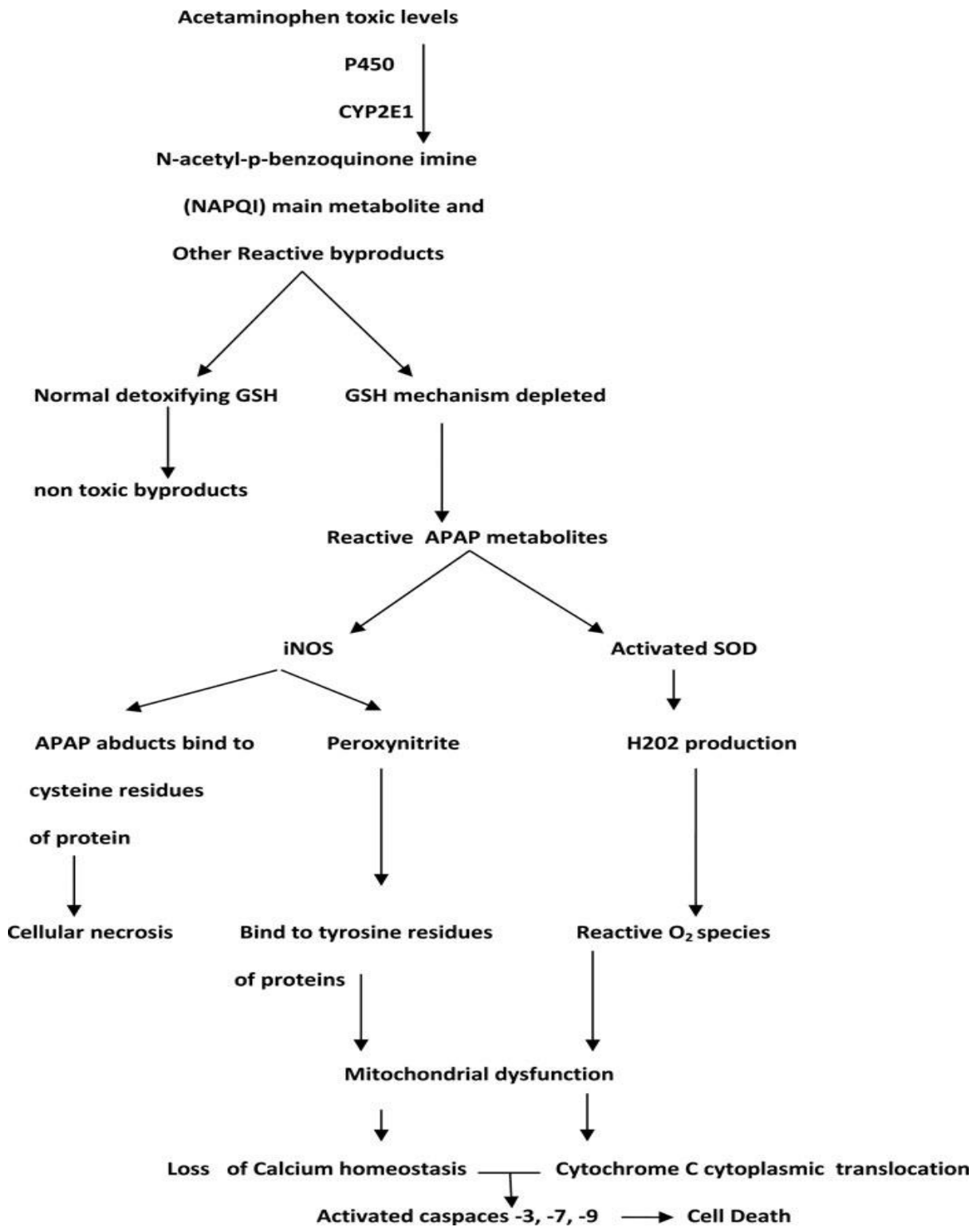
1.2 Παθογένεση Οξείας Ηπατικής Ανεπάρκειας

Τα υψηλά τοξικά επίπεδα της ακεταμινοφαίνης είναι υπεύθυνα για τον επιβλαβή φαύλο κύκλο της ηπατικής δυσλειτουργίας. Τα επίκεντρο αυτής της δυσπραγίας εντοπίζεται αρχικά στην κεντρολοβιακή περιοχή κάθε ηπατικού λοβίου όπου παρατηρούνται και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της παρακεταμόλης και επεκτείνεται προς την περιπυλαία περιοχή^[1,2].

Φυσιολογικά ο μεταβολισμός της ακεταμινοφαίνης διενεργείται στα ηπατικά μικροσωμάτια μέσω δύο οδών: α) σε ποσοστό 90% μέσω της ουριδίνης-5'-διφωσφο-γλυκουρόνοσυλ-τρανσφοράσης (UTG) η οποία καταλύει την μετατροπή της παρακεταμόλης (APAP) σε γλυκορονικούς και σουλφιδικούς μεταβολίτες οι οποίοι απεκκρίνονται μέσω των ούρων και β) σε ποσοστό 10% μέσω του κυτοχρώματος 2E1 (CYP2E1) ακολουθεί η οξείδωση τύπου I της παρακεταμόλης στον ενδιάμεσο τοξικό μεταβολίτη N-ακέτυλ-παρα-βένζο-κουινόνη ίμίνη (NAPQI) ο οποίος μετατρέπεται σε ανενεργό παράγωγο με το μεταβολικό μονοπάτι της γλουταθειόνης^[3,101] (Σχήμα 1). Επίσης μία μικρή ποσότητα 2% απεκκρίνεται αμετάβλητη με τα ούρα.

Στην περίπτωση τοξικών επιπέδων παρακεταμόλης, το μονοπάτι της γλυκορονικής και σουλφιδικής μετατροπής της APAP οδηγείται σε κορεσμό. Ως συνέπεια ο καταβολισμός διενεργείται μέσω του

κυτοχρώματος και ο ενδιάμεσος μεταβολίτης (NAPQI) παράγεται σε υψηλές συγκεντρώσεις και επάγει την ηπατική τοξικότητα^[4,10]. Ο μηχανισμός πρόκλησης της ηπατικής βλάβης περιλαμβάνει τη δραματική μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) η οποία συμβάλει στην απενεργοποίηση του τοξικού παράγοντα (NAPQI). Ο προαναφερόμενος μεταβολίτης σε συνδυασμό με άλλα ενδιάμεσα παράγωγα υπόκεινται στην καταλυτική επίδραση της επαγόμενης συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (INOS) καθώς και της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD). Η INOS συμβάλει στην πρόσδεση των ενδιάμεσων μεταβολιτών της APAP σε αμινοξέα κυστεΐνης και τυροσίνης σε πλειάδα κυτταρικών πρωτεϊνών είτε άμεσα ή μέσω της αυξημένης παραγωγής περοξυνιτρίτη^[4-7].



Σχήμα 1. Τοξικά επίπεδα ακεταμινοφαίνης και η παθογένεση της κυτταρικής νέκρωσης και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου

Παράλληλα, η SOD επάγει την αύξηση των επιπέδων του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) με συνέπεια την απελευθέρωση υψηλών συγκεντρώσεων ελευθέρων ριζών και επακόλουθη οξειδωση των λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης και των ενδοκυττάρων οργανυλίων που καταλήγει σε σημαντική τοξική επίδραση στην κυτταρική ομοιοστασία.

Επιπρόσθετα, τα ενδιάμεσα παράγωγα της παρακεταμόλης προκαλούν δομικές μεταβολές στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων καθώς και τον κατακερματισμό του κυτταρικού DNA. Η μιτοχονδριακή βλάβη έγκειται στις μεταβολές της οξειδωτικής αλύσου για την παραγωγή ενέργειας ATP καθώς και σε διάνοιξη των πόρων της μιτοχονδριακής μεμβράνης με συνέπεια την απώλεια του ηλεκτρολυτικού δυναμικού εκατέρωθεν αυτής και της περαιτέρω επιδείνωση στην παραγωγή ενέργειας. Επίσης η διαταραχή στην μεμβράνη οδηγεί στην μετακίνηση σιδήρου στο μιτοχόνδριο που ενισχύει την απορρύθμιση του με την απελευθέρωση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, απώλεια της ομοιοστασίας του ασβεστίου καθώς και στην μετατόπιση του κυτοχρώματος c από το μιτοχόνδριο στον ενδοκυττάριο χώρο. Το τελευταίο ένζυμο διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο στην ενεργοποίηση των κασπασών -3, -7 και -9 που με τη σειρά τους επάγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο^[8-13]. Από την άλλη πλευρά ο κατακερματισμός του DNA είναι προϊόν της απελευθέρωσης διαμεμβρανικών μιτοχονδριακών ενζύμων όπως η ενδονουκλεάση καθώς και ο αποπτωτικός παράγοντας (AIF). Οι προαναφερθείσες πρωτεΐνες μετατοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου και οδηγούν σε κατατμήσεις του γενετικού υλικού σε άλλοτε άλλης έκταση. Σημαντικό ρόλο φαίνεται πως διαδραματίζει και η δεοξυριβονουκλεάση-1 η οποία εκκρίνεται στην αιματική κυκλοφορία και συμμετέχει στην κατάτμηση του DNA γειτονικών κυττάρων, κυρίως στις περιπυλαίες περιοχές, που υπόκεινται κυτταρική νέκρωση. Οφείλουμε να σημειώσουμε πως ο κυτταρικός θάνατος είναι το τελικό αποτέλεσμα τόσο των ανωτέρω διεργασιών όσο και των δομικά τροποποιημένων πρωτεϊνών μέσω της σύνδεση ενδιάμεσων παραγώγων της παρακεταμόλης με τις παράπλευρες χημικές ομάδες αμινοξέων κυστεΐνης. Παρόλα αυτά δεν είναι διακριβωμένο αν η κυτταρική απώλεια

οφείλεται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή κυτταρική νέκρωση^[8-13] παρότι οι ενδείξεις της ογκοτικής βλάβης με οίδημα των κυτταρικών οργανυλίων, πυρηνολυσία και φλεγμονή συντείνουν στην δεύτερη εκδοχή^[102] (Σχήμα 1).

Η βασική ανατομική και βιοχημική μονάδα του ήπατος είναι το ηπατικό λόβιο και είναι υπεύθυνο για την αποτοξίνωση των πληθώρας φαρμακευτικών ουσιών όπως και της παρακεταμόλης. Τα υψηλά επίπεδα της APAP και των τοξικών υποπροϊόντων της στα οποία εκτίθεται το ηπατικό λόβιο έχει ως συνέπεια την παρουσία άλλοτε άλλης έκτασης ιστικές βλάβες κατά μήκος των τριών περιοχών που του ηπατικού λοβίου. Πράγματι, η απώλεια κυτταρικού πληθυσμού είναι εξεσημασμένη πλησίον των κεντρολοβιακών φλεβιδίων όπου παρατηρείται αιμορραγική νέκρωση^[2,14] ενώ στη μέση και την περιπυλαία ζώνη αυτού η βλάβη είναι μικρότερης βαρύτητας και έκτασης. Κύρια αιτία αυτής της εικόνας είναι τα υψηλότερα επίπεδα παρακεταμόλης και των παραγώγων αυτής στο κέντρο κάθε λοβίου, όπου εντοπίζεται και η φλεβική απορροή του, σε σχέση με τα περιφερικότερα τμήματα του. Επίσης, οφείλουμε να σημειώσουμε πως η πρόκληση βλάβης στην περιφέρεια εφόσον δεν είναι καταστροφική επάγει πληθώρα παραγόντων. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται οι αυξητικοί παράγοντες FGF-1,-2 HGF και VEGF^[15,19]. Σύμφωνα με πειραματικές μελέτες τα μόρια FGF-1 και FGF-2 συμβάλουν στην ελάττωση της ηπατικής βλάβης μέσω της αύξησης της έκφρασης των γονιδίων του κυτοχρώματος P450 με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση τοξικών μεταβολιτών ενώ οι παράγοντες VEGF και HGF συμμετέχουν στο επόμενο στάδιο της ηπατικής αναγέννησης μέσω της πρόκλησης της νεοαγγειογένεσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού^[103] αντίστοιχα. Επιπλέον τα επίπεδα μικρών ενδοκυττάρων μορίων miRNAs^[16,17,18,20] όπως: miR-122, miR-155 και miR-21 αυξάνονται πρώιμα κατά την πρόκληση της ηπατικής βλάβης και συμμετέχουν στην ελάττωση της φλεγμονής^[105], στην επαγωγή φλεγμονωδών παραγόντων καθώς και στην ελάττωση της ηπατικής ίνωσης^[104]. Επιπρόσθετα τα κύτταρα Kupffer, μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα που συρρέουν στην περιοχή της βλάβης

εκκρίνουν α) κυτοκίνες: TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-6 και β) χημειουποδοχείς CCRX και MIF-2 καθώς ^[13,22,106]. Οι περισσότεροι από τους άνωθεν παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο επόμενο στάδιο της ηπατικής αναγέννησης όπως θα δούμε παρακάτω. Εξαιρέση αποτελεί ο TNF-α που εμφανίζει διττό ρόλο τόσο στην αύξηση της έντασης της ηπατικής βλάβης^[21] όσο και στην ηπατική αναγέννηση. Πειραματικές μελέτες σημειώνουν σημαντικό βαθμό ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης JNK μέσω του TNF-α κατά τα πρώιμα στάδια της τοξικής βλάβης του ήπατος. Το συγκεκριμένο μονοπάτι ευθύνεται για την επιτάχυνση του κυτταρικού θανάτου μετά την έκθεση υψηλής συγκεντρώσεως παρακεταμόλης. Παράλληλα, άλλες κυτοκίνες όπως η IL-1 και IL-6 δεν προκαλούν ενεργοποίηση της JNK^[21].

Τέλος, θα αναφερθούμε στο ρόλο του ανοσολογικού μηχανισμού κατά την πρόκληση της ηπατικής βλάβης από την παρακεταμόλη. Υπάρχει διχογνωμία σχετικά με τον ακριβή ρόλο της ανοσολογικής απόκρισης. Πρόσφατες εργασίες υποστηρίζουν πως τα κύτταρα του ανοσολογικού μηχανισμού, μακροφάγα όσο και τα ουδετερόφιλα, που σπεύδουν στην περιοχή της ηπατικής φλεγμονής αλληλοεπιδρούν με παράγωγα της ογκοτικής νέκρωσης των ηπατοκυττάρων. Τα παράγωγα είναι μόρια της κυτταρικής βλάβης (DAMPs) και περιλαμβάνουν τμήματα του μιτοχονδριακού ή του γενομικού DNA, πεπτίδια φορμυλίου καθώς και φλεγμονώδη πρωτεϊνικά συσσωματώματα Nalp-3 ^[4,24,108]. Τα ανωτέρω μόρια αλληλοεπιδρούν με τον υποδοχέα TLR-9 των ουδετερόφιλων κυττάρων και επάγουν την αύξηση των επιπέδων των κυτοκινών IL-1β, TNF-α καθώς και των χημειοκινών M₁KC και MIP-2 μέσω του μεταγραφικού παράγοντα nf-KB^[4,22,24]. Στην επόμενη φάση τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα καθώς κάποιες μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα πως η αύξηση των ουδετερόφιλων δε συμβάλλει στην επίταση της ηπατικής βλάβης ^[4,22] ενώ άλλες σημειώνουν την πρόκληση της ηπατικής βλάβης μέσω του ανοσολογικού μηχανισμού ^[24,108]. Όλες οι εργασίες όμως διαπιστώνουν πως ο μηχανισμός δράσης των κυτοκινών καθώς και των μακροφάγων, Kurpfer, εντοπίζεται στην τροποποίηση της τοξικότητας που

προκαλείται μέσω επίδραση στη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (INOS) καθώς και στην παραγωγή κυτταρο-προστατευτικών πρωτεϊνών της οικογένειας (Heat Shock Proteins) ^[4,22]. Επιπλέον, τα μακροφάγα λειτουργούν και ως εκκαθαριστές του εξωκυττάριου χώρου από τα νεκρωμένα κύτταρα ^[22]. Σε αυτό το σημείο είναι χρήσιμο να τονίσουμε πως σε αυτό το πλαίσιο εκκρίνονται και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες ^[23] (MMP-13, -3, -9). Αυτές με τη σειρά τους ενεργοποιούν τον ηπατικό αυξητικό παράγοντα (HGF) ο οποίος διαδραματίζει διττό ρόλο, αφενός στην φάση της ηπατικής βλάβης συμβάλλει στην μείωση της ηπατικής ίνωσης μέσω κυτταρο-προστατευτικών μηχανισμών ^[107] και αφετέρου στο σημαντικό ρόλο που έχει στο επόμενο στάδιο της ηπατικής αναγέννησης. Επίσης, θα πρέπει να συμπληρώσουμε πως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες συμβάλλουν και αυτές τόσο στην ελάττωσή της ίνωσης όσο και στο επακόλουθο στάδιο της ηπατικής αναπλήρωσης ^[23]. Κλείνοντας, θα δούμε παρακάτω πως και κυτοκίνες όπως η IL-1, IL-6 και ο TNF-α συμμετέχουν ενεργά στην ηπατική αναγέννηση. Τέλος, θα πρέπει να τονίσουμε πως τα μόρια DAMPs με την απελευθέρωση τους στην αιματική κυκλοφορία και σε συνδυασμό με τη δράση των ουδετερόφιλων ευθύνονται για την πρόκληση βλάβης στο πνευμονικό παρέγχυμα.

1.3 Κλινική εικόνα

Τα κλινικά στάδια της ηπατικής βλάβης χωρίζονται σε 4 κατηγορίες ανάλογα με το χρόνο από την αρχική βλάβη. Στάδιο I: Στις πρώτες 24 ώρες παρουσιάζονται μη ειδικά συμπτώματα όπως ναυτία, έμετος, κακουχία, εφίδρωση και λήθαργος ενώ είναι πιθανή και η άνοδος των επιπέδων της ασπαρτικής και αλκαλικής τρανσαμινάσης (AST και ALT αντίστοιχα) κατά τις πρώτες 8-12 ώρες. Στάδιο II: Μεταξύ των 24 και 72 ωρών μετά τη βλάβη οπότε τα προηγούμενα συμπτώματα βελτιώνονται ή υποχωρούν τελείως. Παράλληλα τα επίπεδα των τρανσαμινασών στο αίμα αυξάνονται ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις παρακεταμόλης παρατηρούνται ίκτερος, ηπατομεγαλία με ευαισθησία στην ψηλάφηση, διαταραχές της

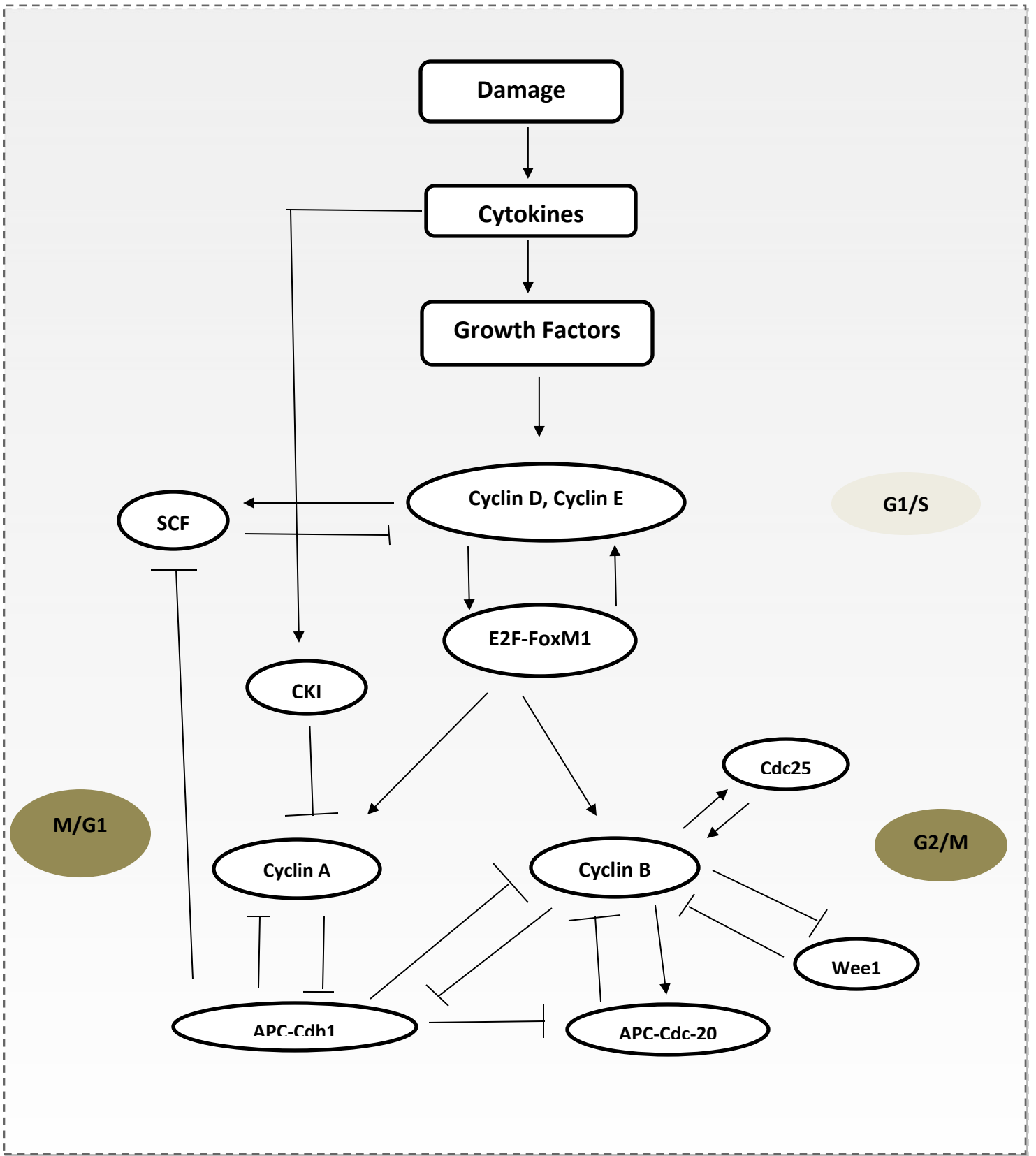
πηκτικότητας και οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (ARDS) ^[3,101]. Στο στάδιο III: Μεταξύ 72 και 96 ωρών τα συμπτώματα υφίνονται ή επί υψηλών επιπέδων της APAP επιδεινώνονται με συνέπεια την επίταση του ίκτερου, της εγκεφαλοπάθειας και της απορρύθμισης του πηκτικού μηχανισμού καθώς και των τρανσαμινασών. Ως συνέπεια αυξάνονται τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος που συμβάλλουν στην περαιτέρω επιδείνωση της κλινικής εικόνας και την εμφάνιση πολυοργανικής ανεπάρκειας με αύξηση της θνησιμότητας. Τέλος το στάδιο IV: που ξεκινά από τις 96 και περιλαμβάνει χρονικό διάστημα αρκετών εβδομάδων. Περιλαμβάνει ασθενείς που ανανήπτουν από το προηγούμενο στάδιο με σαφή κλινική βελτίωση αν και η ιστολογική εικόνα αποκαθίσταται σε διάστημα αρκετών μηνών χωρίς να παραμένει υπολειμματική νόσος με τη μορφή της χρόνιας ηπατίτιδας^[101].

2. Μηχανισμοί Ηπατικής Αναγέννησης

Η ηπατική βλάβη ενεργοποιεί ένα σύνθετο μηχανισμό όπου ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην αναπλήρωση της ηπατικής μάζας. Δύο κύκλοι κυτταρικής μιτώσεως απαιτούνται για να επιτευχθεί η ιστολογική ακεραιότητα σύμφωνα με πρόσφατα πειραματικά μοντέλα σε θηλαστικά^[26]. Κάθε κυτταρική διαίρεση εξελίσσεται στο διάστημα ενός κερκάδιου κύκλου, περίπου 24 ωρών, επομένως η μιτωτική δραστηριότητα έχει ολοκληρωθεί σε διάστημα 48 ωρών. Ενώ η κυτταρική αναπλήρωση επιτελείται κατευθυνόμενη από την περιφέρεια του ηπατικού λοβίου, περιτυλαία περιοχή, προς το κέντρο αυτού, περικεντρική ζώνη^[26,27]. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονίζουμε ότι η προαναφερόμενη ζώνη έχει πληγεί περισσότερο κατά τη διάρκεια της τοξικής δράσης της παρακεταμόλης^[10]. Ακόμα δύο κρίσιμα στάδια ολοκληρώνουν την ηπατική αναγέννηση: α) η πρώιμη φάση κατά την

οποία συγκεκριμένα ερεθίσματα, σηματοδοτικά κυτταρικά μονοπάτια και μεταγραφικοί παράγοντες εμπλέκονται στην πρόοδο της ηπατικής αναγέννησης και β) η φάση του τερματισμού οπότε και η μιτωτική διαδικασία παύει και η διαφοροποίηση του νέου κυτταρικού πληθυσμού σε πλήρως λειτουργικά ηπατοκύτταρα αποκαθιστά τη λειτουργική επάρκεια του ήπατος^[26,28].

Η αναγέννηση διαρκεί μεταξύ 120 και 160 ωρών και δε διαφέρει στους βασικούς μηχανισμούς ενεργοποίησης της σε σχέση με την ηλικία των πειραματόζων^[29,109]. Η πρόκληση της τοξικής βλάβης ενεργοποιεί μια σειρά αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών όπως θα αναλύσουμε σε επόμενη παράγραφο. Οι παράγοντες αυτοί ενεργοποιούν της κυκλίνες D και E του σταδίου G1/S του κυτταρικού κύκλου με συνέπεια την έναρξη της αντιγραφής του πυρηνικού DNA. Παράλληλα οι ανωτέρω κυκλίνες οδηγούν σε φωσφορυλίωση την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστωματος και ενεργοποιούν το μεταγραφικό παράγοντα E2F που είναι υπεύθυνος για την επαγωγή των κυκλινών A και B. Η πρώτη παράγεται κατά τη διάρκεια της φάσης S και η δεύτερη λίγο πριν το τέλος της φάσης G2. Η άνοδος των επιπέδων της κυκλίνης B συμβάλλει στο πέρασμα από το στάδιο G2 στο M με σκοπό την ολοκλήρωση της κυτταρικής διαίρεσης. Στη συνέχεια τα αυξημένα επίπεδα της κυκλίνης B οδηγούν στην ενεργοποίηση ενός ανασταλτικού παλίνδρομου μηχανισμού με τη συμμετοχή των πρωτεϊνών Cdc25 και Wee1 που οδηγούν στον καταβολισμό της κυκλίνης B και στο πέρασμα από τη φάση M στην G1. Ταυτόχρονα, η αποδόμηση της κυκλίνης B συμβάλλει στην αποφωσφορυλίωση της Cdh1 και στην επακόλουθη αδρανοποίηση και καταβολισμό της κυκλίνης A μέσω του πρωτεοσωματίου της APC^[26]. Στα βασικά στάδια της κυτταρικής διαίρεσης εμπλέκονται και άλλοι ανασταλτικοί μηχανισμοί όπως CKI για την ανάσχεση της δράσης των κυκλινών A, E και D. Επίσης, ο SCF (Skp, Cullin, F-box containing complex) βοηθά στην αποσύνθεση των κυκλινών D και E. Η εικόνα 2 παρακάτω περιγράφει σχηματικά την κυτταρική διαίρεση.



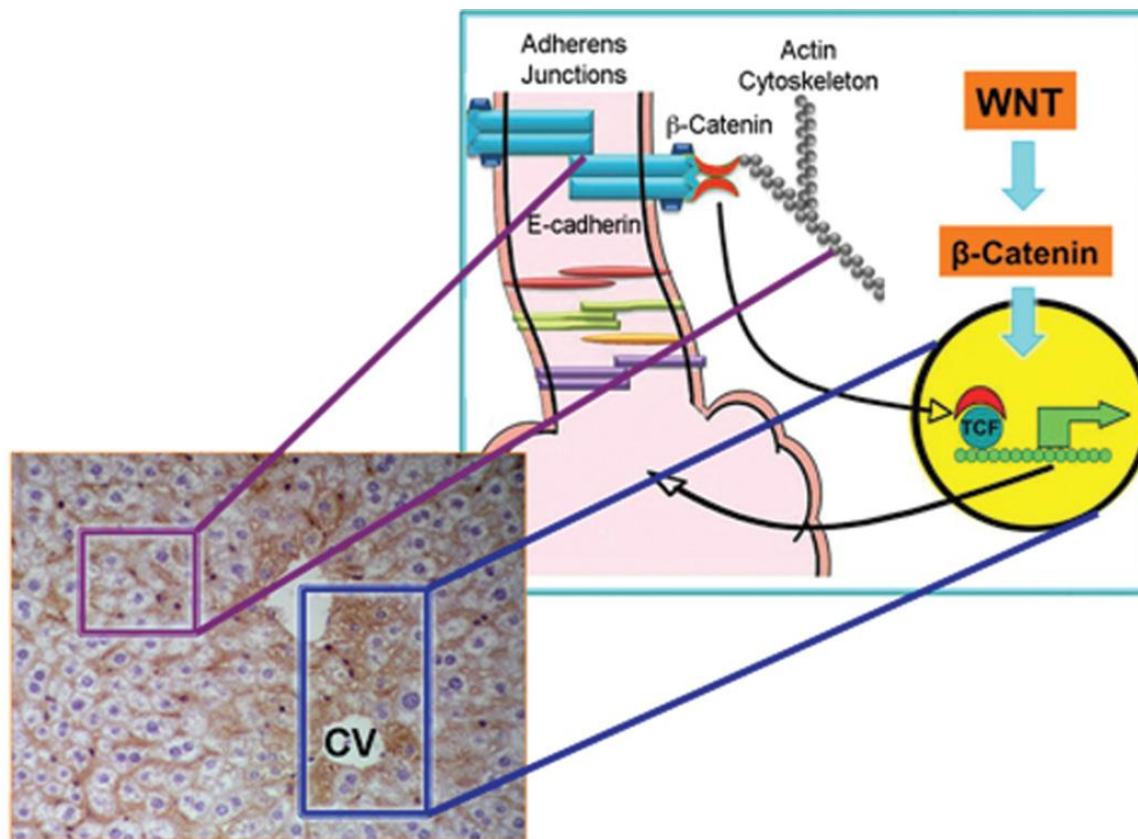
Εικόνα. 2. Πρότυπο του κυτταρικού κύκλου κατά τη διάρκεια της ηπατικής αναγέννησης μετά την πρόκληση χημικής βλάβης. Η προκληθείσα βλάβη από τον τετραχλωράνθρακα (CCl₄) αφορά πρωταρχικά κύτταρα χωρίς μιτωτική δραστηριότητα μέσω των κυτοκινών. Αυτά τα κύτταρα με τη σειρά τους ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια επαγόμενα από αυξητικούς παράγοντες. Οι κυτοκίνες σε συνέργεια με τους αυξητικούς παράγοντες παρέχουν μιτογόνα ερεθίσματα για την ενεργοποίηση της κυκλίνης D πρώιμα στη φάση G1. Η κυκλίνη D εκκινεί μια αλυσίδα επακόλουθων φωσφορυλιώσεων στο σύμπλεγμα Rb/E2F που οδηγεί στην επακόλουθη μεταγραφή της κυκλίνης E της κυτταρικής φάσης G1-S, της κυκλίνης A που ανήκει στη φάση S και στην κυκλίνη B που ανήκει στη φάση M του κυτταρικού κύκλου. Νωρίς στη φάση G1 στοιχειομετρικοί αναστολείς των κυκλινών, CKI, επίσης ενεργοποιούνται από τις κυτοκίνες. Ο πρωτεολυτικός αποσυνθετικός μηχανισμός, SCF, ενεργοποιείται στη φάση G1-S από την κυκλίνη E. Η είσοδος στη μίτωση εκκινεί από την απότομη ενεργοποίηση της κυκλίνης B από την Cdc25 και Wee1 με θετική ανατροφοδότηση κατά τη μετάβαση από τη φάση G2 στην M. Η Cdc25 και η Wee1 ρυθμίζουν ακόμα και τη γρήγορη έξοδο από τη μίτωση με την ταχεία απενεργοποίηση της κυκλίνης B στη μετάβαση M-G1 σε συνδυασμό με τη θετική ανατροφοδότηση από τον πρωτεολυτικό αποδομητικό σύμπλεγμα APC-Cdh1. Ο μιτωτικός αποδομητής APC-Cdc20 ασκεί αρνητική ανατροφοδότηση. Όλα τα συμπλέγματα των κυκλινών απεικονίζονται με το αντίστοιχο συνεργικό μόριο με σκοπό την απλούστευση της εικόνας. Τέλος ο E2F στο σχήμα αντιπροσωπεύει και τις τρεις μορφές του E2F, μη φωσφορυλιωμένη, υποφωσφορυλιωμένη και υπερφωσφορυλιωμένη.

Η ηπατική αναγέννηση ενορχηστρώνεται από παράγοντες που ανάλογα με τη χρονική φάση στην οποία συμμετέχουν χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: α) παράγοντες της πρώιμης φάσης, β) παράγοντες της ενδιάμεσης φάσης και γ) παράγοντες τερματισμού.

Στους πρώιμους παράγοντες που ενεργοποιούνται στις πρώτες 2 ώρες από την πρόκληση της ηπατικής βλάβης περιλαμβάνονται οι κυτταροπλασματικοί παράγοντες b-catenin, c-fos και c-jun οι οποίοι μεταπίπτουν στην ενεργή μορφή τους, σε απόκριση προς τη βλάβη, και μετατοπίζονται προς τον πυρήνα των ηπατοκυττάρων και αυξάνουν την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-Kb, stat-3 και c-myc^[27,30,31] (Πίνακας 1). Η b-catenin εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη των ηπατοκυττάρων με την E-cadherin ενώ χωροταξικά εντοπίζεται στα κύτταρα της περιπυλαίας και μέσης ζώνης του ηπατικού λοβίου^[111] (εικόνα 3). Κατά την πρόκληση της ηπατικής βλάβης επιτελείται η ενεργοποίηση της b-catenin από μεγάλο αριθμό σηματοδοτικών μορίων όπως ο HGF (hepatic growth factor) και FGF (fibroblast growth factor) όμως τα μόρια της οικογένειας Wnt

(Wingless family) είναι κατεξοχήν υπεύθυνα για την ενεργοποίηση της και την απελευθέρωση της από το σύμπλεγμα με την E-cadherin. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί πως τα επίπεδα των μορίων Wnt παρουσιάζουν τα υψηλότερα επίπεδα στις κεντρολοβιακές περιοχές του λοβίου όπου παρατηρείται και η πλέον σοβαρή βλάβη από την τοξικότητα της παρακεταμόλης. Επιπλέον κύρια πηγή αυτών των υψηλών συγκεντρώσεων των ανωτέρω μορίων είναι τα μακροφάγα κύτταρα του Kupffer^[110]. Η ενεργοποιημένη b-catenin μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στο πυρήνα των ηπατοκυττάρων όπου μέσω των υποδοχέων TCF συνδέεται με σειρά μεταγραφικών παραγόντων (TFs) που επάγουν την μεταγραφή των NF-Kb και c-myc καθώς και τα ένζυμα του συμπλέγματος του κυτοχρώματος P450 (CYP450) ενώ καθοριστική είναι η σύνδεση της μέσω του υποδοχέα TCF4 στον προαγωγό για την μεταγραφή της κυκλίνης D με σκοπό την μετάπτωση του κυττάρου από την φάση G1 στην S. Ταυτόχρονα είναι υπεύθυνη για την μεταγραφή και των κυκλινών A και E^[27,30]. Συμβάλει με τον τρόπο αυτό στην έναρξη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των ηπατοκυττάρων στην κεντρολοβιακή περιοχή ενώ ταυτόχρονα προστρέχουν στο σημείο και τα ωοειδή κύτταρα (oval cells) που μέσω της ενεργοποίησης του άξονα b-catenin/Wnt signaling πολλαπλασιάζονται με στόχο την κυτταρική αναπλήρωση της περιοχής της βλάβης^[31]. Τα επίπεδα της b-catenin επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα σε 48 ώρες μέσω της επαγωγής της Axin2 που είναι υπεύθυνη για την αποδόμηση της^[27,30,110,111] ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας PPAR-δ καταστέλλει την ηπατική αναγέννηση^[115].

Στους πρώιμους παράγοντες της αναγέννησης θα πρέπει να περιληφθούν και μια σειρά άλλων μορίων. Καταρχήν οι c-fos και c-jun που όντας τμήματα της πυρηνικής πρωτεΐνης AP-1 ενεργοποιούνται υπό την επίδραση κυτοκινών όπως η IL-6 καθώς και αυξητικών παραγόντων^[113,114]. Αυτοί με τη σειρά τους προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω την αδρανοποίησης του κατασταλτικού συμπλέγματος P53/P21 το οποίο εμπλέκεται στην αναστολή των κυκλινών A,D και E^[112]. Επίσης είναι υπεύθυνοι για πλειάδα (TFs) κατά τη διάρκεια της αναγέννησης^[114].



Εικόνα 3. β-Catenin ανοσοϊστοχημεία σε φυσιολογικό ήπαρ ενήλικου ποντικού. Η χρώση για τη β-catenin εντοπίζεται πλησίον της κυτταρικής μεμβράνης των ηπατοκυττάρων τόσο της μέσης ζώνης (μωβ περίγραμμα) όσο και στην περιπυλαία ζώνη του ηπατικού λοβίου, όπου αλληλοεπιδρά με την E-cadherin και σχηματίζει σημεία σύνδεσης. Στην κεντρολοβιακή περιοχή (cv), η β-catenin, εκτός της θέσης της πλησίον της μεμβράνης ανευρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα (μπλε περίγραμμα) με τον επόμενο παράγοντα του σηματοδοτικού μονοπατιού της Wnt την έκφραση του γονιδιακού στόχου της κεντρολοβιακής περιοχής.

Επιπρόσθετα, πρώιμος παράγοντας είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες -2, -3, -9, και -14 οι οποίες αυξάνονται στο έδαφος της ηπατικής βλάβης όπως αναφέραμε πιο νωρίτερα. Κεντρικό ρόλο σε αυτό το σύμπλεγμα εξωκυττάρων πρωτεϊνών έχει η μεταλλοπρωτεϊνάση-9 όπου μετά την ενεργοποίηση της από κυτοκίνες όπως ο TNF-α και η IL-6 συμβάλλει στην μετατροπή του HGF στην ενεργή του μορφή ενώ με την αποδόμηση του νεκρωτικού περιβάλλοντος της ALI αποκαλύπτει τις θέσεις του υποδοχέα της HGF, c-met^[23,32,116].

Στην πρώιμη φάση καθοριστική είναι η δράση των αυξητικών παραγόντων HGF (hepatic growth factor), μέλη της οικογένειας FGF (fibroblast growth factor), της οικογένειας EGF (TGF- α , EGF) καθώς και ο IGF (insulin growth factor) (Πίνακας 1). Ο HGF παράγεται σε αυξημένες ποσότητες στην ηπατική βλάβη υπό την επαγωγική δράση προ-φλεγμονωδών παραγόντων, TNF- α και IL-6, από τα μακροφάγα της περιοχής και μεταπίπτει στην ενεργή μορφή του HGFA με την επίδραση του συμπληρώματος, των μεταλλοπρωτεασών και της πρωτεάσης C^[30,32,34,117]. Κατόπιν ασκεί τη δράση του μέσω του διαμεμβρανικού υποδοχέα c-met που κατά συνέχεια ενεργοποιεί τυροσινικές κινάσες της οικογένειας MAPK (mitogen-activated protein kinases) και συγκεκριμένα το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK/ERK με αποτέλεσμα την ενεργή μορφή του συμπλέγματος ERK1/2 που με τη σειρά του συμβάλει στην έκφραση των κυκλινών A και D με στόχο τη μετάβαση από τη κυτταρική φάση G1 στην S^[19,30,33,117]. Επιπλέον ο HGF επηρεάζει και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το jak/stat3, που συμμετέχει στην προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ ενεργοποιεί και το μονοπάτι Akt/PI3, υπεύθυνο για την κυτταρική ομοιοστασία αλλά και την ενεργειακή προετοιμασία του κυττάρου για τη μίτωση^[19,30,33]. Κατά τον ίδιο τρόπο οι παράγοντες EGF και TGF- α παράγονται σε αυξημένες ποσότητες από τα κύτταρα ηπατικό ενδοθήλιο και τα μακροφάγα στην περιοχή της ALI. Η δράση τους αφορά τα σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζει και ο HGF κυρίως μέσω της οικογένειας υποδοχέων EGFR και σε μικρότερο βαθμό μέσω του υποδοχέα c-met^[30,35,118]. Οφείλουμε να σημειώσουμε ότι σε πειράματα έχει παρατηρηθεί πως η δράση και των δύο αυξητικών παραγόντων, HGF και EGF, είναι συνεργική στην προώθηση της ηπατικής αναγέννησης^[30,118]. Παράλληλα ο EGF φαίνεται να επηρεάζει περισσότερο την ενεργειακή επάρκεια του ηπατοκυττάρου για την επερχόμενη μίτωση καθώς συμβάλει στην οργάνωση κυστιδίων με λιπαρά οξέα και γλυκογόνο^[118]. Επίσης οι παράγοντες FGF με σημαντικότερα μέλη τους τα α -FGF και β -FGF επιδρούν με τα ηπατοκύτταρα μέσω των υποδοχέων FGFR1, FGFR2 και τον FGFR4 ενώ και άλλα μόρια της οικογένειας FGF αλληλοεπιδρούν με τους προαναφερόμενους υποδοχείς^[30,120]. Η κύρια δράση τους εκδηλώνεται

μέσω του jak/stat3 pathway αν και διαδραματίζουν ρόλο και στον κυτταρικό μεταβολισμό^[119,120]. Επίσης, το μόριο της αυξητικής ορμόνης GH (growth hormone) με κύριο εκπρόσωπό της την IGH (insulin-like growth factor) συμμετέχει με δύο τρόπους: α) συμβάλει στην ενεργειακή προετοιμασία της μίτωσης, όπως ο EFG και TGF- α , και β) επάγει την έκφραση του TF FoxM1B που είναι απαραίτητος για την μετάβαση G1/S καθώς και αργότερα στη μετάβαση G2/M^[35].

Τέλος δύο κατηγορίες μορίων που δρούν στην πρώιμη φάση που εξετάζονται παρακάτω: α) τα miRNA και β) οι προσταγλανδίνες με κύριο εκπρόσωπο την PGE2. Σύμφωνα με τις τελευταίες μελέτες τα miRNA διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην ηπατική αναγέννηση. Παρατηρούμε ότι υπάρχουν παράγοντες όπως οι miR-17, miR-29, miR-30 και miR-424 που ασκούν αρνητική επίδραση στην αναγέννηση μέσα από την αναστολή επιδιορθωτικών ενζύμων του DNA με συνέπεια στην καθυστέρηση ή την ολοκληρωτική παύση της μετάβασης G1/S^[37]. Επιπλέον το miR-26a επηρεάζει καθοριστικά την αναγέννηση μέσα από την ανασταλτική δράση στο κρίσιμο παράγοντα της κυκλίνης-2 (CCND2) με αποτέλεσμα την παύση του πολλαπλασιασμού^[122]. Υπάρχουν όμως και μόρια που προωθούν την αναγέννηση όπως το miR-21 που καταστέλλει το αναστολέα Btg2 υπεύθυνο για παύση του κρίσιμου μεταγραφικού παράγοντα FoxM1B όπως επίσης και το miR-221 που ρυθμίζει την επαγωγή των αναστολέων των κυκλινών CDKN1B και CDKN1C^[38,121]. Θα πρέπει να παρατηρήσουμε ότι το miR-21 βρίσκεται υπό το ρυθμιστικό έλεγχο του συμπλέγματος AP-1^[38]. Τέλος η προσταγλανδίνη PGE2 αποτελεί το τελικό προϊόν στη διαδικασία της κυτταρικής απώλειας που υπόκειται η περιοχή της ηπατικής βλάβης. Κατά τη διαδικασία της απόπτωσης οι ενεργοποιημένες κασπάσες 3 και 7 ενεργοποιούν την φωσφολιπάση A2 (IPLA2) και αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα του αραχιδονικού οξέος που αποτελεί πρόδρομο της PGE2. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές η PGE2 δρα ενισχύοντας τη μετακίνηση βλαστικών κυττάρων στην περιοχή της βλάβης και την επαγωγή του πολλαπλασιασμού τους για την αναπλήρωση των κυτταρικών απωλειών^[39].

Η δεύτερη φάση του πολλαπλασιασμού (12-72 ώρες) εξελίσσεται σε διάστημα που αντιστοιχεί σε δύο κερκάδιους κύκλους^[28] (Πίνακας 2). Σε αυτή τη φάση τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται και η μεταγραφή κρίσιμων γονιδίων του πρώτου σταδίου παύουν και αντικαθίστανται από την ενεργοποίηση γονιδίων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Κυτοκίνες όπως ο TNF-α και η IL-6 αποτελούν εξέχοντες μεσολαβητές της μίτωσης καθώς μετά την πρόκληση της κυτταρικής βλάβης επάγουν μεταγραφικούς παράγοντες της προηγούμενης φάσης όπως οι NF-Kb και Stat3 που με τη σειρά τους ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες του συμπλέγματος c-fos, c-jun και c-myc^[27,113,114]. Επιπρόσθετα όμως ο TNF-α είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση του παράγοντα SCF (Stem Cell Factor) του οποίου τα επίπεδα αυξάνονται στις πρώτες 16 ώρες από την πρόκληση της ALI και αγγίζουν την υψηλότερη συγκέντρωση 48 ώρες από την έναρξη της^[30,40]. Ο ρόλος του SCF είναι πολλαπλός αφού κατά την πρώιμη φάση συμβάλλει τόσο στην έκφραση αντιαποπτωτικών γονιδίων όπως τα Bcl-2 και Bcl-xl αλλά και στην αύξηση των επιπέδων της IL-6^[40,41]. Η κυριότερη δράση του όμως οφείλεται στον καταλυτικό ρόλο που διαδραματίζει στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθώς συμβάλλει στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου από την φάση S στην M. Η δράση του εκδηλώνεται μετά τη σύνδεση του διαλυτού SCF στον υποδοχέα c-kit η οποία ενεργοποιεί πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών με το πλέον σημαντικό το Ras-Raf-Mek της κατηγορίας των τυροσινικών κινασών MAPKs^[40,41]. Ταυτόχρονα όμως ασκεί τη δράση του και μέσω δύο ακόμα μονοπατιών της PI3/AKT τη μεταβολική προετοιμασία της κυτταρικής διαίρεσης καθώς και έμμεσα στο μονοπάτι STAT3 για την επαγωγή της μίτωσης. Τέλος θα πρέπει να τονιστεί πως χωροταξικά, στο επίπεδο του ηπατικού λοβίου, τα επίπεδα του SCF αυξάνονται περιφερικά αυτού πλησίον των πυλαίων τριάδων^[41].

Επιπρόσθετα η IL-6 παρουσιάζει ένα διττό ρόλο στο πρώιμο στάδιο της αναγέννησης σε σχέση με δράση της αργότερα. Παρατηρούμε λοιπόν πως είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του 40% των πρώιμων γονιδίων

απόκρισης (early response genes) όπως τα c-fos και c-jun μέσω του μονοπατιού της STAT3 στο πρώτο στάδιο της ηπατικής αναγέννησης^[44]. Έπειτα στη φάση της κυτταρικής διαίρεσης επηρεάζει την αύξηση του ηπατοτροφικού παράγοντα ALR (Augmenter of Liver Regeneration) μέσω του μεταγραφικού μορίου FOXA2^[42]. Ο ALR ασκεί πολλαπλούς ρόλους που αφορούν την αναστολή της απόπτωσης των ηπατικών κυττάρων καθώς και την ανοσοτροποποιητική δράση του έναντι του ανοσολογικού μηχανισμού έπειτα από τη πρόκληση της ALI^[43,44,124]. Οφείλουμε να σημειώσουμε όμως πως η σημαντικότερη συμβολή του έγκειται στο ότι αποτελεί ειδικό ηπατοβλαστικό παράγοντα που μέσω της δράσης του στα σηματοδοτικά μονοπάτια της ERK1/2, PI3/AKT και P38 προωθεί την κυτταρική διαίρεση^[42-44]. Επίσης ο ALR συμμετέχει και στο τελευταίο κομμάτι της LG (Liver Regeneration) μέσω του μονοπατιού της STAT3 με σκοπό την ωρίμανση των ηπατοκυττάρων^[123]. Τέλος, παρατηρούμε πως η IL-6 χάρις την ανωτέρω δράση της προωθεί την αναγέννηση όμως σε επόμενο κεφάλαιο θα δούμε πως η δράση της αναστρέφεται στο τελευταίο στάδιο της LG^[44].

Στη συνέχεια έχουμε μια σειρά ανοσολογικών ακόμα μορίων που εμπλέκονται στη δεύτερη φάση της αναγέννησης καθώς και δύο σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Ξεκινώντας από τη δράση της ιντερφερόνης-γ (INF-γ) της οποίας αυξάνεται διφασικά την 1 και την 3 ημέρα μετά της πρόκληση της βλάβης. Τα επίπεδα της INF-γ αυξάνονται πλησίον των πυλαίων τριάδων και όχι κεντρολοβιακά ενώ αποτελούν προϊόν των μονοκυττάρων της περιπυλαίας περιοχής^[45]. Η δράση της έγκειται στην επιβίωση των ηπατοκυττάρων και όχι άμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ασκεί τη δράση της μέσω του μονοπατιού της JAK/STAT με στόχο τον μεταγραφικό παράγοντα STAT1 που παρουσιάζει μεταξύ άλλων συνεργική δράση με τους TFs NF-Kb και AP1 αλλά και κατασταλτική δράση σε παράγοντες όπως οι c-myc, κυκλίνη D και A^[45]. Από την άλλη πλευρά η ιντερφερόνη-α (INF-α) αυξάνεται με πιο αργό ρυθμό από την INF-γ και συμβάλλει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς ενεργοποιεί και αυτή το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK/STAT αλλά με στόχους τους παράγοντες STAT2 και STAT3 που σχετίζονται με την ηπατική

αναγέννηση^[45]. Επίσης σημαντική συμβολή στην LG έχει το συμπλήρωμα και κυρίως τα μόρια C5a και C3a. Συγκεκριμένα ο C5a επάγει την παραγωγή γλυκόζης από τα κύτταρα του Kupffer καθώς και από τα αστεροειδή κύτταρα^[46]. Μάλιστα παρατηρήθηκε πως υποδοχείς του C5a εκφράζονται και στην επιφάνεια των αναγεννώμενων ηπατοκυττάρων παρέχοντας την απαραίτητη ενεργειακή επάρκεια για την πρόοδο της μίτωσης. Επίσης ο C5a επάγει και την έκφραση του ηπατικού αυξητικού παράγοντα HGF και κατ' επέκταση την πρόοδο της μίτωσης^[46,125]. Επιπλέον το μόριο C3 εμφανίζει διφασική αύξηση μετά την πρόκληση της ALI και παρουσιάζει σημαντικό ρόλο στην LG τόσο μέσω της δράσης της στο μονοπάτι της STAT3 όσο και σε εκείνο της PI3/AKT το οποίο σχετίζεται με το μονοπάτι της ραπαμυκίνης (MTOR) και κατά συνέπεια με την μίτωση^[125]. Ακόμα μια σημαντική κατηγορία αποτελούν οι χημειοκίνες (CXCR) με τους υποδοχείς τους CXCR1 και CXCR2^[47]. Παρατηρείται το φαινόμενο σε μέτρια έκφραση των ανωτέρω υποδοχέων και των συνδετών τους (ligands) να επάγουν την LG αλλά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αναστέλλουν όχι μόνο την αναγέννηση αλλά επαυξάνουν την κυτταρική βλάβη^[47]. Τέλος ειδικοί ηπατικοί μεταγραφικοί παράγοντες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στο δεύτερο όσο και στο τελευταίο στάδιο της LG. Ο HNF6 (Hepatic Nuclear Factor 6) μαζί με τους HNF4-alpha, HNF1-alpha και HNF1-beta αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές της μεταγραφικής δραστηριότητας των ηπατοκυττάρων και ενεργοποιείται σε έδαφος ηπατικής βλάβης ή επίδρασης αυξητικών παραγόντων^[126]. Πράγματι ο HNF6 επιδρά στον TF FOXA2 και επιτυγχάνει τη μεταβολική ομοιοστασία των κυττάρων. Επιπρόσθετα συμβάλει στην τροποποίηση του κυτταρικού κύκλου καθώς επάγει την πρόοδο από τη φάση G1 στην S με την αυξημένη έκφραση των TGF- α , της κυκλίνης D1, Cdk2 και E2F1. Στη συνέχεια προωθεί τη μετάβαση από τη φάση G2 στην M με την αύξηση των επιπέδων του Foxm1b ενώ επιτυγχάνει τη μετάβαση από τη μίτωση στην κυτταρική παύση G0 μέσω της ανασταλτικής του C/EBP α επί της cdk2. Κλείνοντας πρέπει να τονίσουμε πως η υπερέκφραση του HNF6 αυξάνει και τη συγκέντρωση των TFs FOXA2 και HNF4-a που έχουν σημαντικό ρόλο στην ηπατική διαφοροποίηση όπως περιγράφεται παρακάτω^[127].

Στην τρίτη και τελευταία φάση (72-160 ώρες) περιλαμβάνεται ο τερματισμός της μίτωσης και η μετάβαση των κυττάρων στο κυτταρικό στάδιο G0 καθώς και στην επιτάχυνση της ηπατικής διαφοροποίησης (Πίνακας 1). Η αναπλήρωση της ηπατικής μάζας έχει επιτευχθεί στην κεντρολοβιακή περιοχή εκάστου ηπατικού λοβίου στο τέλος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Σειρά αλλαγών σε μοριακό επίπεδο παρατηρείται σε αυτό το τελευταίο στάδιο με χαρακτηριστική τη μετατόπιση των γονιδίων πρώιμης απάντησης όπως της b-catenin από τον πυρήνα του κυττάρου στο κυτταρόπλασμα. Παράλληλα ο TGF-b (tumor growth factor b) διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο τερματισμό της αναγέννησης. Τα επίπεδα του TGF-b αυξάνονται ήδη από τις πρώτες 6 ώρες από την πρόκληση της βλάβης όμως η δράση του δε γίνεται αισθητή μεταξύ της 5^{ης} και της 7^{ης} ημέρας μετά την ALI^[49,127]. Κύριοι λόγοι για τη καθυστερημένη δράση του είναι αφενός η ανασταλτική επίδραση των πρωτεϊνών SnO_N και Ski καθώς και στο περιορισμό της έκφρασης των υποδοχέων του TGF-B ,TBR_{II}, κατά τα προηγούμενα στάδια της LG. Μετά την ενεργοποίηση του όμως κατά το τρίτο στάδιο ασκεί τη δράση του μέσω της φωσφορυλιώσεως των συμπλεγμάτων Smad2 ή Smad3 τα οποία συνδέονται με το σύμπλεγμα Smad4 και με τη σειρά τους μετατοπίζονται στο πυρήνα των κυττάρων^[30]. Αποτέλεσμα του νέου συμπλέγματος, Smad2/Smad4 ή Smad3/Smad4, είναι η πρόσδεση σε συγκεκριμένες θέσεις του DNA με τη βοήθεια και άλλων συνεργικών παραγόντων και η τροποποίηση της μεταγραφική λειτουργίας του κυττάρου με συνέπεια την παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού^[30,49]. Συγκεκριμένα ο TGF-b επάγει την έκφραση κατασταλτικών γονιδίων όπως των p15, p21, p57 και 4EBP1 και αναστέλλει μεταγραφικούς παράγοντες της αναγέννησης όπως Cdc25A, c-myc, E2F-1 και Id1-3. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονίσουμε πως η έκφραση του TGF-b χωροταξικά στο επίπεδο του ηπατικού λοβίου είναι υψηλότερη στην περιπυλαία και μέση ζώνη ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα παρατηρούνται στην κεντρολοβιακή περιοχή^[49]. Επιπρόσθετα οι οικογένεια πρωτεϊνών ακτιβίνες με κύριο εκπρόσωπο την activin A εμφανίζει συνεργική δράση με το TGF-b στην παύση της μιτωτικής δραστηριότητας^[128].

Δύο ακόμα σημαντικοί παράγοντες στο τερματισμό της αναγέννησης είναι η GSK-3β (glycogen synthase kinase β) καθώς και η IL-6. Τα επίπεδα της GSK-3β αυξάνονται πρώιμα κατά την πρόκληση της ALI μέσω της επίδρασης αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών όπως η IL-6 και ο HGF^[53]. Συνέπεια αυτής της ενεργοποίησης είναι η αποδόμηση ενός σημαντικού ανασταλτικού TF της αναγέννησης του Snail. Τα επίπεδα του τελευταίου μειώνονται δραματικά κατά τα πρώιμα στάδια της LG αλλά αρχίζουν να αυξάνονται κατά την τελευταία φάση ως αποτέλεσμα της δράσης μορίων όπως ο TGF-β και οι activins^[53]. Η κύρια δράση του Snail βασίζεται μεταξύ άλλων στην επαγωγή του κατασταλτικού παράγοντα της κυτταρικής διαίρεσης p21. Από την άλλη πλευρά η IL-6 ενώ κατά την έναρξη της LG προωθεί την κυτταρική διαίρεση μέσω του μονοπατιού της JAK/STAT3 επιτελεί ταυτόχρονα και κατασταλτικό ρόλο^[44]. Όπως προκύπτει από πρόσφατες μελέτες η IL-6 ενεργοποιεί μεταξύ 2 έως 6 ωρών από την πρόκληση της ηπατικής βλάβης τον παράγοντα SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3)^[44,129]. Ο τελευταίος με τη σειρά του μετριάζει τη σηματοδοτική ακολουθία για την προώθηση της μιτωτικής διαδικασίας. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω δύο τρόπων, αφενός αλληλεπιδρά με τον ενεργοποιημένο μεμβρανικό υποδοχέα gp130 και καταστέλλει την καταλυτική δράση του παράγοντα JAK του μονοπατιού IL-6-gp130-JAK-STAT3 και αφετέρου μεταβάλλει την ενεργοποίηση του συμπλέγματος ERK1/2 που είναι καθοριστικής σημασίας για την προώθηση του κυτταρικού κύκλου^[44].

Επιπρόσθετα στη διαδικασία της κυτταρικής παύσης εμπλέκονται δύο ακόμα παράγοντες. Ο πρώτος είναι ο miR-34a που τα επίπεδα του αυξάνονται μεταξύ της 3^{ης} και της 5^{ης} μέρας από την πρόκληση της ALI^[52]. Η επαγωγή του συντελείται από τους παράγοντες όπως ο TGF-β, η activin A καθώς και το μονοπάτι ILK (integrin-linked kinase)^[52]. Η δράση του miR-34a μειώνει σημαντικά τα επίπεδα του υποδοχέα Met, που σχετίζεται με την προαγωγή της μίτωσης μέσω των αυξητικών παραγόντων HGF και EGF αλλά και τα επίπεδα του γονιδίου INHBB (inhibin Bb) που αναστέλλουν τη δράση της activin A^[52]. Όμως ο ρόλος του miR-34a δεν περιορίζεται στην

ανωτέρω δράση του αλλά επεκτείνεται και στην αναστολή μορίων όπως οι κυκλίνες D1 και E1, οι CDK4 και CDK6 καθώς και ο p-tyc που σχετίζονται με τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στην S^[130]. Ο δεύτερος παράγοντας είναι ο SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) σχετίζεται με την μείωση της ενεργοποίησης του υποδοχέα c-MET μέσω του ρυθμιστικού μορίου Gab1 που ανήκει στο μονοπάτι του αυξητικού παράγοντα HGF^[53]. Είναι όμως πιθανό να επηρεάζει και τη φωσφορυλίωση και των ERK1/2 καθώς και STAT3 ενώ φαίνεται πως επιτυγχάνει την αναστολή του c-MET με μηχανισμό που αφενός μειώνει την έκφρασή του και αφετέρου προάγει την αποδόμηση του με τη χρήση της K48-εξαρτώμενης ουμπικοϊτίνης (K48-dependent ubiquitin)^[53,131].

Με την επαναφορά του νέου κυτταρικού πληθυσμού στη φάση G0 αρχίζει το πλέον σημαντικό κομμάτι της τελευταίας φάσης της αναγέννησης που αφορά τη διαφοροποίηση. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας ο νέος κυτταρικός πληθυσμός μεταμορφώνεται μορφολογικά και λειτουργικά σε ώριμα ηπατοκύτταρα. Η προέλευση των διαιρούμενου κυτταρικού πληθυσμού είναι ετερογενής και περιλαμβάνει πολυδύναμα κύτταρα που εντοπίζονται στην περιφέρεια των χολαγγείων, ενδολοβιακά, στην περιοχή των καναλιών του Hering, ώριμα ηπατοκύτταρα που έχουν υποστεί αποδιαφοροποίηση καθώς και πολυδύναμα κύτταρα που προέρχονται από τον μυελό των οστών ή το λιπώδη ιστό (BM-MSCs και ADSCs)^[49,54,55]. Η διαφοροποίηση είναι μία καλά οργανωμένη διαδικασία κατά την οποία μία σειρά σηματοδοτικών μονοπατιών και μεταγραφικών παραγόντων συνεργάζονται για την επίτευξη της. Σημαντικός είναι ο ρόλος του TGF-β όπου σύμφωνα με μελέτες έχει μια διπλή δράση. Κατά τα πρώιμα στάδια της LG μπορεί να συμβάλει στην αποδιαφοροποίηση ώριμων ηπατοκυττάρων και τη συμμετοχή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και για να το επιτύχει αυτό χρησιμοποιεί το μηχανισμό της μετατροπής της επιθηλιακής σειράς (ηπατοκύτταρα) σε μεσεγχυματική (μορφή προγονικών ηπατοκυττάρων) με απώλεια του μορίου της E-cadherin, χαρακτηριστικό της επιθηλιακής σειράς. Στο τελευταίο στάδιο όμως της αναγέννησης ο TGF-β σε συνέργεια με το

μεταγραφικό μόριο ELK (ets domain transcription factor) συμβάλει στη δέσμευση των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων στην προγονική ηπατική σειρά (progenitors cells) και στη συνέχεια στη πλήρη μετατροπή τους σε ώριμα ηπατοκύτταρα ή χολαγγειακά κύτταρα^[30,49]. Στην ανωτέρω διαδικασία θα πρέπει να τονιστεί και ο ρόλος του HGF που παρουσιάζει συνέργεια με το TGF- β μέσω του μορίου της β -spectrin. Επίσης το μονοπάτι Wnt συμμετέχει στη διαδικασία της διαφοροποίησης στο τελευταίο στάδιο και παράλληλα συμβάλει στη διατήρηση μέρους των προγονικών κυττάρων στον πρότερο πολυδύναμο χαρακτήρα τους^[30,49,56]. Τέλος θα πρέπει να αναφερθούμε και σε τρεις ακόμα παράγοντες που συμβάλουν στη διαφοροποίηση και αυτοί περιλαμβάνουν τον ALR που μαζί με τους TFs HNF-1A και HNF-4A επάγουν την έκφραση τόσο δομικών μορίων (E-cadherin, α -actin) όσο και ενζύμων του συμπλέγματος CYP 450, του μεταβολισμού της γλυκόζης, των λιπαρών οξέων και της ουρίας που αποτελούν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των ηπατοκυττάρων. Οπότε μια πλήρως αναπληρωμένη και άρτια λειτουργική κυτταρική μάζα επιτυγχάνεται με το πέρας της διαδικασίας της ηπατικής αναγέννησης ενώ τα προγονικά ηπατοβλαστικά κύτταρα διατηρούν τους αριθμούς τους και τον πολυδύναμο χαρακτήρα τους έτοιμα να επέμβουν σε μια νέα ηπατική βλάβη. Στον Πίνακα 1 που ακολουθεί περιγράφονται τόσο τα στάδια της LG που αναλύσαμε παραπάνω όσο και οι παράγοντες που εμπλέκονται συγκεντρωτικά.

Πίνακας 1 Τα τρία στάδια της LG και οι παράγοντες που εμπλέκονται

Liver regeneration	Molecules activated	Genes and pathways upregulated	Genes downregulated	Cellular changes
Early stage (0-12h)	HGF and FGF members (TGF-A, FGF-A, -B) b- CATENIN, c-FOS, c-JUN IGF-1 miR- 21 PGE2	Activate ERK 1/2 pathway through c-MET and EFGR receptors respectively and MMPs-3,-7,-9 upregulation Activation of TFs c-myc, NF- κ B and Stat3 and , Wnt pathway, upregulation of Cyclin D1, PPAR-D, AXIN 2 DNA repair and processing genes	P21, P53	Progression from G1 to S phase Progression from G1 to S phase Increased energy production at cellular level Progression from G1 to S phase Progression from G1 to S phase

	LG stimulant			
Intermediate stage (12-72 h)	TNF-a	Upregulated SCF – c	TGF-B	Progression from S phase
	IL-6	Kit acts through	Decreased Specific	to Mitosis
	INF- γ and C3a/C5a	Ras-Raf-MAPK	Protein 1 (SP1) TF and	Immunomodulatory effects on inflammatory cells
	Complement complex	pathway and PI3/AKT pathway	mediator of DNA damage checkpoint 1	
	CXC chemokines	Activated	(MDC 1)	Induce energy production
	HNF-1 β	JAK/STAT3 pathway induces FOXA2 and ALR upregulation		Progression from S phase to Mitosis
		Upregulate HGF, STAT3 and NF- κ B		Progression from S phase to Mitosis
		Activate Protein kinase C and ERK1/2 pathway		
Later stage (72-168h)	TGF-b,IL-6 and	Activate Smad-2, -3 and	Inactivation for all genes	Termination of Mitosis
	MiR-34a	SOCS3 TFs	from Early Phase	Termination of Mitosis
	GSK3b	respectively		Differentiation into hepatocytes and cholangiocytes
	ALR,TGF-B,HGF and	SNAIL HNF1A		
	WNT pathway			

3. Πολυδύναμα Βλαστικά Κύτταρα και Ηπατική Αναγέννηση

Πολλές πρόσφατες μελέτες διερευνούν το ρόλο των βλαστικών κυττάρων στην ηπατική αναγέννηση. Σύμφωνα με πρόσφατα πειραματικά ευρήματα ανιχνεύτηκαν κύτταρα με χαρακτηριστικές προγονικών ηπατοβλαστικών κυττάρων LSECs (liver sinusoidal endothelial cells) στις περιπυλαίες περιοχές των ηπατικών λοβίων που ονομάζονται κανάλια του Hering και αποτελούν τα εγγύτερα τμήματα του ενδοηπατικού χολαγγειακού συστήματος^[56,134]. Η ανεύρεσή τους βασίστηκε στην έκφραση μοριακών δεικτών όπως ο NCAM και EpcAM (neuronal and epithelial cellular adhesion molecule), κυτοκερατίνες (CK7, CK19) και του μορίου CD133. Παρόλα αυτά τα στοιχεία δείχνουν πως σε κατάσταση ηρεμίας ο πληθυσμός τους ανέρχεται στο 2% της ηπατικής μάζας και είναι ανομοιογενής τόσο όσο αφορά το μέγεθός τους 6-40μm όσο και τους δείκτες που εκφράζουν καθώς τα βλαστικά κύτταρα της ηπατικής σειράς έχουν το φαινότυπο (CK7+, NCAM+, CD133-) ενώ της χολαγγειακής σειράς (CK7+, NCAM-, CD133-). Βαθύτερη μελέτη στη διαδικασία της ηπατικής εμβρυογένεσης διαπιστώνει πως και άλλα μόρια διαχωρίζουν τα βλαστικά κύτταρα του ήπατος σε ακόμα μεγαλύτερο αριθμό υποκατηγοριών με διαφορετικά φαινοτυπικά αλλά και λειτουργικά χαρακτηριστικά καθώς η παρουσία ή όχι του μεταγραφικού παράγοντα Sox9 σε αυτά τα διαχωρίζει σε πρόδρομα κύτταρα της χολαγγειακής ή της ηπατικής σειράς αντίστοιχα^[56]. Τα κύτταρα της πρώτης σειράς μετατρέπονται σε

χολαγγειακά κύτταρα, στα ηπατοκύτταρα της περιπυλαίας ζώνης των ηπατικών λοβίων και στα προγονικά βλαστικά κύτταρα στο ήπαρ των ενηλίκων ενώ τα κύτταρα της ηπατικής σειράς, αρνητικά για Sox-9, διαφοροποιούνται στα ώριμα ηπατοκύτταρα των υπόλοιπων περιοχών των ηπατικών λοβίων. Η πρόκληση μαζικής ηπατικής βλάβης, απώλεια μεγαλύτερη του 50% της ηπατικής μάζας, ενεργοποιεί όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο της LG σειρά αυξητικών και προφλεγμονωδών παραγόντων όπως ο TNF- α , IL-6, HGF και EGF που με τη σειρά τους επάγουν τη μιτωτική δραστηριότητα τόσο των ηπατοκυττάρων όσο και των LSECs για την αναπλήρωση της ηπατικής μάζας^[132,134]. Σε αυτό το σημείο οφείλουμε να τονίσουμε πως τα LSECs έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε πλήρως λειτουργικά ώριμα ηπατοκύτταρα και χολαγγειακά κύτταρα^[56,133,134].

Επιπρόσθετα οι υποκατηγορίες των προγονικών ηπατοβλαστικών κυττάρων μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά τόσο μεταξύ τους όσο και με τα βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών, BM-MSCs (bone marrow mesenchymal stem cells). Μεταξύ των LSECs υπάρχει κοινό αντιγόνο που εκφράζεται σε όλους τους υποπληθυσμούς τους (εμβρυϊκά, ωοειδή κύτταρα, προγονικά ενδοθηλιακά και αστεροειδή κύτταρα) απόδειξη πως έχουν κοινή προέλευση^[55]. Παράλληλα οι προγονικοί ηπατοβλάστες μοιράζονται κοινά αντιγόνα με τα BM-MSCs και συγκεκριμένα το CD133, CD34, και CD45 ενώ παρουσιάζουν και τα δύο είδη κυττάρων υποδοχείς για τον αγγειακό ενδοθηλιακό παράγοντα VEGF (vascular endothelial growth factor) καθώς και αυξημένα επίπεδα του HGF με σαφή υπεροχή στην παραγωγή του τελευταίου από τα BM-MSCs^[132,133]. Θα πρέπει να προσθέσουμε ότι τα BM-MSCs λαμβάνουν ενεργά μέρος στη διαδικασία της ηπατικής αναγέννησης^[54,132,134]. Μάλιστα η συμβολή τους είναι περισσότερο καθοριστική στην αναπλήρωση της ηπατικής μάζας έναντι των LSECs. Κατά την πρόκληση της ηπατικής βλάβης και της ενεργοποίησης μεγάλου αριθμού προφλεγμονωδών και αυξητικών παραγόντων τα BM-MSCs κινητοποιούνται υπό την επίδραση του εκκρινόμενου παράγοντα VEGF από την περιοχή της φλεγμονής ενώ σημαντικό ρόλο στην

κατεύθυνση τους προς το σημείο της βλάβης έχει η χημειοκίνη CXCR4 μέσω της δράσης της στον υποδοχέα CXCR4 που υπερεκφράζεται σε συνθήκες φλεγμονής από τα BM-MSCs^[132,134]. Τα BM-MSCs μεταναστεύουν προς στις περιπυλαίες περιοχές των ηπατικών λοβίων, όπου είναι και η ανατομική περιοχή των LSECs, όπου πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε ώριμα ηπατοκύτταρα κατά τη διάρκεια της LG ενώ με το πέρας αυτής αναπληρώνουν τον πληθυσμό των LSECs των περιπυλαίων περιοχών^[54,57,132,133,134]. Κλείνοντας αξίζει να σημειώσουμε πως είναι πιθανό η αποδιαφοροποίηση ώριμων ηπατοκυττάρων σε προγονικά ηπατοβλαστικά κύτταρα, υπό την επίδραση του παράγοντα TGF- β , να συμβάλει στην αναπλήρωση των απωλειών της ALI^[49]. Συνεπώς ανακύπτει μία σημαντική ερώτηση από τα ανωτέρω: Μπορούν μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) διαφορετικής προέλευσης να προωθήσουν περαιτέρω την ικανότητα του ήπατος να ανανήψει από μια σοβαρή βλάβη ή όχι;^[50]

Συγκεκριμένα χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων αποτελούν απαραίτητες παραμέτρους για την ηπατική αναγέννηση. Καταρχήν και οι δύο τύποι βλαστικών κυττάρων, τόσο οι προερχόμενοι από το μυελό των οστών(BM-MSCs) όσο και από το λιπώδη ιστό (ADSCs), εκφράζουν μεταγραφικούς παράγοντες υπεύθυνους για την υψηλή αναγεννητική τους ικανότητα όπως οι Nanog, oct-4, rex-1, SOX-2 και SOX-17^[57,58]. Επιπλέον τα MSCs διαθέτουν τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε προγονικά κύτταρα πλειάδας ιστών όπως σε μυοβλάστες, χονδροβλάστες και ηπατοβλάστες όταν εκτεθούν σε μικροπεριβάλλον με τους κατάλληλους αυξητικούς παράγοντες^[57-59]. Αυτό προέκυψε με την απομόνωση τόσο ADSCs όσο και BM-MSCs που ήταν θετικά για τα αντιγόνα CD29, CD44, CD90, CD105 και αρνητικά για τους δείκτες CD45, c-KIT και CD133. Η καλλιέργεια των ανωτέρω κυττάρων κατέδειξε την υψηλότερη ικανότητα κυτταρικής διαίρεσης των ADSCs έναντι των BM-MSCs. Παράλληλα όμως τα βλαστικά κύτταρα του λιπώδους ιστού παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό δέσμευσης προς την ηπατική διαφοροποίηση, όταν εκτεθούν σε περιβάλλον με κατάλληλους αυξητικούς παράγοντες. Μορφολογικά τα

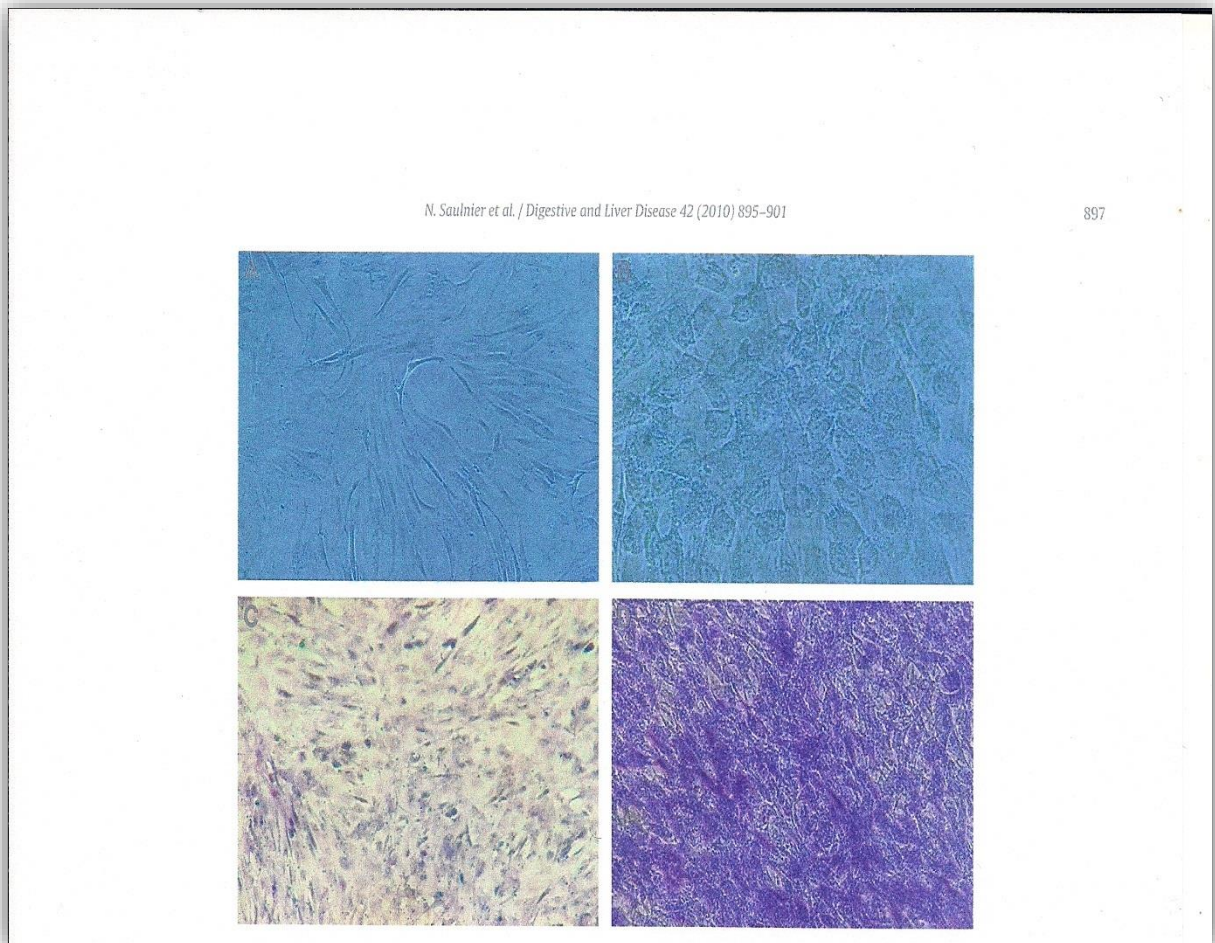
ADSCs παρουσίασαν εικόνα ενός ή δύο πυρήνων ενώ η αρχική επιμήκης ή ακανόνιστη ινοβλαστική μορφή τους μετατράπηκε σε περισσότερο ωοειδή όπως τα κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης^[57,60]. Επιπλέον η έκφραση πρωτεϊνικών παραγόντων όπως της αλβουμίνης (ALB), του ενζύμου του κυτοχρώματος (CYP3A4) καθώς και της TDO2 (tryptophan 2,3 dioxygenase) που αποτελούν ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των ώριμων ηπατοκυττάρων καταγράφηκαν πρώιμα στα διαφοροποιημένα ADSCs^[57,60]. Επιπλέον, τα μεσεγχυματικά πολυδύναμα κύτταρα εμφανίζουν ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες που προκαλούν την αδρανοποίηση των T και B λεμφοκυττάρων ενώ είναι καταλυτική και η δράση τους έναντι τόσο των κυττάρων NK (natural killer cells) όσο και στην αναστολή της ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων (DC)^[58,61,62]. Η καταστολή του ανοσοποιητικού μηχανισμού επιτελείται μέσω της καθήλωσης των T και B λεμφοκυττάρων στη φάση του κυτταρικού κύκλου G0/G1 ενώ υπεύθυνοι για την επίδραση αυτή είναι μία σειρά μορίων που εκκρίνονται από τα MSCs όπως η προσταγλανδίνη E2, η ιντερλευκίνες 6, 8,11 καθώς επίσης και οι παράγοντες HGF και TGF- β ^[61,62,137]. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα τόσο του TNF- α όσο και της INF- γ που επάγουν την ανοσολογική ενεργοποίηση παρουσιάζουν σε αρκετές μελέτες μειωμένες τιμές ενώ ταυτόχρονα τα βλαστικά κύτταρα αναστέλλουν την έκκριση αντισωμάτων από τα B λεμφοκύτταρα^[62]. Θα πρέπει να σταθούμε σε δύο σημαντικά σημεία ακόμα που αφορούν την επίδραση των MSCs στον ανοσολογικό μηχανισμό. Το πρώτο αφορά την ικανότητα των ADSCs και BM-MSCs να αλλάζουν το ποσοστό των υποπληθυσμών των T λεμφοκυττάρων με συνέπεια την αύξηση των επιπέδων FoxP3 T ρυθμιστικών κυττάρων (Treg) έναντι των T4 βοηθητικών λεμφοκυττάρων που έχουν κεντρικό ρόλο στην έναρξη της φλεγμονώδους απάντησης^[62,135]. Μάλιστα πρόσφατες πειραματικές μελέτες καταδεικνύουν πως επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις βλαστικών κυττάρων αυξάνουν τα επίπεδα των κυτταροτοξικών T8 λεμφοκυττάρων στην περίπτωση των BM-MSCs ενώ δε παρατηρείται αυτή η αύξηση στη χορήγηση των ADSCs γεγονός που καθιστά τη τελευταία κατηγορία κυττάρων ιδανική για την αναστολή αυτοάνοσων νοσημάτων, συστηματικών φλεγμονών (παγκρεατίτιδα) και απόρριψης

μοσχευμάτων^[135-137]. Το δεύτερο σημαντικό σημείο είναι πώς τα ADSCs παράγουν μια πληθώρα αυξητικών παραγόντων όπως οι SCF, GM-CSF, IL-1, IL-6, TGF- β , TNF- α , LIF, VEGF και PDGF παρόμοια με τα BM-MSCs που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην ανοσοκαταστολή όσο και στην μετατροπή τους σε πληθώρα προγονικών κυττάρων τόσο της αιμοποιητικής σειράς όσο και άλλων ιστών^[63]. Τέλος, ο κίνδυνος για την κακοήγη μετατροπή των βλαστικών κυττάρων είναι εξαιρετικά μικρός στις έως τώρα μελέτες^[58,60].

Τα ADSCs αντιπροσωπεύουν την πιο πολλά υποσχόμενη ομάδα πολυδύναμων κυττάρων σύμφωνα με ένα αυξανόμενο αριθμό ευρημάτων σε μελέτες τα τελευταία χρόνια^[76]. Πράγματι η απομόνωση αυτών των κυττάρων είναι σχετικά εύκολη καθώς βρίσκονται στον υποδόριο ιστό σε σημαντικές ποσότητες και επιφανειακοί μοριακοί δείκτες όπως οι CD105⁺, CD34⁺/c-kit⁻ και CD90⁺/Thy-1 συμβάλουν στην απομόνωση τους σε σύγκριση με τη δυσκολότερη προσπάθεια για την απομόνωση των BM-MSCs^[2,5,138]. Μάλιστα ο υποπληθυσμός των ADSCs που εκφράζουν στην επιφάνειά τους την ενδογλίνη (CD105) επάγονται πιο ισχυρά στην ηπατική σειρά διαφοροποίησης με τη χρήση κατάλληλων πρωτοκόλλων έκθεσης σε αυξητικούς παράγοντες ενώ παράλληλα εκφράζουν ηπατικούς δείκτες, ένζυμα και λειτουργίες^[138]. Σειρά πρωτοκόλλων έχουν χρησιμοποιηθεί για την ηπατική διαφοροποίηση των ADSCs ανάμεσα τους περιλαμβάνονται οι ακόλουθοι παράγοντες Activin A, FGF-4, HGF και η Oncostatin (OSM)^[64,65,67,68,69,71,139].

Σύμφωνα με πρόσφατα ερευνητικά πρωτόκολλα τα ADSCs επωάζονται αρχικά σε Activin A και FGF-4 που συμβάλει στη μετάβαση από την μεσεγχυματική σειρά των MSCs προς την επιθηλιακή μέσω της αύξησης των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα HNF3 β (FOXA2) και ακολουθεί η έκθεσή τους στα μόρια HGF και OSM με συνέπεια την ηπατική διαφοροποίηση των ανωτέρω κυττάρων^[65,68,70,72,141]. Το αποτέλεσμα είναι η μορφολογική διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων ήδη από το πρώτο 24ώρο οπότε και η εικόνα του ινοβλάστη, δίκην δίπολου,

μετατρέπεται σε εικόνα ωοειδούς κυττάρου προσομοιάζοντας με το ώριμο ηπατοκύτταρο (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Φαινοτυπικές και λειτουργικές αλλαγές in vitro σε πρωτόκολλο ηπατοποίησης (Α και Β). Μορφολογία της ομάδας ελέγχου και των διαφοροποιημένων ADSCs 28 ημέρες μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου, αντίστοιχα. Τα αδιαφοροποίητα ADSCs παρουσιάζουν την τυπική κυτταρική μορφή ινοδοβλάστη, ενώ τα διαφοροποιημένα προς ηπατοκύτταρα βλαστικά κύτταρα εμφανίζουν ωοειδή ή πολυγωνική μορφολογία. (C και D) Χρώση PAS (Periodic acid-Schiff) των αδιαφοροποίητων και διαφοροποιημένων ADSCs την 28^η ημέρα αντίστοιχα. Μια ισχυρή μωβ απόχρωση αποτελεί ένδειξη συσσώρευσης ενδοκυττάριου γλυκογόνου στα κύτταρα ακολουθώντας την επαγωγή της ηπατογένεσης.

Παράλληλα, η έκθεση στους ανωτέρω αυξητικούς παράγοντες επάγει εντός 6 έως 14 ημερών την αύξηση των επιπέδων της αλβουμίνης καθώς και την ικανότητα των διαφοροποιημένων βλαστικών κυττάρων να αποθηκεύουν γλυκόζη και να προσλαμβάνουν χαμηλού μοριακού βάρους λιποπρωτεΐνες (LDL)^[65]. Μάλιστα η χορήγηση των διαφοροποιημένων ADSCs σε χημική βλάβη στο ήπαρ βελτίωσε το επίπεδο της βλάβης μέσω ηπατοτροφικών παραγόντων που εκφράζουν τα βλαστικά κύτταρα^[65,67]. Ενδελεχής έλεγχος κατέδειξε πως ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4a ενεργοποιείται υπό την επίδραση της OSM με αποτέλεσμα την τη μορφολογική και λειτουργική ωρίμανση των βλαστικών κυττάρων σε ώριμα ηπατοκύτταρα^[66,139]. Επίσης ακόμα και η συμβολή του HNF3β δεν περιορίζεται μόνο στη μετάβαση των MSCs στην επιθηλιακή σειρά αλλά και στην επακόλουθη διαφοροποίηση^[139].

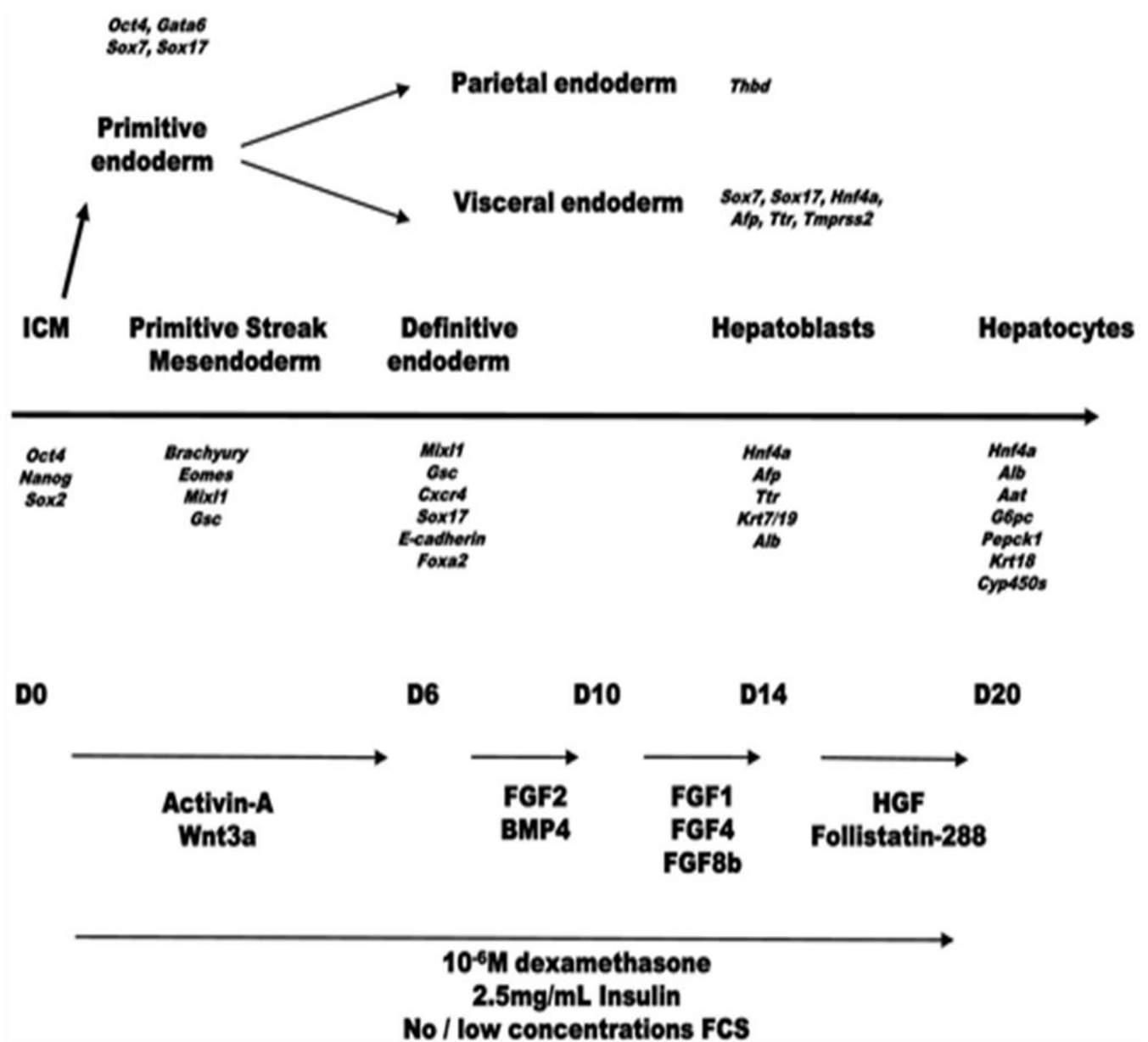
Κατά το αρχικό στάδιο της επώασης των βλαστικών κυττάρων με τους αυξητικούς παράγοντες, activin A και FGF-4, επάγεται η άνοδος των επιπέδων του HNF3β, Sox17 και Cxcr4 έως την 6^η ημέρα και την πρόοδο των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προς τη μετατροπή τους σε κύτταρα της επιθηλιακής σειράς (mesenchymal to epithelial transition). Παράλληλα αναστέλλεται η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Snail και Twist, στην περίπτωση του δεύτερου παράγοντα μέσω μεθυλίωσης του προαγωγού του (promoter), με αποτέλεσμα την πρόοδο της επιθηλιακής μετάβασης. Επιπλέον, αυξάνεται η έκφραση της E-cadherin και της α -catenin που σχετίζεται με τη μορφολογική μετατροπή των ADSCs σε ηπατοκύτταρα ενώ μειώνονται τα επίπεδα της N-cadherin και της vimentin που έχουν αρχικά τα MSCs^[69,139]. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα του HNF4a αυξάνονται μεταξύ της 6^{ης} και 10^{ης} ημέρας της επώασης σε ποσοστό που αγγίζει το 87% της αντίστοιχης έκφρασης στα ώριμα ηπατοκύτταρα και εκφράζεται στο 30% των υπό διαφοροποίηση ADSCs^[139]. Ο HNF4a με τη σειρά του ευθύνεται για την αύξηση των επιπέδων της αλβουμίνης (Alb), της αμινοτρανσφοράσης της τυροσίνης (TAT), της γλυκόζο-6-φωσφατάσης (G6PD) καθώς και αρκετών μελών της οικογένειας του κυτοχρώματος P450 (CYP450) μεταξύ της 6^{ης} και της 28^{ης} ημέρας της

διαφοροποίησης^[66,139]. Ταυτόχρονα η α-φετοπρωτεΐνη (Afp) όσο και η κυτοκερατίνη 19 (CK19) εκφράζονται από την 6^η ημέρα χαρακτηρίζει τα ηπατοβλαστικά κύτταρα. Η μετέπειτα παύση της έκφρασης της Afp οδηγεί τα διαφοροποιημένα ADSCs προς τη μετατροπή τους σε χολαγγειακά κύτταρα ενώ από την άλλη πλευρά η παύση της CK19 κατευθύνει τα κύτταρα προς την ηπατική σειρά^[139]. Επιπλέον, θα πρέπει να τονιστεί πως πρώιμα κατά την επώαση των βλαστικών κυττάρων παρατηρείται μείωση των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα Oct-4, που είναι υπεύθυνος για την διατήρηση του πολυδύναμου χαρακτήρα των ADSCs, κάτω του 5% ενώ μείωση παρουσιάζουν και τα επίπεδα του Nanog. Επιπλέον, σημαντική είναι η αύξηση της έκφρασης μεταγραφικών μορίων όπως των HNF-1a, HNF6, HNF3a και GATA4 που επάγουν την ρύθμιση ηπατικών ενζύμων και πρωτεϊνών στα διαφοροποιημένα ADSCs^[74-76]. Σε αυτές τις πρωτεΐνες που επάγονται από τους ανωτέρω TFs περιλαμβάνεται η αύξηση των επιπέδων των mRNAs της αλβουμίνης (Alb), της UDP-γλυκουροσυλτρανσφεράσης που εμπλέκεται στην έκκριση των χολικών αλάτων, στα μέλη του κυτοχρώματος P450 (CYP3A4, CYP1A, CYP2A6) καθώς και ένζυμα του μεταβολισμού της ουρίας, των λιποπρωτεϊνών (LDL) και της αποθήκευσης γλυκογόνου^[77,78,79,139].

Παρατηρείται όμως ανομοιογένεια ως προς το βαθμό της έκφρασης των ανωτέρω ειδικών ηπατικών μορίων σε σύγκριση με τα ώριμα ηπατοκύτταρα όπως και χρονική ετερογένεια στην ανίχνευσή τους. Τα επίπεδα λοιπόν της α-φετοπρωτεΐνης (Afp), της τρανθυρετίνης (TTR) και των κυτοκερατινών 18 και 19 (CK18,CK19) αυξάνονται έως την 8^η ημέρα για να παύσει η έκφραση τους^[68,76-78]. Κατά τη φάση μεταξύ 9^{ης} και 14^{ης} ημέρας της διαφοροποίησης αυξάνονται τα επίπεδα της αλβουμίνης (ALB), της TAT, της TOD, (AAT) και του παράγοντα VII του πηκτικού μηχανισμού σε ανιχνεύσιμα επίπεδα αν και σε σύγκριση με τα ώριμα ηπατοκύτταρα οι τιμές των ανωτέρω πρωτεϊνών είναι εκατό φορές μικρότερες^[77,78,139]. Το τελευταίο στάδιο της διαφοροποίησης περιλαμβάνει τη χρονική περίοδο μεταξύ 15^{ης} και 28^{ης} ημέρας. Εδώ παρατηρούμε πως ένζυμα που σχετίζονται τόσο με τη αποθήκευση γλυκογόνου, G6PD, όσο και με το

μεταβολισμό των λιπιδίων (LDL) να εκφράζονται ανιχνεύσιμα επίπεδα. Επίσης αυξάνονται τα ένζυμα που σχετίζονται με το μεταβολισμό της ουρίας όσο και με την αποτοξίνωση τοξικών μεταβολιτών (CYP450 και ATP-binding cassette transporter) καθώς και της α 1-αντιθρυψίνης (AAT)^[75,139,142]. Η αύξηση αυτών των ενζύμων και διαμεμβρανικών μεταφορέων τοξικών ουσιών (MDR1) δε παρατηρείται νωρίτερα από την 28^η ημέρα. Μάλιστα στο μεταβολικό μονοπάτι της ουρίας όπως και σε αυτό της αποθήκευσης γλυκογόνου τα επίπεδα των αντίστοιχών ενζύμων είναι έως και σε εκατό φορές μικρότερη συγκέντρωση έναντι των ώριμων ηπατοκυττάρων. Από την άλλη πλευρά, όσο αφορά τα ένζυμα της οικογένειας CYP450 συνολικά εμφανίζουν συγκεντρώσεις που είναι έως και δεκαπέντε φορές μικρότερες^[139]. Πρέπει όμως να σημειώσουμε ότι συγκεκριμένα μέλη του κυτοχρώματος όπως το CYP3A4 και CYP1A εκφράζονται σε ποσοστό που αγγίζει το 85% και 45% αντίστοιχα σε σύγκριση με τα ώριμα ηπατοκύτταρα^[139,142]. Αξίζει όμως να αναφερθεί πως υπάρχουν πειραματικές εργασίες που τονίζουν την παρουσία και άλλων μελών της οικογένειας CYP450 όπως του CYP1B1 και CYP5/7/19 σε ανιχνεύσιμα επίπεδα ενώ οι συγκεντρώσεις της ουρίας στα διαφοροποιημένα ADSCs αγγίζουν ποσοστά που αντιστοιχούν στο 4-5% των αντίστοιχων συγκεντρώσεων στα ώριμα ηπατοκύτταρα^[81-84]. Επίσης, αυξάνονται τα επίπεδα και ενζύμων της πήξης του αίματος όπως της ανασταλτικής πρωτεΐνης σερίνης (SERPINF1), η φωσφολιπάση A2 (PLA2G2A) και η πρωτεΐνη S (PROS1) ενώ εκφράζονται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα και πρωτεΐνες του συμπληρώματος όπως C1R και C1S^[83]. Τέλος στα διαφοροποιημένα MSCs επάγεται η παραγωγή και άλλων διαμεμβρανικών μεταφορέων τοξικών ουσιών όπως του MDR2 καθώς και ενζύμων που εμπλέκονται στην αδρανοποίηση τοξικών ουσιών όπως την εποξειδική υδρολάση 1 (EPHX1) και τη τρανσφεράση της γλουταθειόνης^[83,84]. Φαίνεται όμως πως σε κάθε περίπτωση η επώαση των MSCs στους αυξητικούς παράγοντες επάγει τη ηπατική διαφοροποίηση μόλις στο 20% του πληθυσμού τους ενώ η μεγαλύτερη έκφραση του HFN4a αυξάνει έως και στο διπλάσιο τη μετατροπή των MSCs σε ηπατοκύτταρα^[66,84]. Η εικόνα 3 αποδίδει σχηματικά τα στάδια της ηπατικής

εμβρυογένεσης στα οποία βασίζονται τα πρωτόκολλα ηπατικής διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων.



Εικόνα 4. Περιγραφή της ηπατικής εμβρυογένεσης στην οποία βασίζονται τα πρωτόκολλα ηπατικής διαφοροποίησης. Τα γονίδια εκφράζονται σε συγκεκριμένα στάδια κατά την ανάπτυξη του ήπατος. Οι αυξητικοί παράγοντες και οι συνθήκες καλλιέργειας απεικονίζονται.

Όλα αυτές οι παρατηρήσεις συγκλίνουν πως τα ADSCs θα μπορούσαν να υποκαταστήσουν τις απώλειες σε έδαφος σοβαρής ηπατικής βλάβης αν και ο ακριβής τρόπος χορήγησης τους, επώαση με αυξητικούς παράγοντες ή αδιαφοροποίητα, αν και οι έως τώρα ενδείξεις οδηγούν στη παραδοχή της δεύτερης επιλογής. Πράγματι η μεταμόσχευση MSCs που είχαν υποστεί επώαση για τουλάχιστον 28 ημέρες δεν κατάφερε να αναστρέψει την ηπατική βλάβη ή να συμβάλει σημαντικά στην ηπατική αναγέννηση^[69]. Η διαπίστωση όμως ήταν πως τα κύτταρα αυτά ενσωματώνονται στο ηπατικό παρέγχυμα ενώ η παραμονή τους εκεί ανιχνεύεται και μακροπρόθεσμα χωρίς να αυξάνεται ο κίνδυνος για την πρόκληση νεοπλασίας^[66]. Όταν όμως χορηγήθηκαν αδιαφοροποίητα ADSCs σε πρότυπο ηπατικής βλάβης συνέβαλλαν σημαντικά στην βελτίωση τόσο στους βιοχημικούς όσο και στους ιστολογικούς δείκτες ανάνηψης. Η δράση των αδιαφοροποίητων MSCs εδράζεται στην ικανότητα τους να παράγουν τροφικούς παράγοντες όπως VEGF (vascular Endothelial Growth Factor), HGF, FGF και NGF (Neurotrophic Growth Factor) που επαυξάνουν την αναγεννητική ικανότητα του ήπατος^[139,140]. Παράλληλα, επάγουν την παραγωγή IL-1Rα και IL-10 και τη μείωση των επιπέδων του TNF-α και της IL-1 και μέσω αυτής της αντιφλεγμονώδους δράσης τους καταστέλλουν το μέγεθος της ηπατικής βλάβης^[139,140,143]. Ακόμα η καλλιέργεια ADSCs με ηπατοκύτταρα *in vitro* ανέδειξε τα οφέλη αυτού του συνδυασμού. Πράγματι τα ηπατοκύτταρα προέρχονταν από άτομα που είχαν υποστεί σημαντική ηπατική βλάβη και παρουσίασαν σημαντική βελτίωση όσο αφορά την επιβίωση τους αλλά και τη λειτουργικότητα τους μέσω της επίδρασης των βλαστικών κυττάρων^[80]. Μάλιστα ο συγχρωτισμός των ηπατοκυττάρων με τα ADSCs οδήγησε τα τελευταία στην παραγωγή αλβουμίνης χωρίς να μπορούμε να πούμε με ασφάλεια αν αυτό είναι συνέπεια ηπατικής διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων ή σύντηξης των MSCs με τα ηπατοκύτταρα^[80,140].

Βασιζόμενοι στα ευρήματα των προηγούμενων μελετών σχετικά με την ικανότητα των ADSCs να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται σε ώριμα λειτουργικά ηπατοκύτταρα καθίστανται μια πολύτιμη πηγή για

μεταμόσχευση σε έδαφος σοβαρής ηπατικής βλάβης. Ο Yaki και οι συνεργάτες του παρείχαν μέσω της πειραματικής τους μελέτης αποδείξεις πως τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να μεταμοσχευθούν σε αρουραίους μετά την πρόκληση χημικής ηπατικής βλάβης. Είχε προηγηθεί η επώαση των βλαστικών κυττάρων με τον Hepatic Growth Factor (HGF) για διάστημα δύο εβδομάδων οπότε και είχαν αποκτήσει χαρακτηριστικά ηπατοκυττάρων. Η επακόλουθη χορήγησή τους είχε ως συνέπεια την αποκατάσταση των επιπέδων της αλβουμίνης, τη μείωση των επιπέδων των τρανσαμινασών καθώς και τον περιορισμό της ηπατικής ίνωσης^[85] (Πίνακας 2). Σε ανάλογα αποτελέσματα κατέληξε και ο Gruttadauria πέντε χρόνια αργότερα που εκτέλεσε παρόμοιο πείραμα πρόκλησης ηπατικής βλάβης. Η διαφορά όμως με τον Yaki έγκειται στη χορήγηση αδιαφοροποίητων βλαστικών κυττάρων χωρίς προηγούμενη επώαση με αυξητικούς παράγοντες^[86]. Κατά συνέπεια, τα βλαστικά κύτταρα μπορούσαν να μειώσουν την ένταση της ηπατικής βλάβης και να επιταχύνουν την ανάνηψη του ήπατος με ή χωρίς επώαση σε ηπατοτροφικούς παράγοντες. Επιπρόσθετα, ο Seki T. και οι συνεργάτες του προκάλεσαν οξεία ηπατική βλάβη (ALI) είτε μέσω ηπατεκτομής είτε με παροδική περιίδεση του ηπατοδωδεκαδακτυλικού συνδέσμου για να αναπαράγουν του πρότυπο της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης^[87]. ADSCs χορηγήθηκαν από την φλέβα του πέους και ο ρυθμός ηπατικής αναγέννησης ήταν υψηλότερος έναντι της ομάδας ελέγχου στην οποία δε μεταμοσχεύθηκαν βλαστικά κύτταρα. Πηγαίνοντας ένα βήμα παρακάτω ο Seki A. χορήγησε βλαστικά κύτταρα λιπώδους ιστού σε πρότυπο χρόνιας ηπατικής βλάβης που προκλήθηκε από μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα και είχε οδηγήσει σε κίρρωση^[88]. Τα ευρήματά του τονίζουν τόσο τις ανοσοτροποποιητικές και αναγεννητικές ιδιότητες των μεταμοσχευμένων ADSCs (Πίνακας 2). Ακόμα έξι μελέτες από τους Libo et al, Yu et al, Kim et al, Saidi R et al, Pascual-Miguelanez I et al και Lisi et al κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η χορήγηση ADSCs που έχουν υποστεί ή όχι επώαση με αυξητικούς παράγοντες βελτιώνουν την ηπατική λειτουργία σε έδαφος χημικής βλάβης με τετραχλωράνθρακα (CCL4)^[89-94] (Πίνακας 2). Επιπλέον η πρόκληση ALI με τοξική δόση παρακεταμόλης στο πρωτόκολλο του

Salomone et al περιορίστηκε σημαντικά μετά τη χορήγηση βλαστικών κυττάρων καθώς τόσο η ιστολογική απόδειξη της ALI όσο και η συμπτωματολογία της ηπατικής εγκεφαλοπάθειας ήταν δεν ανευρέθηκαν^[95]. Επίσης πρωτόκολλα χρόνιας ηπατικής ανεπάρκειας διερευνήθηκαν από τους Harn et al και Okura et al. Σύμφωνα με τα ευρήματά τους τα ADSCs μπορούν να περιορίσουν την ένταση της ηπατικής ανεπάρκειας και να βελτιώσουν το ρυθμό επιβίωσης του ηπατικού παρεγχύματος^[82,96]. Τα βλαστικά κύτταρα επηρεάζουν θετικά την ηπατική ανάνηψη ακόμα και σε έδαφος σύνθετων βλαβών όπως περιγράφονται στις εργασίες των Koellensperg et al και Zhu et al^[97,98]. Τέλος, ο Sun et al χρησιμοποίησε ορό από αρουραίους που είχαν υποστεί ηπατεκτομή τον οποίο συνέλλεξε 24 μετά την πρόκληση της ηπατεκτομής και σε αυτόν επώασε ADSCs τα οποία και διαφοροποιήθηκαν σε ηπατοκύτταρα ενώ η ένταση της ηπατικής βλάβης μειώθηκε δραματικά^[99]. Όλες αυτές οι εργασίες σηματοδοτούν τον πολυδιάστατο ρόλο που μπορούν να διαδραματίσουν τα ADSCs με σκοπό τη μείωση των συνεπειών σύνθετων ηπατικών βλαβών που οδηγούν σε μη αναστρέψιμη ανεπάρκεια.

4. Συμπέρασμα

Βασισμένοι σε αυτά τα πειραματικά ευρήματα τα ADSCs προσφέρουν ενθαρρυντικές ενδείξεις ότι αποτελούν ένα ισχυρό θεραπευτικό μέσο για την αντιμετώπιση της οξείας και της χρόνιας ηπατικής ανεπάρκειας.

Πίνακας 2 Πειραματικές μελέτες μεταμόσχευσης MSCs

Yagi K et al 2008 Jan	Chemical induced liver injury in rats by CCL4	Transplantation of BM-MSCs through caudal vein after incubation with HGF	Restoration of serum albumin, suppression of transaminase and liver fibrosis
Gruttadauria et al 2013 Mar	Intraperitoneal injection of CCL4 in rats	Bone marrow MSCs IV route	Less serious hepatic damage
Seki T. et al 2012 Nov	Ischemia/reperfusion with subsequent hepatectomy in rats	Penile vein administration of ADSCs	Acceleration of liver regeneration
Seki A et al 2013 Sep	Cirrhosis due to non alcoholic steatohepatitis	Injection of ADSCs directly to hepatic parenchyma	Downregulation of inflammatory cells upregulation of regenerative genes
LIBO YIN et al 2015 Mar	Acute CCl4 liver injury in mice	Pretreated ADSCs were delivered	Detection of Albumin one month postoperative alleviation of hepatic injury
Yu Wang et al 2012	Carbon tetrachloride (CCl4)-induced liver fibrosis in rats	ADSCs administration via portal or tail vein	Increased portal vein perfusion, microcirculation improve- ment, decreased fibrosis
Kim et al 2011 Sep	Chemical induced hepatic injury	Portal vein/Penile vein/intrahepatic route ADSCs	Amelioration of ALI indexes
Lisi Deng et al 2014	Acute CCl4 liver injury in mice	ADSCs transplantation via tail vein	Increased survival in transplanted group
Salomone F et al 2013 Nov	APAP liver injury in rats	Administration of ADCSs 24 hours after acetaminophen induced ALI	Decreased levels of transaminases and prothrombin, absent liver

			injury and encephalopathy
Harn et al 2012 Jul	Chronic model of chemical hepatic injury	Intrahepatic injection of ADSCs	ADSCs differentiate into hepatic like cells
Okura H et al 2010 Aug	Non obese diabetic severe combined immunodeficiency mice with chronic liver disease	ADSCs transformed into functional hepatic like cell clusters and transplanted to chronic liver disease	Improvement of serum albumin and total bilirubin levels
Koellensperger E et al 2013	Chemical induced liver injury by retrorsine and allyl alcohol and 2/3 hepatectomy	Injection of ADSCs directly to hepatic parenchyma	Increased albumin levels post operatively, MSCs identification 12 weeks after transplantation
Zhu W et al 2013 Feb	Rabbit model acute -on- chronic liver failure	Transplantation of xenogeneic ADSCs	Improved survival and liver function
Sun J et al 2013 Mar	ADSCs incubation with serum from hepatectomized rats		ADSCs differentiation into hepatic like cells and amelioration of liver injury
Avritscher R ^[100] et al 2013 Dec	Liver fibrosis due to arterial embolization with ethanol -ethiodized oil	Pretreated ADSCs were delivered through percutaneous intraportal route successfully	Unable to identify MSCs 4 weeks after implantation
Pascual-Miguelanez et al 2015 Apr	Acute liver failure induced by intraperitoneal administration of carbon tetrachloride (CCl4)	Allogenic undifferentiated ADSCs were delivered via tail vein	Reduced mortality in treated groups and presentation of ADSCs in hepatic parenchyma
Saidi R et al 2015 Jul	CCl4-induced acute liver failure	Mice were treated with human ADSCs prior CCL4 induced acute liver failure (ALF)	Attenuated liver injury and improved survival.

Ειδικό Μέρος

Σκοπός της μελέτης

Η απομόνωση και η μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων κερδίζει συνεχώς έδαφος σε πολλές πειραματικές δοκιμές. Ωστόσο παραμένουν πολλά ερωτηματικά αναπάντητα σε θέματα που αφορούν: 1) το είδος των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν, 2) τον αριθμό που θα μεταμοσχευθεί, 3) τη τεχνική και τη θέση εμφύτευσης και 4) την προσπάθεια ανίχνευσης τους μετεγχειρητικά. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκε ένα πείραμα, με αρκετά πρωτότυπα στοιχεία στο τελικό του σχεδιασμό. Η αναζήτηση της σχετικής βιβλιογραφίας, έδειξε σχετικά λίγες μελέτες και πάντως με διαφορετικά χαρακτηριστικά από την προτεινόμενη.

Το πειραματικό πρωτόκολλο αποτελείται από 6 ομάδες θηλυκών αρουραίων, τύπου Wistar, που υπόκεινται σε τοξική ηπατική βλάβη με τη χρήση παρακεταμόλης. Οι ομάδες είναι οι ακόλουθες: Ομάδα A (control) και ομάδα B (sham) με 15 πειραματόζωα η κάθε μία και οι ομάδες C,D,E και F με 18 πειραματόζωα εκάστη.

- 1) Η ομάδα A εκτίθεται σε τοξική δόση παρακεταμόλης και στη συνέχεια τα πειραματόζωα θανατώνονται στις 4, 7 και 15 ημέρες μετά τη λήψη παρακεταμόλης. Σε κάθε χρονικό σημείο επιτελείται η ευθανασία 5 πειραματόζωων.
- 2) Στην ομάδα B (sham) τα πειραματόζωα δεν εκτίθενται σε παρακεταμόλη και θανατώνονται στις 4, 7 και 15 ημέρες με 5 πειραματόζωα σε κάθε χρονική στιγμή από τις προαναφερόμενες.
- 3) Στην ομάδα C τα πειραματόζωα εκτίθενται σε τοξική δόση παρακεταμόλης και 2 ημέρες μετά τη χορήγησή της ακολουθεί η έγχυση 1×10^6 ADSCs ενδοφλέβια μέσω της πυλαίας φλέβας. Στη συνέχεια ακολουθεί η ευθανασία των πειραματόζωων στις 4, 7 και 15

ημέρες μετά την μεταμόσχευση των βλαστικών κυττάρων. Σε κάθε χρονική στιγμή θανατώνονται 6 πειραματόζωα.

- 4) Στην ομάδα D όπως και στη προηγούμενη ομάδα τα πειραματόζωα εκτίθενται σε τοξική δόση παρακεταμόλης και 2 ημέρες αργότερα στην ενδοφλέβια έγχυση 2×10^6 ADSCs μέσω της πυλαίας. Ακολουθεί η ευθανασία στις 4, 7 και 15 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση των βλαστικών κυττάρων, 6 σε κάθε χρονικό σημείο.
- 5) Στην ομάδα E χορηγείται η τοξική δόση της παρακεταμόλης και ακολουθεί 2 ημέρες αργότερα η ενδοηπατική χορήγηση 1×10^6 ADSCs. Τα πειραματόζωα θανατώνονται όπως στις προηγούμενες ομάδες στις 4, 7 και 15 ημέρες μετά την μεταμόσχευση.
- 6) Στην ομάδα F μετά τη χορήγηση της παρακεταμόλης ακολουθεί η ενδοηπατική μεταμόσχευση 2×10^6 ADSCs και η ευθανασία στις 4, 7 και 15 ημέρες μετά από τη χορήγηση των βλαστικών κυττάρων.

Τα βλαστικά κύτταρα που χορηγούνται στο πειραματικό πρωτόκολλο μας προέρχονται από αρσενικούς Wistar αρουραίους και επειδή πρόκειται για μεταμόσχευση κυττάρων μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους μετρούνται ως ίσο-μοσχεύματα οπότε δε τίθεται θέμα ανοσολογικής απόρριψης. Τα ADSCs απομονώνονται από το λιπώδη ιστό, συντηρούνται σε καλλιέργειες και ακολούθως μεταμοσχεύονται όπως θα παρουσιαστεί αναλυτικότερα το επόμενο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Ο λόγος που επιλέγονται αρσενικοί δότες (ΧΨ) σε θηλυκούς λήπτες (ΧΧ) είναι ώστε να ανιχνευθεί το χρωμόσωμα Ψ με τη τεχνική της in situ υβριδοποίησης (FISH) (βλέπε Υλικά και μέθοδοι). Με τον τρόπο αυτό επιχειρούμε να ανιχνεύσουμε τη μετεγχειρητική συμπεριφορά των μεταμοσχευμένων κυττάρων.

Τέλος ακολούθησε ειδική ιστοπαθολογική μελέτη που περιλάμβανε:

- α) τη χρήση παθολογοανατομικού score για την ποσοτική εκτίμηση της ιστικής βλάβης χωρίς και με τη χορήγηση βλαστικών κυττάρων, β)
- ανίχνευση των βλαστικών κυττάρων στο ηπατικό παρέγχυμα με τη χρήση in situ υβριδοποίησης, γ) μελέτη της ηπατικής αναγέννησης και του ρυθμού της και δ) τη μελέτη μοριακών δεικτών που υποστηρίζουν

την διαφοροποίηση των ADSCs προς την ηπατική σειρά. Μέσα από αυτό τον τρόπο προσέγγισης θα προσπαθήσουμε να πιστοποιήσουμε τον ευεργετικό ρόλο των βλαστικών κυττάρων του λιπώδους ιστού στην οξεία ηπατική βλάβη καθώς και των παραμέτρων που θέσαμε στην αρχή αυτού του κεφαλαίου.

Υλικά και Μέθοδοι

A. Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στο πρωτόκολλο μας ήταν νεαροί θηλυκοί αρουραίοι του είδους Wistar. Το βάρος τους ήταν κατά μέσο όρο στα 250 γραμμάρια και το μήκος τους στα 21 εκατοστά ενώ ο συνολικός αριθμός αρουραίων που χρειάστηκε για την ολοκλήρωση της έρευνας μας κυμάνθηκε στα 110 πειραματόζωα.

Ανατομία του ήπατος

1. Διαστάσεις και σύνδεσμοι

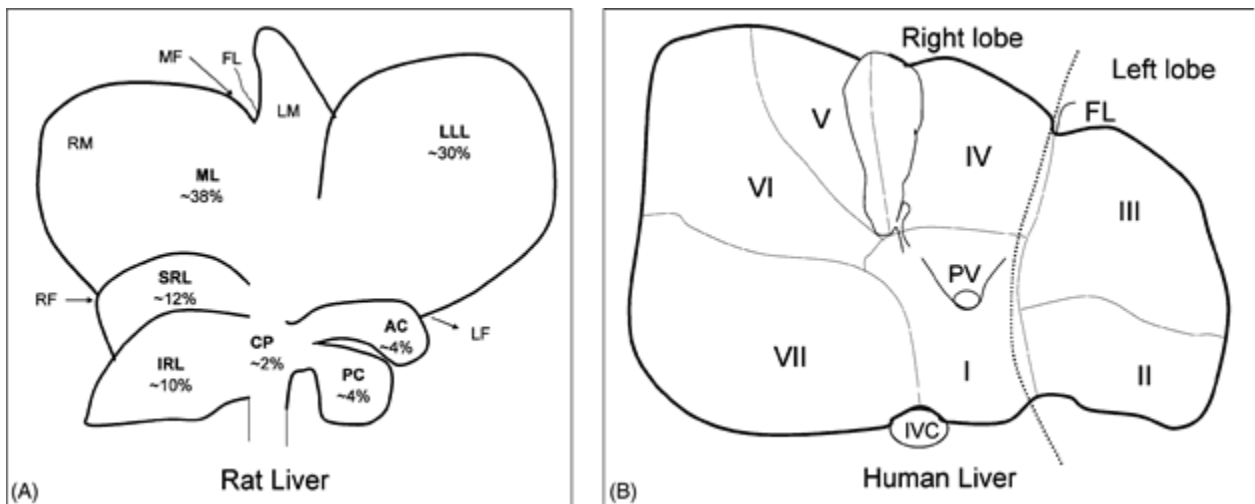
Πριν συνεχίσουμε στην ανάλυση των μεθόδων είναι σημαντικό να αναφερθούμε στην ανατομία του ήπατος των αρουραίων Wistar. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες το ήπαρ στους αρουραίους είναι πολυλοβωτό όπως και στα υπόλοιπα θηλαστικά και αποτελεί το 5% του συνολικού βάρους σώματος με συνέπεια σε πειραματόζωα που ζυγίζουν 250 έως 300 γραμμάρια να έχουν κατά μέσο όρο βάρος ήπατος περί τα 13,6 γραμμάρια^[144]. Οι διαστάσεις του είναι οι ακόλουθες: εγκάρσια διάμετρος 7,5 έως 8 εκατοστά, μήκος ανώτερης προς κατώτερη επιφάνεια 3,8 έως 4,2 εκατοστά και πρόσθιο-οπίσθια διάμετρος 2,2 έως 2,5 εκατοστά. Οι σύνδεσμοι του ήπατος στα wistar είναι παρόμοιοι με αυτούς που ανευρίσκονται στους ανθρώπους. Ο δρεπανοειδής σύνδεσμος είναι μία λεπτή περιτοναϊκή πτυχή που προσφύεται στην κοιλιακή επιφάνεια του διαφράγματος και στην οπίσθια επιφάνεια του δεξιού ορθού κοιλιακού μυός. Ο στεφανιαίος σύνδεσμος αποτελείται από δύο πέταλα (το ανώτερο και το κατώτερο). Το ανώτερο πέταλο του στεφανιαίου συνδέσμου προέρχεται από το ανώτερο όριο της ελεύθερης επιφάνειας του ήπατος προς την κοιλιακή επιφάνεια του διαφράγματος σύστοιχα. Οι τρίγωνοι σύνδεσμοι χωρίζονται σε δεξιό και αριστερό. Ο δεξιός

τρίγωνος σύνδεσμος βρίσκεται στο δεξί χείλος του άνω δεξιού λοβού και είναι μία μικρή πτυχή που περνά στο διάφραγμα μέσα από τη περιοχή που διαχωρίζονται τα δύο πέταλα του στεφανιαίου συνδέσμου. Ο αριστερός τρίγωνος σύνδεσμος ενώνει το οπίσθιο τμήμα της άνω επιφάνειας του αριστερού λοβού με το διάφραγμα. Η απόφυση του κερκοφόρου λοβού αναρτάται στην οπίσθια επιφάνεια του διαφράγματος με λεπτούς συνδέσμους. Τέλος ο στρογγύλος σύνδεσμος του ήπατος είναι μια ινώδης χορδή που προέρχεται από την εκφύλιση της ομφαλικής φλέβας και ανέρχεται από τον ομφαλό στο πρόσθιο ελεύθερο άκρο του δρεπανοειδούς συνδέσμου, στην ομφαλική εντομή^[144].

2. Ηπατικοί λοβοί

Οι ηπατικοί λοβοί είναι οι ακόλουθοι: Α) Ο μέσος λοβός (ML) είναι ο μεγαλύτερος αποτελώντας το 38% του βάρους του ήπατος. Ο ML έχει τραπεζοειδές σχήμα και βρίσκεται σε συνέχεια με τον αριστερό πλάγιο λοβό (LLL). Χωρίζεται με τη κύρια σχισμή (main fissure) σε δεξιό μέσο λοβό (RML) που αποτελεί τα 2/3 του (ML) και τον αριστερό μέσο λοβό (LML) που αποτελεί το υπόλοιπο 1/3 του (ML). Τέλος ο RML περιέχει αριστερά και δεξιά ηπατικά αγγειακά στοιχεία. Β) Ο δεξιός λοβός (RL) εντοπίζεται εκ δεξιών της κάτω κοίλης φλέβας και οπισθίως του δεξιού υποχονδρίου ενώ καλύπτεται σχεδόν πλήρως από το μέσο λοβό και το βάρος του αποτελεί το 22% της ηπατικής μάζας. Μία οριζόντια σχισμή το διαχωρίζει σε δύο υπολοβούς πυραμοειδούς σχήματος, το δεξιό άνω λοβό (SRL) και τον κατώτερο (IRL). Γ) Ο αριστερός πλάγιος λοβός (LLL) έχει ρομβοειδές σχήμα, επίπεδο και εντοπίζεται στο επιγάστριο και το αριστερό υποχόνδριο έμπροσθεν του στομάχου. Το μέσο τμήμα του καλύπτεται από το αριστερό τμήμα του (ML) και η άνω επιφάνεια του είναι ελαφρώς κυρτή. Τέλος δεν φέρει καμία σχισμή. Δ) Ο κερκοφόρος λοβός (CL) εντοπίζεται όπισθεν του (LLL) και εξ αριστερών της κάτω κοίλης καθώς και της πυλαίας φλέβας. Αποτελεί το 8-10% της ηπατικής μάζας και χωρίζεται σε δύο τμήματα: το περιπυλαίο (caudate process) που συνιστά το 2-3% του ηπατικού βάρους και περιβάλλει την πυλαία φλέβα ενώ γεφυρώνει το δεξιό λοβό με τον

κερκοφόρο καθώς και το λοβό του Spiegel που έχει πρόσθιο και οπίσθιο τμήμα με μορφή δισκοειδή (4% της ηπατικής μάζας). Τέλος το πρόσθιο τμήμα του (CL) εντοπίζεται εμπροσθέν του οισοφάγου και του στομάχου ενώ το οπίσθιο τμήμα του CL όπισθεν αυτών των δομών. Η εικόνα 5 παρουσιάζει συνοπτικά τους ηπατικούς λοβούς των αρουραίων wistar.



Εικόνα 5. Α) Κοιλιακή επιφάνεια των ηπατικών λοβών του αρουραίου και το μέσο βάρος εκάστου λοβού. Η ηπατική μάζα κάθε λοβού είναι σταθερή στους αρουραίους. Ο κερκοφόρος λοβός (CL) σχηματίζεται από τους CP, AC και PC, ο δεξιός λοβός σχηματίζεται από τους SRL και IRL και ο μέσος λοβός από τους LM και RM. (B) Κοιλιακή επιφάνεια του ανθρώπινου ήπατος απεικονίζει τη διαίρεση του σε τμήματα σύμφωνα με την ταξινόμηση του Couinaud. Το τμήμα VIII είναι υψηλότερα του τμήματος V και δεν απεικονίζεται σε αυτή την εικόνα. Σύμφωνα με τον Kongure K, στον αρουραίο οι λοβοί CL, LLL, LML και RML αντιπροσωπεύουν στους ανθρώπους τα τμήματα I και IX, τμήμα II, τμήματα III, IV, V και VIII; και τα τμήματα VI και VII, αντίστοιχα. Στους αρουραίους το αριστερό ήμισυ του ήπατος συνίσταται από τους λοβούς LLL, CL και LML ενώ το δεξί ήμισυ του ήπατος αντιπροσωπεύουν οι λοβοί RL και RML. CP, απόφυση κερκοφόρου, AC, πρόσθιος λοβός του κερκοφόρου, PC, οπίσθιος λοβός του κερκοφόρου, SRL, άνω δεξιός λοβός, IRL, κάτω δεξιός λοβός, ML, μέσος λοβός, RML, δεξί τμήμα μέσου λοβού, LML, αριστερό τμήμα μέσου λοβού, LLL, αριστερός πλάγιος λοβός, MF, μέση σχισμή, LF, αριστερή σχισμή, RF, δεξιά

σχισμή, και FL, δρεπανοειδής σύνδεσμος, PV, πυλαία φλέβα, και IVC, κάτω κοίλη φλέβα.

3. Ηπατική αιμάτωση

Η αιμάτωση του ήπατος προέρχεται από την ιδίως ηπατική αρτηρία και από την πυλαία φλέβα. Η ιδίως ηπατική αρτηρία με πλάτος 0.2 έως 0.5 χιλιοστά και μήκος 4 έως 5 χιλιοστά διατρέχει την πρόσθια επιφάνεια της πυλαίας φλέβας και στο επίπεδο της πύλης του ήπατος διαχωρίζεται σε αριστερή και δεξιά ηπατική αρτηρία. Οι αρτηριακοί κλάδοι διατρέχουν την πρόσθια επιφάνεια της πυλαίας φλέβας και όπισθεν των χοληφόρων πόρων, περνούν πίσω από του ηπατικούς χοληφόρους πόρους και ακολουθούν πορεία παράλληλη με τους κλάδους της πυλαίας φλέβας καθώς διαιρούνται στις κύριες λοβιακές διακλαδώσεις. Κάποιες φορές δύο λοβιακές αρτηρίες συνοδεύουν ένα λοβιακό κλάδο της πυλαίας. Από την άλλη πλευρά η πυλαία φλέβα με μήκος 4 έως 7 χιλιοστά και διάμετρο 2 έως 4 χιλιοστά εξωηπατικά εντοπίζεται όπισθεν και πλαγίως της ηπατικής αρτηρίας και των χοληφόρων πόρων^[144]. Η πυλαία χωρίζεται σε τρεις κύριους κλάδους που ακολουθούν τις ηπατικές σχισμές (αριστερή, δεξιά και κύρια). Ο πρώτος κλάδος της πυλαίας παρέχει αιμάτωση στο δεξιό λοβό, έπειτα στον κερκοφόρο, στο μέσο και τέλος στον αριστερό πλάγιο λοβό. Όλοι οι λοβοί περιέχουν έναν κλάδο της πυλαίας εκτός από το μέσο λοβό που φέρει δύο κλάδους. Τέλος η ηπατική απορροή μέσω των ηπατικών φλεβών στην συστηματική κυκλοφορία πραγματοποιείται με ένα κλάδο στην περίπτωση του δεξιού άνω και κάτω λοβού, ο μέσος λοβός με τρεις φλέβες (δεξιά, μέση και αριστερή φλέβα), η αριστερή φλέβα του μέσου λοβού μπορεί να ενώνεται με τη φλέβα που είναι υπεύθυνη για την απορροή του αριστερού λοβού και κατά συνέχεια να απορρέουν στην κάτω κοίλη φλέβα σε επίπεδο άνωθεν του ήπατος. Συνήθως όμως το αριστερό τμήμα του ήπατος και ο κερκοφόρος απορρέουν στην συστηματική κυκλοφορία μέσω δύο μεγάλων ηπατικών φλεβών. Κλείνοντας να σημειώσουμε πως η απόφυση του κερκοφόρου λοβού απορρέει στην συστηματική κυκλοφορία μέσω πολλαπλών κλάδων στην ενδοηπατική μοίρα της κάτω κοίλης φλέβας.

B. Πρόκληση Οξείας Ηπατικής Βλάβης

Η φαρμακευτική βλάβη στο πρωτόκολλο μας προκλήθηκε με τη χρήση παρακεταμόλης. Στόχος του πειράματος μας ήταν να χορηγήσουμε δόση APAP ικανή να προκαλέσει ηπατική νέκρωση πλησίον του 50-60% σε ιστολογικό παρασκεύασμα. Σε μελέτες που εξετάζουν την τοξική ηπατική βλάβη παρατηρήσαμε μεγάλες διαφοροποιήσεις όσο αφορά τα επίπεδα της παρακεταμόλης για την επαγωγή οξείας ηπατικής ανεπάρκειας με τιμές που κυμαίνονταν από 300 έως 1000 mg/kg τόσο σε μοντέλα *in vitro* όσο και *in vivo*^[145-147, 149,150]. Εξαιτίας αυτών των σημαντικών αποκλίσεων και με γνωστή την ανθεκτικότητα των αρουραίων στην τοξική βλάβη αποφασίσαμε να εκθέσουμε 4 ομάδες πειραματόζων, με τρία άτομα η κάθε ομάδα, σε τέσσερις διαφορετικές δόσεις παρακεταμόλης και να μελετήσουμε ιστολογικά την έκταση της ηπατικής βλάβης. Οι τέσσερις δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 500mg/kg, 1000mg/kg, 1500mg/kg και 2000mg/kg και οι αρουραίοι θανατώθηκαν τη 2^η ημέρα μετά τη χορήγηση της παρακεταμόλης ενώ το ήπαρ εξετάστηκε ιστολογικά όπου η έκταση της νέκρωσης αξιολογήθηκε ως μαζική όταν καταλάμβανε πλέον του 60% του κάθε ηπατικού λοβίου, εντοπιζόμενη κεντρολοβιακά με επέκταση προς την περιφέρεια αυτού. Βασισμένοι στα ιστολογικά αποτελέσματα που προέκυψαν καταλήξαμε πως η δοσολογία των 2000mg/kg επιτυγχάνει την έκταση της ηπατικής βλάβης που επιθυμούμε. Με δεδομένο πως το σωματικό βάρος των αρουραίων του πειράματος μας ήταν κατά μέσο όρο 250 χιλιοστόγραμμα η χορήγηση από του στόματος 500mg παρακεταμόλης ανταποκρινόταν στην απαιτούμενη ποσότητα που είχαμε θέσει ως στόχο. Οφείλουμε να σημειώσουμε πως η ανωτέρω δόση πριν τη χορήγησή της διαλύθηκε σε 4ml φυσιολογικού όρου και δόθηκε με τη χρήση σύριγγας των 5ml. Το όριο των 5ml βασίζεται στη μέγιστη χωρητικότητα του στομάχου των αρουραίων wistar που αντιστοιχεί στον ανωτέρω όγκο.

Οι ομάδες που χρησιμοποιήσαμε για την πρόκληση της ηπατικής βλάβης ήταν 6 όπως αναφέρεται παραπάνω (Βλέπε Σκοπός Μελέτης). Από αυτές

μόνο η ομάδα η δεύτερη ομάδα (B sham) δεν εκτέθηκε στα τοξικά επίπεδα παρακεταμόλης. Στη συνέχεια τα πειραματόζωα της πρώτης ομάδας (A control) όσο και της δεύτερης θανατώθηκαν σε καθορισμένες ημέρες όμως τα πειραματόζωα των ομάδων C,D,E και F υποβλήθηκαν σε χορήγηση βλαστικών κυττάρων όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

Γ. Απομόνωση και καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων λιπώδους ιστού από αρουραίους

Συλλέχθηκε λιπώδης ιστός από αρσενικούς αρουραίους και μεταφέρθηκε άμεσα στο εργαστήριο στους 40°C. Ο ιστός υποβλήθηκε σε πλύσεις με φωσφορικό διάλυμα (PBS), τεμαχίστηκε με τη χρήση δύο λεπίδων και ακολούθησε η κατεργασία του με κολλαγενάση (1mg/dl DMEM)για 30 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια ο κατεργασμένος ιστός υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση (200 g για 5 λεπτά) για να αποβληθεί το υπερκείμενο υγρό και το στερεό διήθημα τοποθετήθηκε πάλι σε διάλυμα με DMEM/10% FBS/1% penicillin/streptomycin το οποίο μεταφέρθηκε σε ασκό καλλιέργειας. Μετά από ολονύχτια επώαση το διάλυμα αντικαταστάθηκε ώστε να αφαιρεθούν τα μη προσκολλημένα κύτταρα ενώ όσα κύτταρα ήταν προσκολλημένα καλλιεργήθηκαν περαιτέρω στο ίδιο διάλυμα που αναφέρθηκε ανωτέρω.

Δ. Χορήγηση Βλαστικών κυττάρων Λιπώδους Ιστού

Απομονωμένα βλαστικά κύτταρα λιπώδους χορηγήθηκαν σε θηλυκούς αρουραίους ως ισομοσχεύματα. Τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν με τη χρήση σεβοφλουρανίου, Sevoflurane Abbvie 100% W/W. Τα επίπεδα του αναισθητικού παράγοντα προσαρμόστηκαν στα κατώτερα δυνατά επίπεδα, 8% για την επαγωγή της αναισθησίας και 2% για τη διατήρησή της, σε σύγκριση με τα ισχύοντα πρωτόκολλα αναισθησίας που εφαρμόζονται σε αρουραίους εξαιτίας της σοβαρής πνευμονικής βλάβης

που είχαν υποστεί τα πειραματόζωα από την έκθεση τους στη τοξική δόση της παρακεταμόλης. Μετά την πρόκληση της αναισθησίας ακολούθησε πρόσθια μέση υπερυπομφάλια τομή και στη συνέχεια κινητοποιήθηκαν οι ηπατικοί λοβοί καθώς και η πυλαία φλέβα. Κατόπιν ακολούθησε η χορήγηση των βλαστικών κυττάρων είτε ενδοφλέβια στην πυλαία φλέβα είτε απευθείας στους ηπατικούς λοβούς. Τα βλαστικά κύτταρα περιέχονταν σε διάλυμα φυσιολογικού ορού, 0,6 ml για τα 1×10^6 ADSCs και 1,2 ml για τα 2×10^6 ADSCs. Επιμελής αιμόσταση και σύγκλειση του κοιλιακού τοιχώματος ολοκλήρωσε τη χειρουργική επέμβαση διάρκειας 15 λεπτών. Ακολούθησε η αφύπνιση των αρουραίων και η αποσωλήνωση τους.

Ε. Διατήρηση πειραματόζωων και ευθανασία

Οι αρουραίοι Wistar επιβίωσαν μετεγχειρητικά, με εξαίρεση σε δύο περιπτώσεις, και η περίοδος ανάρρωσης ήταν ομαλή. Τα πειραματόζωα θανατώθηκαν την 4^η, 7^η και 15^η μέρα μετά τη χορήγηση των κυττάρων. Για την ευθανασία χορηγήθηκαν 200mg πεντοβαρβιτάλης σε κάθε αρουραίο, κατευθείαν στον καρδιακό μυ. Η κοιλιακή τομή διανοίχθηκε δέκα λεπτά μετά τη χορήγηση της θανατηφόρου δόσης και συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από την κάτω κοίλη φλέβα καθώς και το ήπαρ. Ο ηπατικός ιστός διαιρέθηκε σε μικρότερα δείγματα και διατηρήθηκε ισομερώς είτε σε διάλυμα φορμόλη είτε σε υγρό άζωτο στους -80° C.

ΣΤ. Ιστολογική Παρασκευή

Ο ηπατικός ιστός που διατηρήθηκε στη φορμόλη στη συνέχεια καθηλώθηκε και εντυπώθηκε σε τεμάχια παραφίνης και έπειτα χρησιμοποιήθηκε χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης. Η αξιολόγηση της έκτασης της ηπατικής βλάβης πραγματοποιήθηκε με ένα τετραβάθμιο σύστημα βαθμολόγησης αυξανόμενης ιστολογικής βαρύτητας. Τα τέσσερα

επίπεδα ιστολογικής βλάβης περιλαμβάνουν την δημιουργία κενοτοπίων στα ηπατικά κύτταρα (1^ο στάδιο βαρύτητας), φλεγμονή (2^ο στάδιο), ηπατική συμφόρηση (3^ο στάδιο) και ηπατική νέκρωση (4^ο στάδιο).

Z. Ανίχνευση των βλαστικών κυττάρων λιπώδους ιστού με υβριδοποίηση in situ (FISH)

Η ανάλυση με τη χρήση in situ υβριδοποίησης πραγματοποιήθηκε σε τομές των 4μm και αφορούσε ηπατικό ιστό που είχε διατηρηθεί σε φορμόλη και κατόπιν μονιμοποιήθηκε και εντυπώθηκε σε παραφίνη. Η παραφίνη αφαιρέθηκε από τις τομές των 4μm με χρήση ξυλίνης και ενυδατώθηκαν σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις αιθανόλης καθώς και αποσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια τα δείγματα στέγνωσαν με την έκθεση τους στον αέρα. Έπειτα τα δείγματα εμποτίστηκαν σε προετοιμασμένο διάλυμα κιτρικού νατρίου (2XSSC) σε pH 7.0 για δύο λεπτά στους 73^ο C. Διάλυμα πεψίνης (Zygotonvision) χρησιμοποιήθηκε στις τομές του ιστού και επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 37^ο C. Στη συνέχεια οι τομές του ιστού εκπλύθηκαν για 5 λεπτά σε φωσφορικό διάλυμα και καθηλώθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 1% σε πραγματικό χρόνο. Επακόλουθα, οι τομές του ιστού εκπλύθηκαν με φωσφορικό διάλυμα που περιείχε μερικές σταγόνες 1M γλυκίνης, με pH 8.5 για 5 λεπτά και ακολούθησε αφυδάτωση του ιστού σε διάλυμα αιθανόλης αυξανόμενης πυκνότητας, 70%, 85% και 100% για 1 λεπτό σε πραγματικό χρόνο. Ο ανιχνευτής του χρωμοσώματος Y για αρουραίους, Green Label IDYE TM - 495 αναμίχθηκε με το διάλυμα υβριδισμού (ID LabsTM inc). Δέκα μl του αραιωμένου ανιχνευτή εφαρμόστηκαν στις τομές του ιστού οι οποίες στη συνέχεια καλύφθηκαν με τετράγωνο τμήμα γυαλιού 22X22mm, αεροστεγώς με τη χρήση ελαστικού τσιμέντου. Έπειτα οι καλυμμένες με γυαλί τομές που περιέχουν τον ανιχνευτή μετουσιώνονται σε διάλυμα DAKO Hybridizer για 5 λεπτά στους 69^ο C και ακολουθεί υβριδοποίηση για 16 ώρες στους 37^ο C. Το ελαστικό τσιμέντο αφαιρέθηκε από τις τομές την επόμενη ημέρα και ο ιστός εμβαπτίστηκε σε διάλυμα κιτρικού νατρίου

μέχρι την αποκόλληση του γυάλινου καλύμματος. Πλύσεις μετά την υβριδοποίηση περιλαμβάνουν προθερμασμένο διάλυμα 0.4xSSC/0.3% Ipegal (Sigma) στους 73⁰ C για 2 λεπτά και διάλυμα 2xSSC/0.1% Ipegal για 1 λεπτό σε πραγματικό χρόνο. Ακολούθησε η σύντομη έκπλυση των τομών του ιστού με αποσταγμένο ύδωρ, αφέθηκαν να στεγνώσουν και τοποθετήθηκαν σε Vectashield/DAPI (Vector Laboratories).

H. Ανοσοϊστοχημεία του Ηπατικού Αυξητικού Παράγοντα (HGF)

Η ανοσοϊστοχημεία (IHC) εφαρμόστηκε σε τομές ιστού των 4μm από ήπαρ αρουραίου ο οποίος είχε καθηλωθεί σε φορμόλη και εντυπωθεί σε παραφίνη. Εφαρμόστηκε η τεχνική των δύο βημάτων με τη χρήση πολυμερούς συμπλέγματος υπεροξειδάσης (DAKO Envision kit, DAKO, Carpinteria, CA). Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του παράγοντα HGF (catalog number 83760, abcam, Cambridge, MA, USA) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του σε ηπατικό ιστό αρουραίου. Η μέθοδος της ανίχνευσης του αντιγόνου περιλάμβανε διάλυμα κιτρικού, pH 9, ενώ ο λόγος της αραιώσης ήταν 1:50 για την (IHC) και ο χρόνος επώασης μία ώρα. Η ημιποσοτική μέθοδος μέτρησης του συμπλέγματος HGF-Ab anti-HGF χρησιμοποιήθηκε και η βαθμονόμηση της έντασης του σήματος στην ανοσοϊστοχημεία με μίας τετραβάθμιας κλίμακας (μικρή ένταση=1, μέτρια ένταση=2, μεγάλη ένταση=3 και πολύ μεγάλη ένταση=4).

Θ. Εξαγωγή RNA και χρήση της αναστροφής μεταγραφάσης με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (RT-PCR) στην μελέτη των παραγόντων: HGF και HNF4a.

Η εξαγωγή του συνολικού RNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το NucleoSpin® RNA Plus (from Macherey –Nagel). Η συγκέντρωση του RNA και η ποιότητα αυτού καθορίστηκε με το φασματογράφο NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer. Συνολικό RNA 250ng μετατράπηκε σε cDNA με τη χρήση του αντιδραστηρίου Superscript II RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, CA). Η έκφραση των γονιδίων, ηπατικός αυξητικός παράγοντας (HGF) και ηπατικός πυρηνικός παράγοντας 4α (HNF4a), που σχετίζονται με την ηπατική αναγέννηση καθορίστηκε με βάση τη σχετική έκφραση του mRNA των ανωτέρω γονιδίων με τη χρήση της RT-PCR στο σύστημα LightCycler® 480 System (Roche Diagnostics GmbH, Germany) χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Maxima® SYBR Green/ROX (Fermentas).

Κάθε μίγμα εκκινητή περιείχε 1μL cDNA, 200 nmol/μl εκκινητή, 10μl Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix και την PCR προσαρμοσμένη σε συνολικό διάλυμα των 20μl. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν στον LightCycler 480 ήταν ένας αρχικός κύκλος στους 95⁰ C για 10 λεπτά και ακολούθησαν 90 κύκλοι στους 95⁰ C για 15 δευτερόλεπτα, ανεβάζοντας τη θερμοκρασία από τους 61⁰ C στους 72⁰ C για 30 δευτερόλεπτα και έναν κύκλο στους 95⁰ C για ένα λεπτό. Τα δείγματα για τους ανωτέρω παράγοντες ήταν διπλά για κάθε πειραματόζωο και η μέση διάρκεια διπλασιασμού του cDNA με τη χρήση της PCR υπολογίστηκαν. Ένας κατάλληλος ενδογενής έλεγχος με το γονίδιο GAPDH επιλέχθηκε με βάση τη βιβλιογραφία ((Grozdanov et al. 2006), (Bae et al. 2008)). Η καθορισμένη καμπύλη δεκαπλάσιας διάλυσης (από 1/10 σε 1/10000) χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογήσουμε την ικανότητα της PCR με αποτέλεσμα αποδεκτές τιμές στην ανωτέρω καμπύλη που κυμαίνονταν από -3,400 έως -3,506 για τα υπό εξέταση γονίδια. Η δεξαμενή δειγμάτων που περιείχε πειραματόζωα που δεν είχαν υποστεί μεταμόσχευση με

βλαστικά κύτταρα στον ηπατικό ιστό προετοιμάστηκαν και περιλάμβαναν όλα τα άτομα κάθε υποκατηγορίας που ορίστηκε σε σχέση με τη χρονική στιγμή από την ηπατική μεταμόσχευση. Τρεις ομάδες δειγμάτων προετοιμάστηκαν συνολικά (κατηγορία για τις 4 ημέρες, για τις 7 ημέρες και τις 15 ημέρες) και κάθε δείγμα αναλύθηκε με τη χρονικά σχετιζόμενη ομάδα που προαναφέρθηκε ως ομάδα ελέγχου. Η σχετική έκφραση των γονιδίων στη συνέχεια αξιολογήθηκε με το λογισμικό LightCycler® 480 Software, Version 1.5 (Roche Diagnostics). Οι ακολουθίες των γονιδίων και των ειδικών εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για τα δείγματά μας είναι τα ακόλουθα: Ηπατικός αυξητικός παράγοντας (HGF), Forward 5' CCCTATTTCCCGTTGTGAAGGA 3', Reverse 5' ACCATCCACCCTACTGTTGTTT 3' και για τον ηπατικό πυρηνικό παράγοντα 4α (HNF4a), HNF4A, Forward 5' AGGATGAAGAAGTTGCCCCC 3', Reverse 5' GATGTGTCTGGTGGGTCCTG 3'.

I. Στατιστική Ανάλυση

Η χρήση των δοκιμασιών, όπως των Kolmogorov-Smirnov, για την διακρίβωση της πιθανότητας κανονικής κατανομής των δεδομένων μας απέδειξε πως τα αποτελέσματα μας δεν εντάσσονται στην ανωτέρω κατανομή. Συνεπώς, για τη στατιστική ανάλυση εφαρμόστηκαν μη παραμετρικές δοκιμασίες, Kruskal-Wallis και Mann-Whitney. Επιπρόσθετα, οι μεταβλητές ήταν μετρήσιμες σε ακέραιες τιμές και η διόρθωση Bonferroni χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση των δεδομένων. Επιπλέον, τα δεδομένα αναλύθηκαν με το λογισμικό SPSS έκδοση 17. Τέλος, ως στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ορίστηκαν εκείνα με τιμή $p < 0.05$.

Αποτελέσματα

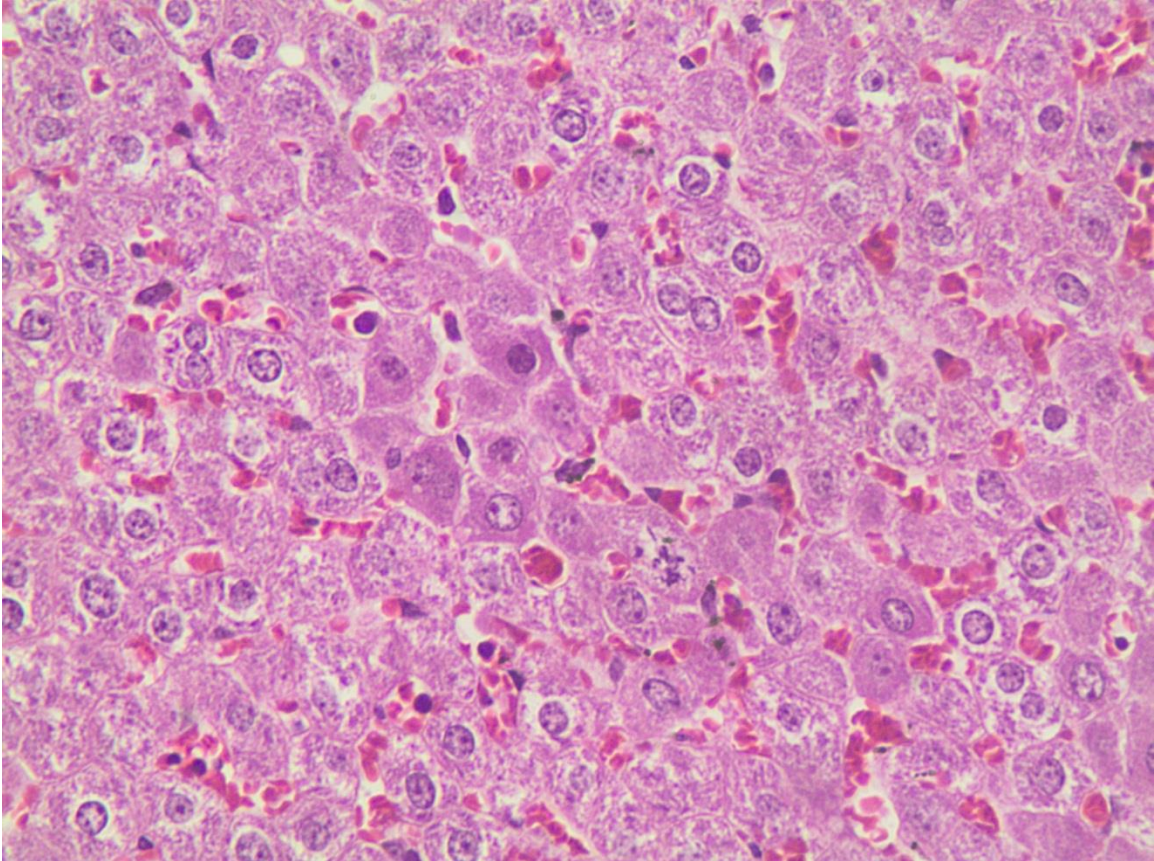
Ιστολογική εκτίμηση

Τα ιστολογικά παρασκευάσματα ήπατος που τοποθετήθηκαν σε παραφίνη και υπεβλήθησαν σε αδρή ιστολογική ανάλυση με σκοπό την εκτίμηση της ηπατικής βλάβης. Είχε προηγηθεί η χρώση τους με αιματοξυλίνη-εωσίνη. Η έκταση της βλάβης αξιολογήθηκε με ένα τετραβάθμιο σύστημα βαθμονόμησης όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι. Η στατιστική ανάλυση που ακολούθησε τονίζει τη βελτίωση σε σημαντικό βαθμό της ηπατικής συμφόρησης της ομάδας C, 1×10^6 ADSCs IV, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου A μετά την πρόκληση της ηπατικής βλάβης, ($p=0.015$) (Εικόνα 1). Εξίσου σημαντική ήταν η ελάττωση της ηπατικής συμφόρησης και για τις υπόλοιπες ομάδες D (2×10^6 ADSCs IV), E (1×10^6 ADSCs IH) και F (2×10^6 ADSCs IH) που μεταμοσχεύθηκαν με βλαστικά κύτταρα σε σχέση με την ομάδα A ($p<0.001$ για όλες τις ομάδες).

Επίσης, η ένταση της φλεγμονής μετά τη χορήγηση παρακεταμόλης και την πρόκληση οξείας ηπατικής ανεπάρκειας (AHI) μειώνεται σημαντικά τόσο για το ενδοφλέβιο (IV) όσο και για το ενδοηπατικό (IH) σκέλος του πειράματος. Μάλιστα η μείωση της φλεγμονής είναι μεγαλύτερης έκτασης στο ενδοηπατικό σκέλος του πειράματος σε σχέση με το ενδοφλέβιο. Ειδικότερα, οι ομάδες E (1×10^6 IH) και F (2×10^6 IH) επηρεάζονται από την φλεγμονώδη αντίδραση σε μικρότερο βαθμό έναντι της ομάδας D (2×10^6 IV) μετά την πρόκληση της AHI, ($p=0.007$ ομάδα E vs D και $p<0.001$ ομάδα F vs D αντίστοιχα) (Εικόνα 2). Επιπρόσθετα, η ομάδα F καταγράφει μικρότερης έκτασης φλεγμονή σε σύγκριση με την ομάδα C (1×10^6 IV), ($p=0.016$), ενώ παράλληλα δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στην ένταση της φλεγμονής μεταξύ των ομάδων C και E.

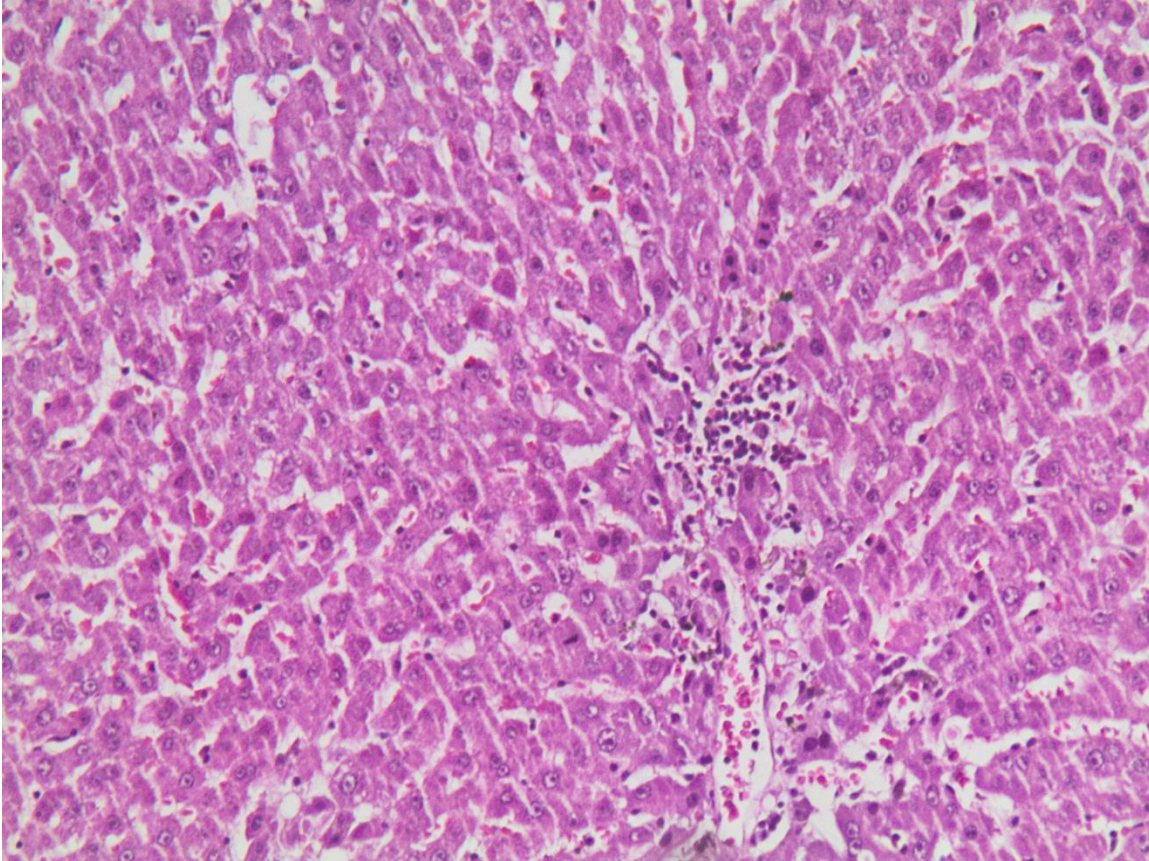
Εικόνα 1

Ιστοπαθολογική εκτίμηση ηπατικού ιστού από την ομάδα C με χρώση αιματοξυλίνης εωσίνης. Μέτρια διάταση των κολπωδών τριχοειδών και την ηπατική συμφόρηση εμφανή (Μεγέθυνση, X200).



Εικόνα 2

Ιστοπαθολογική εκτίμηση ηπατικού ιστού από την ομάδα D με χρώση αιματοξυλίνης εωσίνης. Παρατηρείται ήπια χρόνια φλεγμονή (Μεγέθυνση, X200).

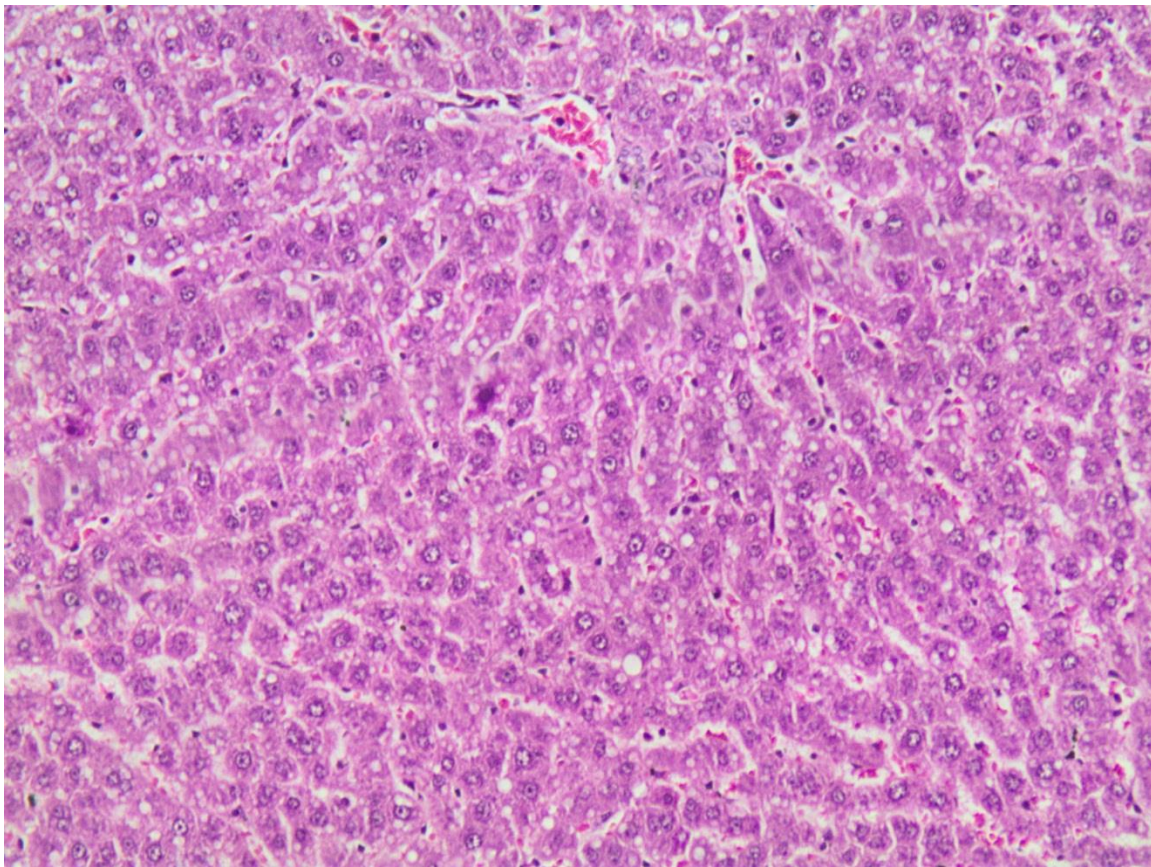


Ακόμα εξετάστηκε η κρίσιμη παράμετρος του χρόνου σε σχέση με την πορεία της ηπατικής βλάβης καθώς και αν επιδρά σημαντικά στη βελτίωση της τελευταίας. Πράγματι τόσο η φλεγμονή όσο και δημιουργία κυτταρικών κενотоπίων (Εικόνα 3) μειώνεται σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο μεταξύ της 4^{ης} και 7^{ης} ημέρας από την πρόκληση της βλάβης, $p=0.015$ και $p<0.001$ αντίστοιχα. Όσο αφορά τη μαζική νέκρωση (Εικόνα 4) η ηπατική ανάνηψη επιτυγχάνεται μεταξύ της 7^{ης} και της 15^{ης} ημέρας μετά την πρόκληση της AHI. Όλα αυτά τα ευρήματα συγκλίνουν στην άποψη ότι

η μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων συμβάλλει καθοριστικά στην αναστροφή της ηπατικής βλάβης.

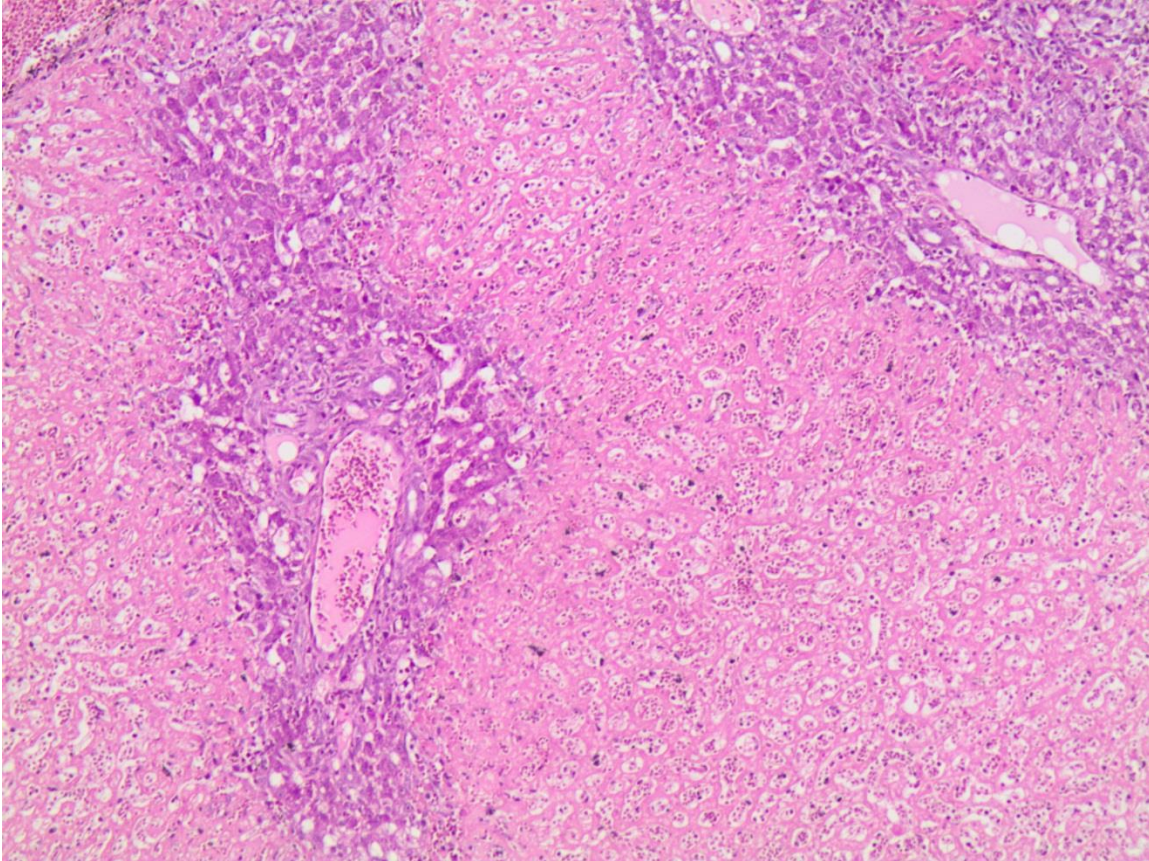
Εικόνα 3

Ιστοπαθολογική εκτίμηση ηπατικού ιστού από την ομάδα D με χρώση αιματοξυλίνης εωσίνης. Παρατηρείται η παρουσία άφθονων κυτταρικών κενотоπίων (Μεγέθυνση, Χ200).



Εικόνα 4

Ιστοπαθολογική εκτίμηση ηπατικού ιστού από την ομάδα F με χρώση αιματοξυλίνης εωσίνης. Εκτεταμένη νέκρωση είναι προεξάρχουσα μεταξύ των δύο πυλαίων τριάδων (Μεγέθυνση, Χ200).

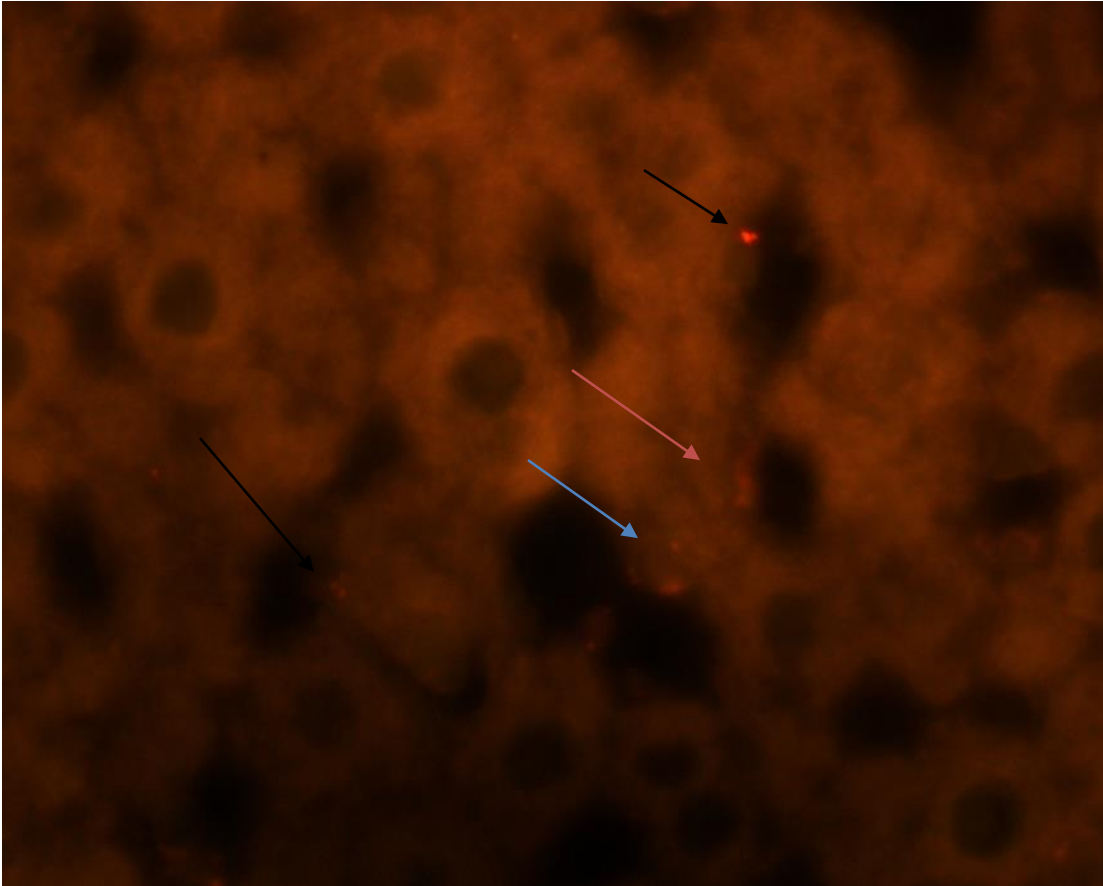


Υβριδισμός In Situ (FISH)

Ο εντοπισμός των μεταμοσχευμένων βλαστικών κυττάρων στο ηπατικό παρέγχυμα των πειραματόζων διενεργήθηκε με τη βοήθεια της υβριδοποίησης για την ανίχνευση του χρωμοσώματος Υ των ADSCs. Με την εφαρμογή της μεθόδου ανιχνεύσαμε τη θέση των μεταμοσχευμένων κυττάρων μεταξύ των ώριμων ηπατοκυττάρων όπως καταδεικνύουν οι εικόνες 5 και 6 παρακάτω.

Εικόνα 5

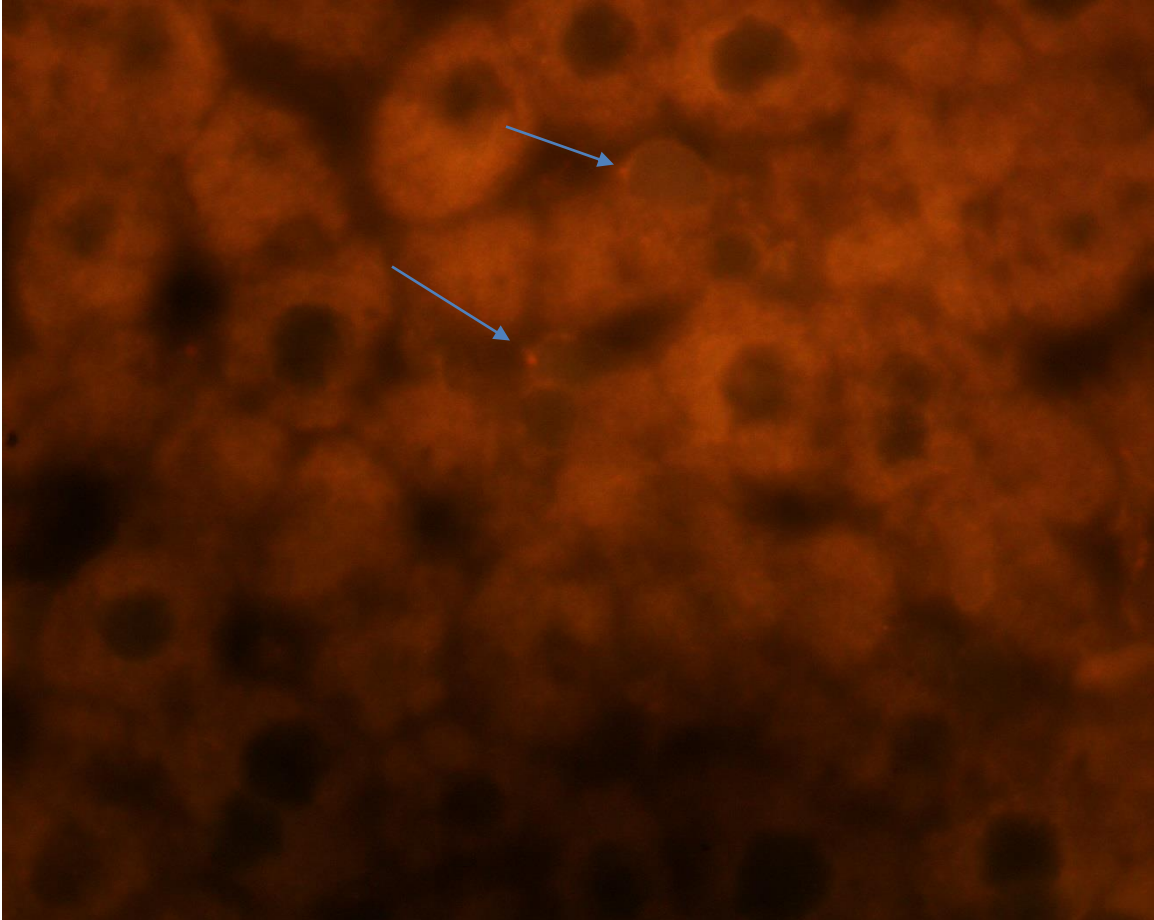
Ταυτοποίηση ADSCs στο ηπατικό παρέγχυμα με τη χρήση της μεθόδου FISH. Τα μαύρα βέλη καταδεικνύουν τα βλαστικά κύτταρα μεταξύ των ώριμων ηπατοκυττάρων. Το μπλε και κόκκινο βέλος δείχνουν τις μορφολογικές διαφορές μεταξύ των μεταμοσχευμένων κυττάρων, ωοειδή έναντι σπειροειδών αντίστοιχα.



Επίσης, το σχήμα και το μέγεθος των βλαστικών κυττάρων διαφέρει ξεκινώντας από μικρά κύτταρα με σπειροειδές σχήμα έως μεγαλύτερου μεγέθους και ωοειδούς μορφολογίας ADSCs (Εικόνα 6). Σε επόμενη παράγραφο εξετάζεται η ανωτέρω παρατήρηση καθώς και αν σχετίζεται με την ηπατική διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων. Τέλος η παρουσία βλαστικών κυττάρων υποστηρίζει περαιτέρω τη θέση πως τα ADSCs συμμετέχουν στην ιστολογική βελτίωση της ηπατικής βλάβης που αναλύσαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Εικόνα 6

Ταυτοποίηση ADSCs στο ηπατικό παρέγχυμα με τη χρήση της μεθόδου FISH. Τα μπλε βέλη δείχνουν ADSCs με ωσειδή μορφολογία.

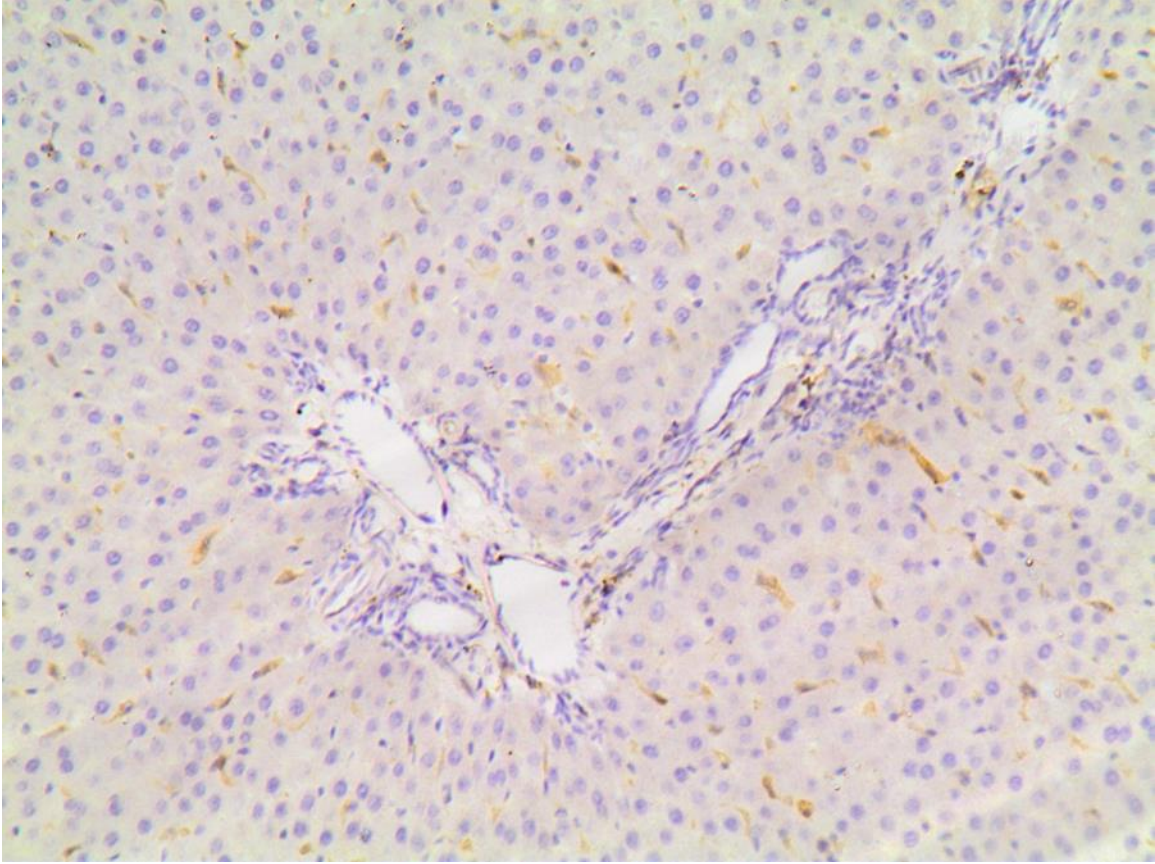


Ανοσοϊστοχημεία του ηπατικού αυξητικού παράγοντα (HGF)

Τα δείγματα ηπατικού ιστού που είχαν διατηρηθεί σε κύβους παραφίνης χρησιμοποιήθηκαν για τη διενέργεια της ανοσοϊστοχημικής μελέτης. Ο HGF αποτελεί έναν ευρέως γνωστό ηπατοτροφικό παράγοντα που διαδραματίζει κεντρικό ρόλο τόσο στο σκέλος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όσο και στην ηπατική διαφοροποίηση στα πλαίσια της ηπατικής αναγέννησης. Αυξημένα επίπεδα του ανωτέρω παράγοντα καταγράφηκαν μετά τη μεταμόσχευση των βλαστικών κυττάρων (ADSCs) (Εικόνα 7 και 8).

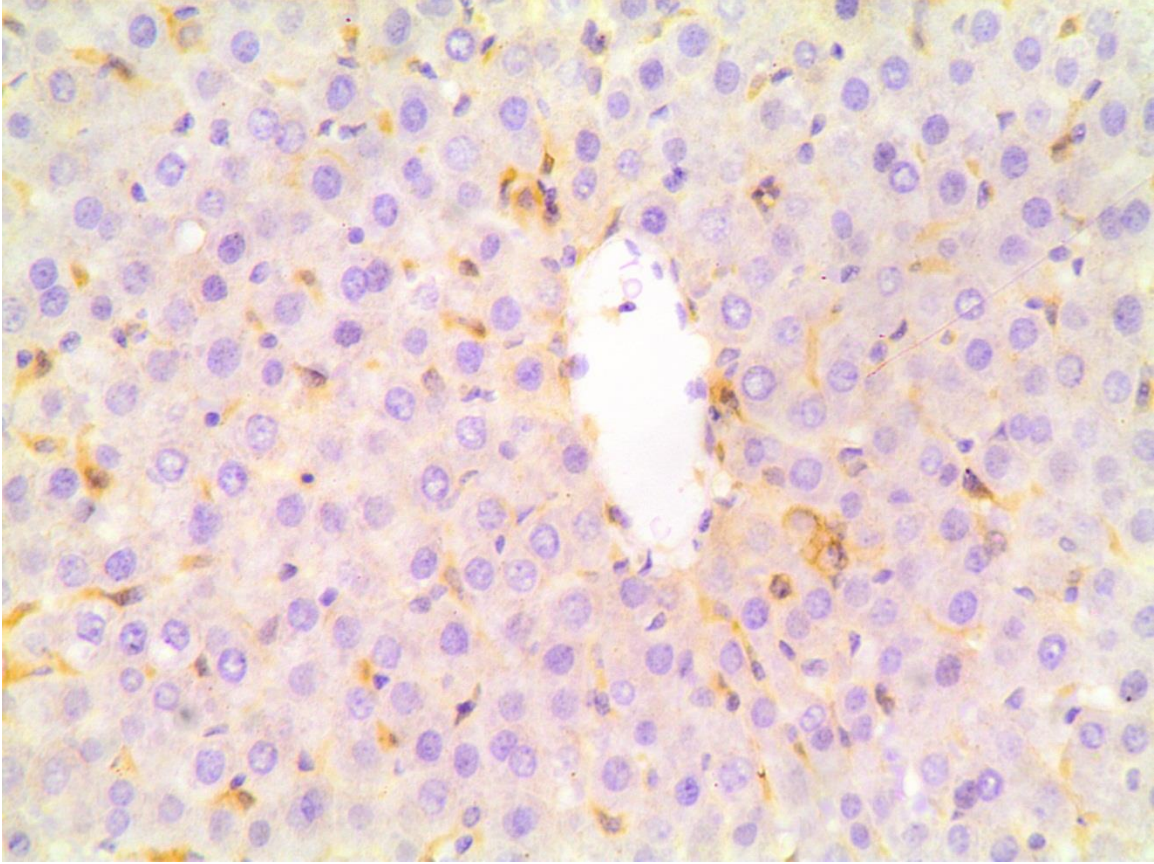
Εικόνα 7

Μοτίβο ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον παράγοντα HGF στον ηπατικό ιστό καταδεικνύει έντονα ανοσοθετική αντίδραση γύρω από την πυλαία τριάδα (Μεγέθυνση, X200).



Εικόνα 8

Μοτίβο ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον παράγοντα HGF στον ηπατικό ιστό καταδεικνύει έντονα ανοσοθετική αντίδραση γύρω από την κεντρική φλέβα του ηπατικού λοβίου (Μεγέθυνση, X400).



Οφείλουμε να τονίσουμε πως η διαφορά των επιπέδων του HGF που καταγράφηκαν μεταξύ της ομάδας ελέγχου (group A) και των ομάδων που χορηγήθηκαν τα βλαστικά κύτταρα του λιπώδους ιστού, ομάδες C,D,E και F ήταν στατιστικά σημαντική ($P < 0.001$) ανεξάρτητα από το χρόνο και την οδό χορήγησης (ενδοφλέβια ή ενδοηπατικά). Μάλιστα ακόμα και με τον υπολογισμό της διόρθωσης Bonferroni οπότε και η τιμή του P τέθηκε από το 0.05 στο 0.01 τα ευρήματά μας διατηρούν τη στατιστική σημαντικότητά τους (βλέπε Πίνακα 1).

Πίνακας 1

Τα επίπεδα του HGF ήταν υψηλότερα για τις ομάδες C, D, E και F σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ομάδα A. Η στατιστική σημαντικότητα είναι ισχυρή $p < 0.001$ και ανεξάρτητη του χρόνου και της οδού χορήγησης.

	Ανεξάρτητα χρόνου και οδού χορήγησης				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	Control	IV	IH
Sham	0,80	,77	1,00	1,00	0,305	<0,001	<0,001
Control	1,07	,46	1,00	,00	---	<0,001	<0,001
IV	2,39	,86	2,00	1,00	---	---	0.841
IH	2,37	1,08	2,00	2,00	---	---	---
	p-value < 0,001						

Επιπρόσθετα οι τέσσερις ομάδες που μεταμοσχεύθηκαν με βλαστικά κύτταρα διατήρησαν στατιστικά υψηλότερα επίπεδα του παράγοντα HGF σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($P < 0.001$) ανεξάρτητα του χρόνου και της ποσότητας των ADSCs που μεταμοσχεύθηκαν όπως καταγράφεται στον Πίνακα 2. Επιπλέον, η ποσότητα του HGF παρουσιάζει μικρές διαφορές μεταξύ των μεταμοσχευμένων ομάδων σε σχέση με την οδό χορήγησης, ενδοφλέβια έναντι ενδοηπατικής, $P = 0.841$ (Πίνακας 1). Παρόμοια η ποσότητα των χορηγούμενων βλαστικών κυττάρων, 1×10^6 έναντι 2×10^6 ADSCs, δε συμβάλλει στην στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων

HGF ανάμεσα στις ομάδες που έλαβαν τα ADSCs, P=0.498 (Πίνακας 2). Τα ανωτέρω αποτελέσματα τονίζουν το σημαντικό ρόλο των ADSCs ως πηγής υψηλότερων επιπέδων αυτού του ηπατοτροφικού παράγοντα κατά τη διάρκεια της ηπατικής αναγέννησης μεταξύ των μεταμοσχευμένων ομάδων.

Πίνακας 2

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ομάδες ($p < 0.001$) σε σχέση με την μεταβλητή HGF ανεξάρτητα χρόνου και ποσότητας. Πολλαπλές συγκρίσεις καταδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Control με τις ομάδες 1×10^6 ($p < 0,001$) και 2×10^6 ($p < 0,001$). Αν συνυπολογίσουμε και την διόρθωση Bonferroni τότε το επίπεδο σημαντικότητας από 0,05 γίνεται 0,01 και διατηρούνται οι προυπάρχουσες διαφορές.

	Ανεξάρτητα χρόνου και χορήγησης				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	Control	1×10^6	2×10^6
Sham	0,80	,77	1,00	1,00	0,305	<0,001	<0,001
Control	1,07	,46	1,00	,00	---	<0,001	<0,001
1×10^6	2,32	,86	2,00	1,00	---	---	0.498
2×10^6	2,45	1,08	3,00	1,00	---	---	---
	p-value< 0,001						

Η ποσότητα των βλαστικών κυττάρων, (1×10^6 και 2×10^6) μελετήθηκε ανεξαρτήτως του χρόνου. Οι απόλυτες τιμές των ομάδων C (1×10^6 ενδοφλέβια) και E (1×10^6 ενδοηπατικά) ήταν υψηλότερες έναντι της ομάδας ελέγχου A και η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.001$ για την ομάδα C έναντι της A και $p = 0.001$ για την ομάδα E έναντι της A) (βλέπε Πίνακα 3). Κατά αναλογία οι τιμές των ομάδων D (2×10^6 ενδοφλέβια) και F (2×10^6 ενδοηπατικά) ήταν σημαντικά υψηλότερες της ομάδας ελέγχου ($p = 0.001$ για την ομάδα D και $p < 0.001$ για την ομάδα F) (βλέπε Πίνακα 4). Επιπλέον, οφείλουμε να σημειώσουμε ότι δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων C και E όπως και μεταξύ των ομάδων D και F, ($p = 0.784$ και $p = 0.515$ αντίστοιχα) (βλέπε Πίνακες 3 και 4).

Ακολούθησε η μελέτη των ομάδων που μεταμοσχεύθηκαν με ADSCs σε σχέση με την οδό χορήγησης, ενδοφλέβια ή ενδοηπατική, και το χρόνο. Σε αυτή την ανάλυση τα επίπεδα του HGF ήταν υψηλότερα και στα δύο σκέλη του πειραματικού πρωτοκόλλου, ενδοφλέβιο και ενδοηπατικό, έναντι της ομάδας ελέγχου στο χρονικό σημείο των 4 ημερών (Πίνακας 5). Οι διαφορές στα επίπεδα του HGF είναι στατιστικά σημαντικές τόσο για την ενδοφλέβια χορήγηση ($p < 0.001$) όσο και για την ενδοηπατική ($p = 0.014$) (Πίνακας 5). Παράλληλα στο χρονικό σημείο των 15 ημερών οι διαφορές στα επίπεδα του ηπατοτροφικού παράγοντα είναι εξίσου σημαντικές για το ενδοφλέβιο και ενδοηπατικό σκέλος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.007$ και $p = 0.019$ αντίστοιχα) (Πίνακας 6). Σε αντιδιαστολή με τα προαναφερθέντα χρονικά σημεία στις 7 ημέρες δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, $p = 0.075$ τις ομάδες C και D έναντι της A και $p = 0.044$ για τις ομάδες E και F έναντι της A, (Πίνακας 7). Αυτή η διακύμανση των 7 ημερών αποδίδεται στην αυξημένη παραγωγή του HGF στην ομάδα ελέγχου ενώ τα επίπεδα του ανωτέρω παράγοντα παραμένουν σχεδόν ισοδύναμα αυξημένα σε όλα τα χρονικά σημεία στο ενδοφλέβιο και το ενδοηπατικό σκέλος (Πίνακας 7).

Πίνακας 3

Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ομάδες ($p < 0.001$) σε σχέση με την μεταβλητή HGF ανεξάρτητα χρόνου και ποσότητα 1×10^6 . Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Sham με τις ομάδες IV ($p < 0,001$) και IH ($p < 0,001$) και ανάμεσα στην ομάδα Control με τις ομάδες IV ($p < 0,001$) και IH ($p = 0,001$) .

	Ανεξάρτητα χρόνου ποσότητα 1×10^6				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	Control	IV	IH
Sham	0,80	,77	1,00	1,00	0,305	<0,001	<0,001
Control	1,07	,46	1,00	,00	---	<0,001	0,001
IV	2,25	,79	2,00	1,00	---	---	0.784
IH	2,39	1,08	2,00	2,25	---	---	---
	p-value <0,001						

Πίνακας 4

Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ομάδες ($p < 0.001$) σε σχέση με την μεταβλητή HGF ανεξάρτητα χρόνου και ποσότητα 2×10^6 . Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Sham με τις ομάδες IV ($p < 0,001$) και IH ($p < 0,001$) και ανάμεσα στην ομάδα Control με τις ομάδες IV ($p = 0,001$) και IH ($p < 0,001$).

	Ανεξάρτητα χρόνου ποσότητα 2×10^6				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	Control	IV	IH
Sham	0,80	,77	1,00	1,00	0,305	<0,001	<0,001
Control	1,07	,46	1,00	,00	---	0,001	<0,001
IV	2,56	0,92	3,00	1,00	---	---	0.515
IH	2,35	1,04	2,00	1,75	---	---	---
	p-value <0,001						

Πίνακας 5

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ομάδες ($p=0.002$) σε σχέση με την μεταβλητή HGF ανεξαρτητα ποσότητας 4 ημέρες. Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Sham με τις ομάδες IV ($p=0,014$) και IH ($p=0,048$) και ανάμεσα στην ομάδα Control με τις ομάδες IV ($p<0,001$) και IH ($p=0,014$)

	Ανεξάρτητα ποσότητας 4 ημέρες				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	Control	IV	IH
Sham	1,00	1,00	1,00	2,00	1,000	0,014	0,048
Control	1,00	,00	1,00	,00	---	<0,001	0,014
IV	2,42	,52	2,00	1,00	---	---	0.671
IH	2,25	,96	2,00	1,75	---	---	---
	p-value=0,002						

Πίνακας 6

Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ομάδες ($p=0.007$) σε σχέση με την μεταβλητή HGF ανεξαρτητα χορήγησης 15 ημέρες. Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Sham με τις ομάδες IV ($p=0,019$) με την IH ($p=0,064$ οριακά) ανάμεσα στην ομάδα Control με τις ομάδες IV ($p=0,007$) και IH ($p=0,019$) .

	Ανεξάρτητα ποσότητας 15 ημέρες				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	Control	IV	IH
Sham	1,00	,71	1,00	1,00	0,690	0,019	0,064
Control	0,80	,45	1,00	,50	---	0,007	0,019
IV	2,46	1,05	3,00	1,50	---	---	0.611
IH	2,25	1,21	2,00	2,75	---	---	---
	p-value= 0,007						

Πίνακας 7

Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ομάδες ($p=0.002$) σε σχέση με την μεταβλητή HGF ανεξαρτητα χορήγησης 7 ημέρες. Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Sham με τις ομάδες Control ($p=0,056$ οριακά) , IV ($p=0,002$) , IH ($p=0,001$) αλλά όχι ανάμεσα στην ομάδα Control με τις ομάδες IV ($p=0,075$ οριακά) και IH ($p=0,044$) .

	Ανεξάρτητα ποσότητας 7 ημέρες				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	Control	IV	IH
Sham	0,40	,55	,00	1,00	0,056	0,002	0,001
Control	1,40	,55	1,00	1,00	---	0,075	0,044
IV	2,31	0,95	2,00	1,50	---	---	0.519
IH	2,57	1,09	3,00	1,50	---	---	-
	p-value= 0,002						

Τέλος, συγκρίνουμε την οδό χορήγησης με την ποσότητα των βλαστικών κυττάρων στο χρονικό σημείο των 4, 7 και 15 ημερών. Η ανάλυση μας αποκαλύπτει πως στο η ενδοφλέβια χορήγηση προκαλεί υψηλά επίπεδα του HGF στις 4 ημέρες η οποία είναι στατιστικά σημαντική, $p=0.004$ για τις ομάδες C (1×10^6 IV) και D (2×10^6 IV) έναντι της ομάδας ελέγχου (ομάδα A) χωρίς όμως να παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων C και D ($p=0.699$) (Πίνακα 8). Από την άλλη πλευρά στο ενδοηπατικό σκέλος τα επίπεδα του HGF αυξάνονται πρώιμα στις 4 ημέρες και σε στατιστικά σημαντικό βαθμό έναντι της ομάδας ελέγχου μόνο για την μικρότερη ποσότητα βλαστικών κυττάρων (ομάδα E 1×10^6 IH) ($p=0.004$) ενώ για την ομάδα F (2×10^6 IH) η άνοδος των τιμών του HGF είναι μικρότερη ($p=0.177$) (Πίνακας 9). Στις 7 ημέρες οι διαφορές που παρατηρούνται τόσο στο ενδοφλέβιο όσο και στο ενδοηπατικό σκέλος σε σχέση με τη χορηγούμενη ποσότητα βλαστικών κυττάρων δεν παρουσιάζει ικανές στατιστικές διαφορές έναντι της ομάδας control ($p=0.268$ για την C, $p=0.052$ για την D, $p=0.052$ για την E και $p=0.127$ για την F) όπως καταγράφεται στους πίνακες 10 και 11. Τα αποτελέσματα αυτά δεν οφείλονται τόσο στην πτώση των επιπέδων του ηπατοτροφικού παράγοντα στις ομάδες των μεταμοσχευμένων κυττάρων όσο στη αύξηση των επιπέδων του HGF στην ομάδα ελέγχου (Πίνακες 10 και 11). Κλείνοντας, στις 15 ημέρες οι διαφορές των επιπέδων του HGF παραμένουν σημαντικές για την ομάδα C έναντι της A ($p=0.010$) και της F έναντι της A ($p=0.004$) ενώ για τις ομάδες D και E οι τιμές έναντι της ομάδας A δεν είναι σημαντικές ($p=0.052$ για την D και $p=0.247$ για την E) (Πίνακες 12 και 13). Θα πρέπει να σημειώσουμε πως τα επίπεδα της ομάδας F είναι σημαντικά υψηλότερα έναντι οποιασδήποτε άλλης ομάδας στις 15 ημέρες (Πίνακας 13) και αυτό αναλύεται διεξοδικότερα στη συζήτηση που θα ακολουθήσει μετά την ολοκλήρωση των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 8

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ομάδες ($p=0.003$) σε σχέση με την μεταβλητή HGF στις 4 ημέρες και χορήγηση IV. Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Sham με τις ομάδες C 1×10^6 IV ($p=0,052$) και D 2×10^6 IV ($p=0,030$) και ανάμεσα στην ομάδα Control με τις ομάδες C 1×10^6 IV ($p=0,004$) και D 2×10^6 IV ($p=0,004$).

	4 ημέρες και χορήγηση IV				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	Control	1×10^6	2×10^6
Sham	1,00	1,00	1,00	2,0	1.000	0.052	0.030
Control	1,00	,00	1,00	0,0	---	0.004	0,004
1×10^6	2,33	,52	2,00	1,0	---	---	0.699
2×10^6	2,50	,55	2,50	1,0	---	---	---
	p-value= 0,003						

Πίνακας 9

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ομάδες ($p=0.009$) σε σχέση με την μεταβλητή HGF στις 4 ημέρες και χορήγηση ΙΗ. Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα E 1×10^6 ΙΗ με τις ομάδες Sham ($p=0,017$) , Control ($p=0,004$) και ανάμεσα στην ομάδα E 1×10^6 ΙΗ με την ομάδα F 2×10^6 ΙΗ ($p=0,041$).

	4 ημέρες και χορήγηση ΙΗ				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	Control	1×10^6	2×10^6
Sham	1,00	1,00	1,00	2,0	1.000	0.017	0.329
Control	1,00	,00	1,00	0,0	---	0.004	0,177
1×10^6	2,83	,75	3,00	1,25	---	---	0.041
2×10^6	1,67	0,82	1,50	1,25	---	---	---
	p-value= 0,009						

Πίνακας 10

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ομάδες ($p=0.006$) σε σχέση με την μεταβλητή HGF στις 7 ημέρες και χορήγηση IV. Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Sham με τις ομάδες Control ($p=0,056$), C 1×10^6 IV ($p=0,010$) , D 2×10^6 IV ($p=0,009$) αλλά δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην Control και στις ομάδες C 1×10^6 IV και D 2×10^6 IV.

	7 ημέρες και χορήγηση IV				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	Control	1×10^6	2×10^6
Sham	0,40	,55	,00	1,00	0,056	0.010	0.009
Control	1,40	,55	1,00	1,00	---	0.268	0,052
1×10^6	2,00	,82	2,00	2,00	---	---	0.234
2×10^6	2,67	1,03	3,00	1,50	---	---	---
	p-value= 0,006						

Πίνακας 11

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ομάδες ($p=0.004$) σε σχέση με την μεταβλητή HGF στις 7 ημέρες και χορήγηση ΙΗ. Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο ανάμεσα στην ομάδα Sham με τις ομάδες E 1×10^6 ΙΗ ($p=0,009$) και F 2×10^6 ΙΗ ($p=0,006$) ενώ δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Control με τις ομάδες E ($p=0,052$) και την ομάδα F ($p=0,127$).

	7 ημέρες και χορήγηση ΙΗ				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	Control	1×10^6	2×10^6
Sham	0,40	0,55	0,00	1,00	0,056	0.009	0.006
Control	1,40	0,55	1,00	1,00	---	0.052	0,127
1×10^6	3,00	1,26	3,50	2,25	---	---	0.228
2×10^6	2,25	0,89	2,50	1,75	---	---	---
	p-value= 0,004						

Πίνακας 12

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ομάδες ($p=0,013$) σε σχέση με την μεταβλητή HGF στις 15 ημέρες και χορήγηση IV. Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα C 1×10^6 IV με την ομάδα Control ($p=0.010$) ενώ δεν παρατηρείται διαφορά ανάμεσα στην Control με την D 2×10^6 IV ($p=0,052$).

	15 ημέρες και χορήγηση IV				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	Control	1×10^6	2×10^6
Sham	1,00	,71	1,00	1,00	0,690	0.030	0.082
Control	0,80	,45	1,00	,50	---	0.010	0,052
1×10^6	2,43	,98	2,00	1,00	---	---	0,836
2×10^6	2,50	1,22	3,00	2,25	---	---	---
	p-value= 0,013						

Πίνακας 13

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ομάδες ($p=0.003$) σε σχέση με την μεταβλητή HGF στις 15 ημέρες και χορήγηση ΙΗ. Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα F 2×10^6 ΙΗ με τις ομάδες Sham ($p=0,009$) , Control ($p=0,004$) και E 1×10^6 ΙΗ ($p=0,009$).

	15 ημέρες και χορήγηση ΙΗ				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	Control	1×10^6	2×10^6
Sham	1,00	,71	1,00	1,00	0,690	0.537	0.009
Control	0,80	,45	1,00	,50	---	0.247	0,004
1×10^6	1,33	0,52	1,00	1,00	---	---	0.009
2×10^6	3,17	,98	3,50	2,00	---	---	---
	p-value= 0,003						

Επίπεδα έκφρασης mRNA του ηπατικού πυρηνικού παράγοντα 4α (HNF4a)

Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4a αποτελεί ισχυρό δείκτη ηπατικής διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων του λιπώδους ιστού (ADSCs) τόσο όσο αφορά τη δομή όσο και τη λειτουργία των τελευταίων. Τα επίπεδα του HNF4a ορίστηκαν ως σημαντικά όταν οι τιμές έκφρασής του υπερέβαιναν τη μονάδα (1) ενώ για τιμές χαμηλότερες της μονάδας θεωρήθηκαν ισότιμες με τις τιμές της ομάδας ελέγχου A. Τα επίπεδα της μεταγραφής του mRNA του HNF4a καταγράφονται στον Πίνακα 14 ανεξάρτητα από το χρόνο, την ποσότητα των βλαστικών κυττάρων και την οδό χορήγησής τους.

Πίνακας 14

Τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα HNF4a σε όλες τις ομάδες μεταμοσχευμένων κυττάρων (C, D, E και F) ανεξάρτητα του χρόνου, της οδού χορήγησης και της ποσότητας των ADSCs. Στατιστικά σημαντικές διαφορές καταγράφονται μεταξύ των ομάδων.

		Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	p-value
Ανεξαρτηता χρονου και ποσότητας	IV	3,42	4,92	1,10	3,48	0,009
	IIH	2,67	4,94	0,49	1,78	
Ανεξαρτηता χρονου και χορήγησης	1×10^6	3,44	4,76	1,19	3,20	0,001
	2×10^6	2,65	5,09	0,40	1,76	

Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των δύο σκελών του πειράματος, ενδοφλέβιο και ενδοηπατικό, όσο και μεταξύ των ποσοτήτων βλαστικών κυττάρων που μεταμοσχεύθηκαν. Στην πρώτη περίπτωση στην ενδοφλέβια οδό επιτυγχάνονται στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα HNF4a σε σχέση με την ενδοηπατική οδό ($p=0.009$) ενώ οι χαμηλότερες ποσότητες μεταμοσχευμένων ADSCs επιτυγχάνουν υψηλότερες τιμές του μεταγραφικού παράγοντα έναντι των μεγαλύτερων ποσοτήτων βλαστικών κυττάρων ($p=0.001$) (Πίνακας 14).

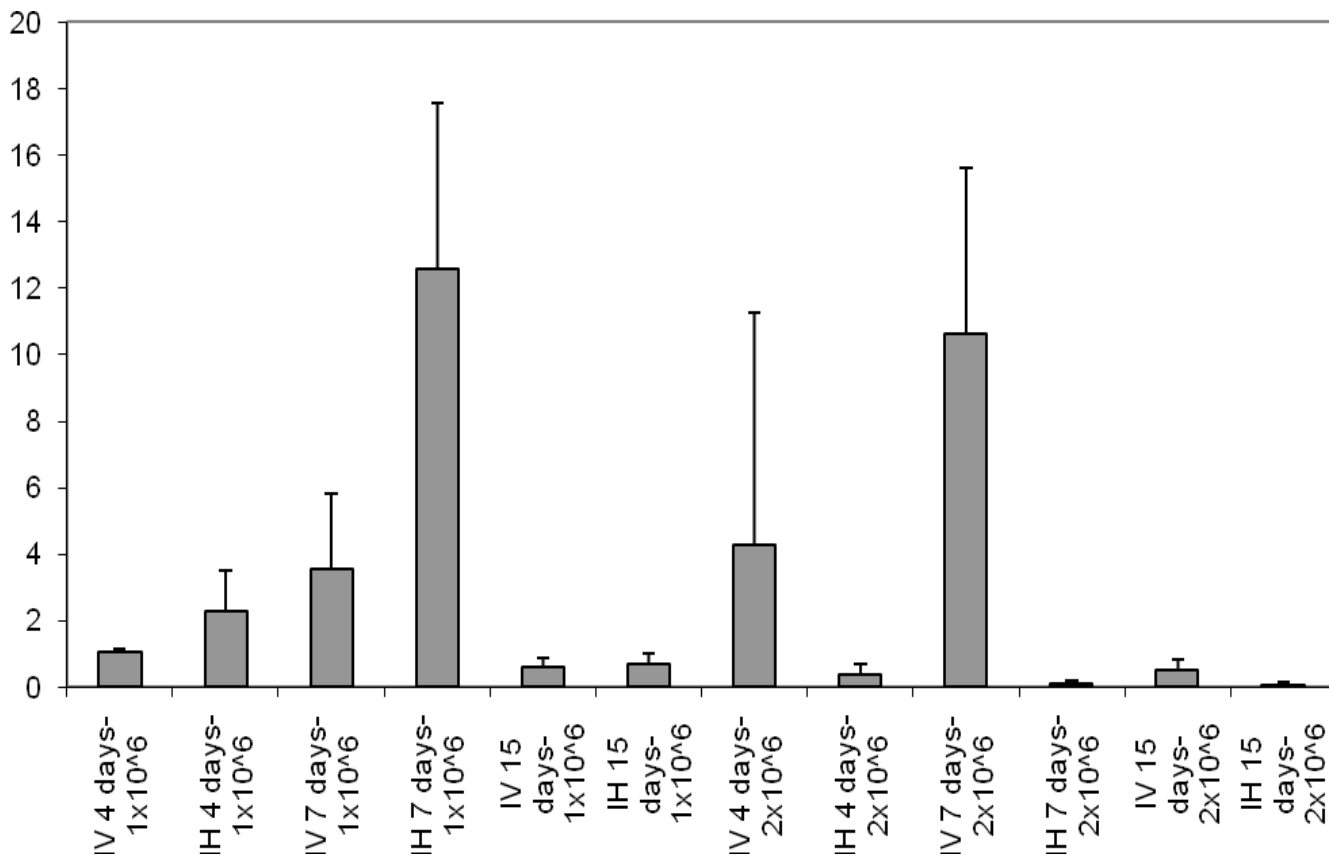
Η ανάλυση κάθε μεταμοσχευμένης ομάδας κατέδειξε μια χρονοεξαρτώμενη αυξομείωση των επιπέδων της HNF4a (Διάγραμμα 1). Η ομάδα C, 1×10^6 IV, παρουσίασε αύξηση των επιπέδων του HNF4a μεταξύ της 4^{ης} και 7^{ης} ημέρας οπότε οι καταγεγραμμένες τιμές είναι 3-πλάσιες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και ομαλοποιούνται την 15^η ημέρα. Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν μια στατιστικά σημαντική αύξηση μεταξύ 4^{ης} και 7^{ης} ημέρας ($p=0.002$) καθώς και μεταξύ 7^{ης} και 15^{ης} ($p=0.002$) (Πίνακας 15). Η ομάδα D, 2×10^6 IV, παρουσίασε μια παρόμοια διακύμανση των επιπέδων του HNF4a όπως και η ομάδα C με υψηλότερες τιμές την 4^η και την 7^η ημέρα οι οποίες ήταν 4-πλάσιες και 10-πλάσιες αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα A, ενώ η στατιστική ανάλυση κατέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ 7^{ης} και 15^{ης} ημέρας ($p=0.002$) αλλά όχι μεταξύ 4^{ης} και 7^{ης} ($p=0.065$) (Πίνακας 16).

Στο ενδοηπατικό σκέλος της μελέτης η ομάδα E, 1×10^6 IH, παρουσίασε παρόμοια πορεία στη διακύμανση των επιπέδων έκφρασης του παράγοντα HNF4a με διπλασιασμό και δωδεκαπλασιασμό των τιμών του την 4^η και την 7^η ημέρα αντίστοιχα και ομαλοποίηση των επιπέδων την 15^η ημέρα. Οι συγκρίσεις μεταξύ των τριών χρονικών σημείων για την ομάδα E ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 και 7 ημερών ($p=0.002$) όπως και μεταξύ των 7 και 15 ημερών ($p=0.002$) (Πίνακας 17). Τέλος, η ομάδα F, 2×10^6 IH, δεν παρουσίασε καμία αύξηση των επιπέδων του HNF4a πέραν των φυσιολογικών τιμών μικρότερο της μονάδας (Διάγραμμα 1) (Πίνακας 18). Τα υψηλότερα επίπεδα της έκφρασης του παράγοντα HNF4a συμπίπτουν με την 7^η ημέρα από τη χορήγηση των

βλαστικών κυττάρων και είναι σημαντικά υψηλότερες έναντι της ομάδας ελέγχου (Διάγραμμα 1).

Διάγραμμα 1

Μέση τιμή έκφρασης των επιπέδων του mRNA για τον παράγοντα HNF4a και τις ομάδες C (1x10⁶ IV), E (1x10⁶ IH), D (2x10⁶ IV) and F (2x10⁶ IH) την 4^η, 7^η και 15^η ημέρα από τη χορήγηση των ADSCs.



Πίνακας 15

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 ομάδες ($p=0.001$) σε σχέση με την μεταβλητή HNF4a για την ομάδα IV ποσότητας 1×10^6 , ομάδα C . Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ημέρες με τις 7 ημέρες ($p=0,002$) , 15 ημέρες ($p=0,015$) και ανάμεσα στις 7 και 15ημερες ($p=0,002$).

	IV ποσότητα 1×10^6				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	4 ημέρες	7 ημέρες	15ημέρες
4 ημέρες	1,04	0,13	1,03	0,26	---	0.002	0.015
7 ημέρες	3,52	2,36	2,69	3,52	---	---	0.002
15 ημέρες	0,58	0,30	0,58	0,50	---	---	---
	p-value=0,001						

Πίνακας 16

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 ομάδες ($p=0.005$) σε σχέση με την μεταβλητή HNF4a για την ομάδα IV ποσότητας 2×10^6 , ομάδα D . Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ημέρες με τις 7 ημέρες ($p=0,065$) , 15 ημέρες ($p=0,064$) και ανάμεσα στις 7 και 15ημερες ($p=0,002$).

	IV ποσότητα 2×10^6				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	4 ημέρες	7 ημέρες	15ημέρες
4 ημέρες	4,25	7,25	1,78	5,66	---	0.065	0.064
7 ημέρες	10,60	4,70	7,74	8,30	---	---	0,002
15 ημέρες	0,52	0,27	0,50	0,42	---	---	---
	p-value= 0,005						

Πίνακας 17

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 ομάδες ($p=0.001$) σε σχέση με την μεταβλητή HNF4a για την ομάδα ΙΗ ποσότητας 1×10^6 , ομάδα Ε. Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ημέρες με τις 7 ημέρες ($p=0,002$), 15 ημέρες ($p=0,004$) και ανάμεσα στις 7 και 15ημερες ($p=0,002$).

	ΙΗ ποσότητα 1×10^6				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	4 ημέρες	7 ημέρες	15ημέρες
4 ημέρες	2,28	1,29	1,82	1,95	---	0.002	0.004
7 ημέρες	12,54	4,96	12,99	8,99	---	---	0.002
15 ημέρες	0,69	,33	0,82	,69	---	---	---
	p-value=0,001						

Πίνακας 18

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 ομάδες ($p=0.022$) σε σχέση με την μεταβλητή HGF για την ομάδα IV ποσότητας 2×10^6 , ομάδα F. Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ημέρες με τις 7 ημέρες ($p=0,051$) , 15 ημέρες ($p=0,004$).

	IH ποσότητα 2×10^6				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	4 ημέρες	7 ημέρες	15ημέρες
4 ημέρες	0,37	0,35	0,24	0,61	---	0.051	0.004
7 ημέρες	0,07	0,06	0,07	0,08	---	---	0,876
15 ημέρες	0,05	0,01	0,05	0,02	---	---	---
	p-value= 0,022						

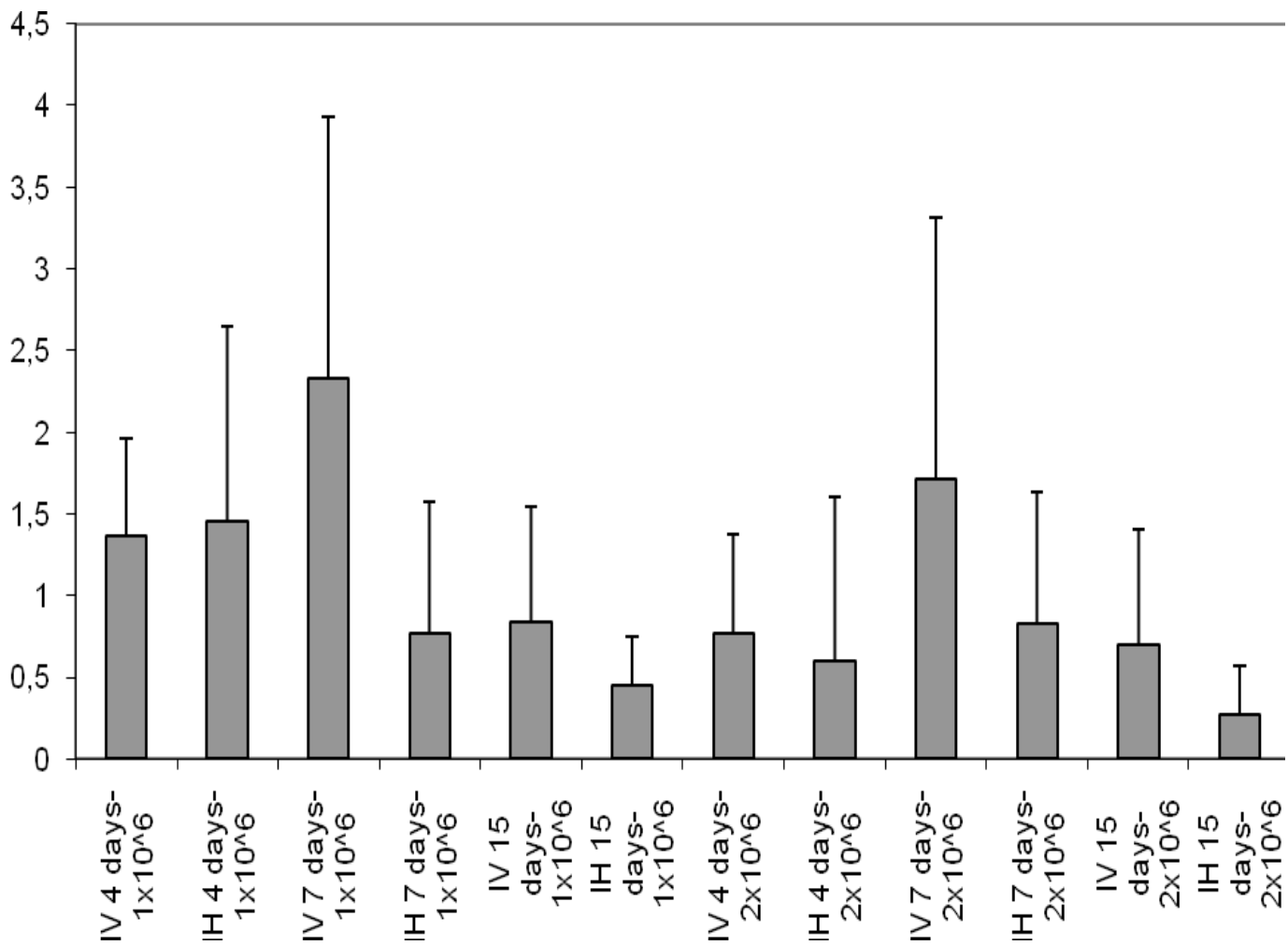
Επίπεδα έκφρασης mRNA του ηπατικού αυξητικού παράγοντα (HGF)

Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA για τον παράγοντα HGF ορίστηκαν ως σημαντικά για τιμές μεγαλύτερες της μονάδας ενώ οι μικρότερες θεωρήθηκαν ισότιμες με τα ευρήματα της ομάδας ελέγχου για το αντίστοιχο χρονικό σημείο (Διάγραμμα 2). Συνολικά, στο ενδοφλέβιο σκέλος του πειράματος καταγράφηκαν υψηλότερες μετρήσεις στην έκφραση του HGF έναντι του ενδοηπατικού σκέλους που ήταν στατιστικά σημαντική, $p=0.024$, ανεξάρτητα από το χρόνο και την ποσότητα των ADSCs (Πίνακας 19). Από την προηγούμενη ανάλυση προέκυψε πως η υψηλότερη έκφραση του mRNA για τον HGF παρατηρήθηκε την 7^η ημέρα και η χαμηλότερη την 15^η και η διαφορά ήταν σημαντική ($p=0.007$). Επιπλέον, η ποσότητα των βλαστικών κυττάρων, μικρότερη ή μεγαλύτερη δεν επηρεάζει τη μεταγραφή του HGF ($p=0.145$ για την ποσότητα των 1×10^6 έναντι των 2×10^6 ADSCs) (Πίνακας 19). Όταν τα δεδομένα μας αναλύθηκαν ανεξάρτητα της ποσότητας αλλά σε συνάρτηση με τον παράγοντα χρόνο διαπιστώθηκε μια οριακή στατιστική διαφορά μεταξύ της ενδοφλέβιας και ενδοηπατικής χορήγησης στις 7 και τις 15 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση των βλαστικών κυττάρων, $p=0.068$, (Πίνακας 20). Επιπρόσθετα, στη διαχρονική έκφραση του HGF ανά ομάδα μεταμοσχευμένων κυττάρων παρατηρήσαμε μια οριακή στατιστική διαφορά μεταξύ των 7 και των 15 ημερών στην ομάδα C (1×10^6 IV) (Πίνακας 21) καθώς και στην ομάδα F (2×10^6 IH) μεταξύ των 7 και 15 ημερών, $p=0.004$, αν και οι καταγεγραμμένες τιμές σε αυτή την περίπτωση ήταν κάτω της μονάδας (Πίνακας 22). Επίσης, παρατηρήθηκαν διαχρονικά στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση του HGF για την ομάδα D (1×10^6 IV) μεταξύ 4^{ης} και 15^{ης} ημέρας (Πίνακας 23) καθώς και για την ομάδα E (1×10^6 IH) μεταξύ 7^{ης} και 15^{ης} ημέρας (Πίνακας 24). Τέλος, περαιτέρω αξιολόγηση αποκάλυψε την υψηλότερη έκφραση του HGF στην ενδοφλέβια οδό χορήγησης (2.33 για την ομάδα C και 1.77 για την ομάδα D) ενώ οι αντίστοιχες ομάδες στο ενδοηπατικό σκέλος σημείωσαν χαμηλότερες τιμές την 7^η ημέρα (0.77 για την ομάδα E και 0.83 για την

ομάδα F). Η μεταγραφή του HGF ήταν ακόμα χαμηλότερη την 15^η ημέρα από την μεταμόσχευση (Διάγραμμα 2).

Διάγραμμα 2

Μέση τιμή επιπέδων mRNA του παράγοντα HGF για τις ομάδες C (1×10^6 IV), E (1×10^6 IH), D (2×10^6 IV) and F (2×10^6 IH) την 4η, 7η και την 15^η ημέρα.



Πίνακας 19

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους 2 τρόπους χορήγησης ανεξάρτητα χρόνου και ποσότητας ($p=0.024$), δεν υπάρχει ανάμεσα στις 2 ποσότητες ανεξάρτητα χρόνου και χορήγησης ($p=0.145$) και υπάρχει ανάμεσα στις 3 χρονικές εκτιμήσεις ανεξάρτητα ποσότητας και χορήγησης ($p=0.039$) σε σχέση με την μεταβλητή RP-PCR-HGF. Σχετικά με τις 3 χρονικές εκτιμήσεις υπάρχει διαφορά μόνο ανάμεσα στις 7 και 15 ημέρες ($p=0.007$).

		Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	p-value
Ανεξάρτητα χρόνου και ποσότητας	IV	1,29	1,19	1,02	1,38	0,024
	IIH	73	,74	,45	,85	
Ανεξάρτητα χρόνου και χορήγησης	1×10^6	1,20	1,09	1,00	1,53	0,145
	2×10^6	0,81	,92	,47	,78	
Ανεξάρτητα χορήγησης και ποσότητας	4 ημέρες	1,04	,92	,59	1,59	0,039
	7 ημέρες	1,41	1,35	,97	1,68	
	15 ημέρες	0,57	,45	,36	,74	

Πίνακας 20

Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 2 ομάδες σε σχέση με την μεταβλητή RP-PCR-HGF ανεξαρτηता ποσότητας 4 ημέρες ($p=0.843$) ενώ υπάρχει οριακά ανεξαρτηता ποσότητας 7 ημέρες ($p=0.068$) και ανεξαρτηता ποσότητας 15 ημέρες ($p=0.068$).

		Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	p-value
4 ημέρες ανεξάρτηता ποσότητας	IV	1,06	,84	,95	1,35	0,843
	IIH	1,03	1,03	,56	1,78	
7 ημέρες ανεξάρτηता ποσότητας	IV	2,02	1,60	1,50	3,07	0,068
	IIH	,80	,64	,55	,82	
15 ημέρες ανεξάρτηता ποσότητας	IV	,77	,54	,91	,83	0,068
	IIH	,36	,22	,32	,25	

Πίνακας 21

Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 ομάδες ($p=0.107$) σε σχέση με την μεταβλητή RP-PCR-HGF για την ομάδα IV ποσότητας 1×10^6 . Παρόλα αυτά από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 και τις 15 ημέρες ($p=0,065$).

	IV ποσότητας 1×10^6				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	4 ημέρες	7 ημέρες	15 ημέρες
4 ημέρες	1,36	,62	1,51	,75	---	0.310	0.240
7 ημέρες	2,33	1,65	1,93	2,80	---	---	0.065
15 ημέρες	,84	,66	,91	1,06	---	---	---
	p-value=0,107						

Πίνακας 22

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 ομάδες ($p=0.055$) σε σχέση με την μεταβλητή RP-PCR-HGF για την ομάδα IV ποσότητας 2×10^6 . Από τις πολλαπλές συγκρίσεις παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ημέρες και τις 15 ημέρες ($p=0,004$).

	IH ποσότητας 2×10^6				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	4 ημέρες	7 ημέρες	15ημέρες
4 ημέρες	0,60	,71	,34	,82	---	0.310	0.699
7 ημέρες	0,83	,45	,70	,77	---	---	0,004
15 ημέρες	0,27	,13	,29	,19	---	---	---
	p-value= 0,055						

Πίνακας 23

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 ομάδες ($p=0.372$) σε σχέση με την μεταβλητή RP-PCR-HGF για την ομάδα IV ποσότητας 2×10^6 .

	IV ποσότητας 2×10^6				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	4 ημέρες	7 ημέρες	15ημέρες
4 ημέρες	0,77	,97	,50	,82	---	0.310	0.937
7 ημέρες	1,71	1,65	,99	3,2 6	---	---	0,240
15 ημέρες	0,70	,43	,70	,83	---	---	---
	p-value=0,372						

Πίνακας 24

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 ομάδες ($p=0.584$) σε σχέση με την μεταβλητή RP-PCR-HGF για την ομάδα ΙΗ ποσότητας 1×10^6 .

	ΙΗ ποσότητας 1×10^6				Συγκρίσεις κατά ζεύγη		
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	IQR	4 ημέρες	7 ημέρες	15ημέρες
4 ημέρες	1,45	1,17	1,55	2,28	---	0,485	0.394
7 ημέρες	0,77	,84	0,45	1,37	---	---	0.937
15 ημέρες	0,45	,26	0,40	,43	---	---	---
	p-value=0,584						

Συζήτηση

Τα βλαστικά κύτταρα του λιπώδους ιστού (ADSCs) έχουν επισταμένως εξεταστεί σε πρόσφατες μελέτες για την ικανότητα τους να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται σε κύτταρα της ηπατικής σειράς με ταχύτερους ρυθμούς έναντι των βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών (BM-MSCs)^[56,58,60,67,90-93,140]. Θα πρέπει να τονιστεί ότι τα ADSCs εκκρίνουν ένα μεγάλο εύρος τροφικών παραγόντων που συμβάλλουν καθοριστικά στην αναστροφή της βαρύτητας της ηπατικής βλάβης ενώ παράλληλα επηρεάζουν θετικά την ηπατική αναγέννηση μέσω της αναπλήρωσης των κυτταρικών απωλειών^[58,63-65,69,71,72,80,91,134-140]. Ο ηπατικός αυξητικός παράγοντας (HGF) αντιπροσωπεύει έναν από τους κύριους τροφικούς παράγοντες των βλαστικών κυττάρων. Ο προαναφερόμενος μεσολαβητής επιδρά στην έκταση της φαρμακευτικής ηπατικής βλάβης μέσω της ενεργοποίησης της οικογένειας του κυτοχρώματος P450 για την αποτοξίνωση των τοξικών μεταβολιτών και κατ' επέκταση στην μείωση της ηπατικής ίνωσης. Επιπρόσθετα, ο HGF είναι απαραίτητος για την μιτωτική φάση της αναγέννησης^[77,117-119,141].

Η πειραματική μας μελέτη διερευνά τον αντίκτυπο των ADSCs στην φαρμακευτική ηπατική βλάβη καθώς και την ηπατική αναγέννηση. Πράγματι, η ιστολογική εξέταση επιβεβαίωσε πως η ηπατική βλάβη ήταν μικρότερης βαρύτητας και έκτασης στις ομάδες που μεταμοσχεύθηκαν σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, τα βλαστικά κύτταρα ταυτοποιήθηκαν στο ηπατικό παρέγχυμα με τη χρήση της τεχνικής του *in situ* υβριδισμού. Τα αποτελέσματά μας κατευθύνουν στο συμπέρασμα πως τα αδιαφοροποίητα βλαστικά κύτταρα ευθύνονται για την ανάνηψη της ηπατικής βλάβης. Το συμπέρασμα αυτό συγκλίνει με πρόσφατα πειραματικά πρωτόκολλα που υποστηρίζουν την βελτίωση της ηπατικής βλάβης μετά τη χορήγηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων^[58,63-65,69,71,72,80,91,134-140].

Περαιτέρω ανάλυση σημειώνει πως τα βλαστικά κύτταρα του λιπώδους αποτελούν κρίσιμη πηγή για την παραγωγή του HGF. Παρατηρήσαμε ότι τα αυξημένα επίπεδα αυτού του μεσολαβητή καταγράφονται σε όλες τις ομάδες μεταμοσχευμένων κυττάρων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Είναι αξιοσημείωτο ότι η ενδοφλέβια οδός χορήγησης είναι πλέον κατάλληλη για την επίτευξη υψηλότερων επιπέδων του HGF την 4^η ημέρα ανεξάρτητα μικρότερης ή μεγαλύτερης ποσότητας βλαστικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, στο ενδοηπατικό σκέλος διαπιστώθηκε αύξηση του HGF την 4^η ημέρα για τις μικρότερες ποσότητες βλαστικών κυττάρων (1×10^6 ADSCs) καθώς και μία απροσδόκητη αύξηση των επιπέδων του HGF στην ομάδα F την 15^η ημέρα που οφείλεται στα υψηλότερα ποσοστά αδιαφοροποίητων ADSCs στον ηπατικό ιστό. Τέλος, οι δύο οδοί χορήγησης δεν παρουσίασαν διαφορά στα επίπεδα του HGF σε σχέση με την ομάδα ελέγχου την 7^η ημέρα πιθανότατα λόγω της αυξημένης παραγωγής του ανωτέρω μεσολαβητή στην ομάδα ελέγχου στο χρονικό σημείο της 7^{ης} ημέρας.

Θα πρέπει να τονίσουμε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4a παρουσιάζει υψηλό βαθμό συσχέτισης με την διαδικασία της ηπατικής διαφοροποίησης και πως τα επίπεδα του ήταν ιδιαίτερα αυξημένα την 7^η ημέρα μετά τη μεταμόσχευση των βλαστικών κυττάρων στις ομάδες C, D και E. Συνεπώς, τα ADSCs εκτίθενται σε υψηλές τιμές του παράγοντα HNF4a που συμβάλλει στην προώθηση της διαφοροποίησης τους σε κύτταρα της ηπατικής σειράς^[66,141,151]. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε αναλογική αύξηση των επιπέδων του HNF4a ανταποκρινόμενη στην ποσότητα των βλαστικών κυττάρων που μεταμοσχεύθηκαν με την ενδοφλέβια οδό. Όμως στην ενδοηπατική χορήγηση βλαστικών κυττάρων μόνο η ποσότητα των 1×10^6 ADSCs συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση των τιμών του HNF4a ενώ η μεταμόσχευση των 2×10^6 ενδοηπατικά δεν συνέβαλλε στην αύξηση του ανωτέρω μεσολαβητή. Αυτή η διαπίστωση εξηγεί γιατί η ενδοφλέβια οδός καθώς και η χορήγηση των 1×10^6 ADSCs κατέγραψαν συνολικά καλύτερα αποτελέσματα έναντι της ενδοηπατικής οδού και της ποσότητας των 2×10^6 βλαστικών κυττάρων αντίστοιχα.

Επιπλέον η διαφοροποίηση των μεταμοσχευμένων βλαστικών κυττάρων μπορεί να υποστηρίξει κατά πάσα πιθανότητα τη διαρκώς μειούμενη έκφραση των επίπεδων mRNA του παράγοντα HGF μεταξύ της 7^{ης} και της 15^{ης} ημέρας στις ομάδες C, D και E. Η τελευταία παρατήρηση υποστηρίζεται και από τα ευρήματα της ανοσοϊστοχημείας του HGF στις προαναφερόμενες ομάδες οπότε και τα επίπεδα του HGF μειώνονται σημαντικά την 15^η ημέρα σε σύγκριση με πρωϊμότερα χρονικά σημεία. Από την άλλη πλευρά η ομάδα F κατέγραψε την 15^η ημέρα σημαντικά υψηλότερα επίπεδα του παράγοντα HGF στην ανοσοϊστοχημεία παρόλο που τα επίπεδα μεταγραφής του mRNA τόσο για τον μεσολαβητή HNF4a όσο και για τον HGF ήταν εξαιρετικά χαμηλά. Το τελευταίο εύρημα θα μπορούσαμε να το αποδώσουμε στο γεγονός ότι τα βλαστικά κύτταρα διατηρούν τον πολυδύναμο χαρακτήρα τους καθώς και τη δυνατότητα τους να παράγουν τον HGF καθώς λόγω των εξαιρετικά χαμηλών επιπέδων του HNF4a δεν υπόκεινται σε διαφοροποίηση προς την ηπατική σειρά. Σε συνδυασμό με τη μεγάλη ποσότητα των βλαστικών κυττάρων στην ομάδα F, 2×10^6 ADSCs, μπορούμε να εξηγήσουμε αυτή τη διακύμανση των επιπέδων του HGF στην ανοσοϊστοχημεία.

Συμπερασματικά, η μεταμόσχευση των βλαστικών κυττάρων του λιπώδους ιστού μετά την οξεία ηπατική βλάβη αποτελεί μια ικανή θεραπευτική μέθοδο για την αναστροφή της ηπατικής βλάβης ενώ τα ευρήματά μας συντείνουν στη διαπίστωση πως τα συγκεκριμένα κύτταρα ενισχύουν την ηπατική αναγέννηση μέσω της έκκρισης ηπατοτροφικών παραγόντων άλλα και τη διαφοροποίηση των ADSCs προς ηπατοκύτταρα.

Περίληψη

Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να καταδείξει πώς η φαρμακευτική ηπατική βλάβη η οποία αποτελεί σημαντικό αίτιο οξείας ηπατικής ανεπάρκειας στον ανεπτυγμένο κόσμο μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη μεταμόσχευση μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων όπως αναφέρεται και σε πρόσφατες πειραματικές εργασίες. Κυρίως όμως να τονίσει πως η χρήση των βλαστικών κυττάρων επιτυγχάνει αφενός την ελάττωση της φαρμακευτικής βλάβης και παράλληλα προωθεί την ηπατική αναγέννηση.

Υλικά και Μέθοδοι

Το πειραματικό πρωτόκολλο μας είχε ως στόχο την πρόκληση οξείας ηπατικής βλάβης σε αρουραίους του είδους wistar με τη χρήση παρακεταμόλης. Βλαστικά κύτταρα του λιπώδους ιστού, ADSCs, μεταμοσχεύθηκαν είτε ενδοφλέβια μέσω της πυλαίας φλέβας ή απευθείας στο ηπατικό παρέγχυμα, ενδοηπατικά. Η υβριδοποίηση in situ (FISH) χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των βλαστικών κυττάρων στο ηπατικό παρέγχυμα. Η επίδραση των βλαστικών κυττάρων στην ηπατική αναγέννηση εξετάστηκε με την ανοσοϊστοχημεία του παράγοντα HGF καθώς και με την RT-PCR για τους παράγοντες HNF4a και HGF.

Αποτελέσματα

Τα βλαστικά κύτταρα ανιχνεύθηκαν στο ηπατικό παρέγχυμα όλων των πειραματόζων. Ιστολογική βελτίωση της έκτασης της ηπατικής βλάβης καταγράφηκε. Τα επίπεδα του HGF ήταν σημαντικά υψηλότερα μεταξύ των μεταμοσχευμένων ομάδων έναντι της ομάδας ελέγχου ($p < 0.001$). Τα επίπεδα του παράγοντα ηπατικής διαφοροποίησης HNF4a αυξήθηκαν σημαντικά μεταξύ της 4^{ης} και 7^{ης} ημέρας μετά την μεταμόσχευση των βλαστικών κυττάρων και τα υψηλότερα καταγεγραμμένα mRNA για τον HGF παρατηρήθηκαν την 7^η ημέρα από τη χορήγηση των ADSCs.

Συμπέρασμα

Η μεταμόσχευση των βλαστικών κυττάρων του λιπώδους ιστού συμβάλλει καθοριστικά στη ηπατική αναγέννηση μετά την πρόκληση φαρμακευτικής ηπατικής βλάβης (DILI).

Summary

Background/ aims: Drug induced liver injury (DILI) is a leading causative factor of acute hepatic failure primarily in developed countries.

Transplantation of mesenchymal stem cells gains wider acceptance as an efficient method to reverse acute hepatic damage at recent experimental models. However, stem cells mainly attenuate DILI and promote liver regeneration.

Material and methods: Acute liver injury was induced in wistar rats with paracetamol. Adipose tissue stem cells (ASCs) were transplanted via portal vein or directly on liver parenchyma. FISH was used to verify ASCs location on the liver parenchyma. The effects of ASCs on liver regeneration were examined with immunohistochemistry of hepatic growth factor (HGF) and RT-PCR of HGF and hepatic nuclear factor 4a (HNF4a).

Results: ASCs were traced in the liver parenchyma in all specimen. Histological attenuation of AHI was recorded. HGF levels were significantly higher across all transplanted groups compared to the control group ($p < 0.001$). HNF4a levels were increased significantly between 4 and 7 day while HGF levels were higher at day 7 after ASCs transplantation ($p = 0.039$).

Conclusion: ASCs transplantation contributes in liver regeneration after DILI. >>>

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Lee WM. Recent developments in acute liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2012;26(1):3–16
- [2] Xie G, Wang L, Wang X, et al. Isolation of periportal, midlobular and centrilobular rat liver sinusoidal endothelial cells enables study of zoned drug toxicity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299(5):G1204–10
- [3] James LP, Letzig L, Simpson PM, et al. Pharmacokinetics of acetaminophen-protein adducts in adults with acetaminophen overdose and acute liver failure. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(8):1779–84
- [4] Jaeschke H, Williams CD, Ramachandran A, Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver Int.* 2012;32(1):8–20
- [5] Laura PJ, Philip RM, Jack AH. Acetaminophen –induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(12):1499–506
- [6] Newsome PN, Henderson NC, Nelson LJ, et al. Development of an invasively monitored porcine model of acetaminophen-induced acute liver failure. *BMC Gastroenterol.* 2010;10:34
- [7] Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol.* 2010;(196):369–405
- [8] Hinson JA, Robert DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol.* 2010;(196):369–405

- [9] Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest.* 2009;119(2):305–14
- [10] Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev.* 2012;44(1):88–106
- [11] Kewei W. Molecular mechanisms of liver injury: apoptosis or necrosis experimental and toxicologic pathology. 2014;66(8):351–356
- [12] McGill MR, Sharpe MR, Williams CD, et al. The mechanism underlying acetaminophen induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *J Clin Invest.* 2012;122(4):1574–83
- [13] Williams CD, Farhood A, Jaeschke H. Role of caspase-1 and interleukin-1 β in acetaminophen-induced hepatic inflammation and liver injury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;247(3):169–78
- [14] Bajt ML, Ramachandran A, Yan HM, et al. Apoptosis inducing factor modulates mitochondrial oxidant stress in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 2011;122(2):598–605
- [15] Böhm F, Speicher T, Hellerbrand C, et al. GF receptors 1 and 2 control chemically induced injury and compound detoxification in regenerating livers of mice. *Gastroenterology* 2010;139(4):1385–96
- [16] Kai W, Shile Z, Bruz M, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(11):4402–7
- [17] Lendvai G, Kiss A, Kovalszky I, et al. Alterations in microRNA expression patterns in liver diseases. *Orv Hetil.* 2010;151(45):1843–53

- [18] Starckx S, Batheja A, Verheyen GR, et al. Evaluation of miR-122 and other biomarkers in distinct acute liver injury in rats. *Toxicol Pathol.* 2013;41(5):795–804
- [19] Tekkesin N, Taga Y, Sav A, et al. Induction of HGF and VEGF in hepatic regeneration after hepatotoxin induced cirrhosis in mice. *Hepatogastroenterology* 2011;58(107–108):971–9
- [20] Ward J, Kanchagar C, Veksler-Lublinsky I, et al. Circulating microRNA profiles in human patients with acetaminophen hepatotoxicity or ischemic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(33):12169–74
- [21] Gandhi A, Guo T, Ghose R. Role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in regulating tumor necrosis factor-alpha(TNF-alpha) mediated increase of acetaminophen (APAP) and chlorpromazine (CPZ) toxicity in murine hepatocytes. *J Toxicol Sci.* 2010;35(2):163–73
- [22] Cover C, Liu J, Farhood A, et al. Pathophysiological role of the acute inflammatory response during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;216(1):98–107
- [23] Endo H, Niioka M, Sugioka Y, et al. Matrix metalloproteinase-13 promotes recovery from experimental liver cirrhosis in rats. *Hepatogastroenterology* 2011;78(5):239–52
- [24] Marques PE, Oliveira AG, Pereira RV, et al. Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. *Hepatology.* 2015;61(1):348–60
- [25] Hu J, Yan D, Gao J, et al. rhIL-1Ra reduces hepatocellular apoptosis in mice with acetaminophen-induced acute liver failure. *Lab Invest.* 2010;90(12):1737–46
- [26] Chauhan A, Lorenzen S, Herzel H, et al. Regulation of mammalian cell cycle progression in the regenerating liver. *J Theor Biol.* 2011;283(1):103–12

- [27] Nejak-Bowen KN, Monga SP. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. *Semin Cancer Biol.* 2011;21(1):44–58
- [28] Jiang Y, Zhang LX, Chang CF, et al. The number of the genes in a functional category matters during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *J Cell Biochem.* 2011;112(11):3194–205
- [29] Riehle KJ, Dan YY, Campbell JS, et al. New concepts in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(Suppl1):203–12
- [30] Ar'anzazu S, Fabregat I. Growth factor- and cytokine driven pathways governing liver stemness and differentiation. *World J Gastroenterol.* 2010;16(41):5148–61
- [31] Williams JM, Oh SH, Jorgensen M, et al. The role of the Wnt family of secreted proteins in rat oval “stem” cell based liver regeneration: Wnt1 drives differentiation. *Am J Pathol.* 2010;176(6):2732–42
- [32] Bellayr IH, Mu X, Li Y. Biochemical insights into the role of matrix metalloproteinases in regeneration: challenges and recent developments. *Future Med Chem.* 2009;1(6):1095–1111
- [33] Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor twenty years on: much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(Suppl 1):188–202
- [34] Suzuki K. Hepatocyte growth factor activator (HGFA): its regulation by protein C inhibitor *FEBS J.* 2010;277(10):2223–9
- [35] Zerrad-Saadi A, Lambert-Blot M, Mitchell C, et al. GH receptor

plays a major role in liver regeneration through the control of EGFR and ERK1/2 activation. *Endocrinology* 2011;152(7):2731–41

[36] Gai-Ping W, Cun-Shuan X. Alterations in DNA repair gene expression and their possible regulation in rat-liver regeneration. *Genet Mol Biol.* 2011;34(2):304–9

[37] Shu J, Kren BT, Xia Z, et al. Genomewide microRNA down-regulation as a negative feedback mechanism in the early phases of liver regeneration. *Hepatology* 2011;54(2):609–19

[38] Song G, Sharma AD, Roll GR, et al. MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 2010;51(5):1735–43

[39] Li F, Huang Q, Chen J, et al. Apoptotic cells activate the “phoenix rising” pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci Signal.* 2010;3(110): ra13

[40] Ren X, Hu B, Colletti L. Stem cell factor and its receptor, c-kit, are important for hepatocyte proliferation in wildtype and tumor necrosis factor receptor-1 knockout mice after 70% hepatectomy. *Surgery.* 2008;143(6):790–802

[41] Hu B, Colletti LM. Stem cell factor and c-kit are involved in hepatic recovery after acetaminophen-induced liver injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295(1):G45-G53

[42] Dayoub R, Groitl P, Dobner T, et al. Foxa2 (HNF-3beta) regulates expression of hepatotrophic factor ALR in liver cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;395(4):465–70

[43] Ilowski M, Putz C, Weiss TS, et al. Augmenter of liver regeneration causes different kinetics of ERK1/2 and Akt/PKB phosphorylation than EGF and induces hepatocyte proliferation in an EGF receptor independent and liver specific manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394(4):915–20

- [44] Vaquero J, Campbell JS, Haque J, et al. Toll-like receptor 4 and myeloid differentiation factor 88 provide mechanistic insights into the cause and effects of interleukin-6 activation in mouse liver regeneration. *Hepatology*. 2011;54(2):597–608.
- [45] Batusic D, Von Bargen A, Blaschke S, et al. Different physiology of interferon- α / γ in models of liver regeneration in the rat. *HistochemCellBiol*. 2011;136(2):131–44
- [46] Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, et al. The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration. *Inflamm Res*. 2010;59(11):897–905
- [47] Van Sweringen HL, Sakai N, Tevar AD, et al. CXC chemokine signaling in the liver: impact on repair and regeneration. *Hepatology*. 2011;54(4):1445–53
- [48] Yoshioka K, Kunitomo M, Yanai K, et al. Hepatocyte nuclear factor 1 β induced by chemical stress accelerates cell proliferation and increases genomic instability in mouse liver. *J Recept Signal Transduct Res*. 2011;31(2):132–8
- [49] Thenappan A, Li Y, Kitisin K, et al. Role of transforming growth factor beta signaling and expansion of progenitor cells in regenerating liver. *Hepatology*. 2010;51(4):1373–82
- [50] Tholpady SS, Ogle RC, Katz AJ. Adipose stem cells and solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2009;14(1):51–5
- [51] Sekiya S, Suzuki A. Glycogen synthase kinase 3 β -dependent Snail degradation directs hepatocyte proliferation in normal liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(27):11175–80
- [52] Chen H, Sun Y, Dong R, et al. Mir-34a is upregulated during liver regeneration in rats and is associated with the suppression of hepatocyte proliferation. *PLoS One*. 2011;6(5):e 20238

- [53] Gui Y, Yeganeh M, Ramanathan S, et al. SOCS1 controls liver regeneration by regulating HGF signaling in hepatocytes. *J Hepatol.* 2011;55(6):1300–8
- [54] Lin W, Xiangdong W, Guanhua X, et al. Hill, et al. Liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells promote liver regeneration in rats. *J Clin Invest.* 2012;122(4):1567–73
- [55] Watanabe G, Nanjo H, Nagai H, et al. A novel monoclonal antibody identified hepatic stem-like cells in rats. *MedMol Morphol.* 2011;44(2):103–10
- [56] Christ B, Pelz S. Implication of hepatic stem cells in functional liver repopulation. *Cytometry A.* 2013;83(1):90–102
- [57] Bro´en G, Sivertsson L, Björquist P, et al. Hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells specifically via definitive endoderm and a progenitor stage. *J Biotechnol.* 2010;145(3):284–94
- [58] Banas A. Purification of adipose tissue mesenchymal stem cells and differentiation toward hepatic-like cells. *Methods Mol Biol.* 2012;826:61–72
- [59] Zhao Q, Ren H, Li X, et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stromal cells into low immunogenic hepatocyte-like cells. *Cytotherapy.* 2009;11(4):414–26
- [60] Saulnier N, Lattanzi W, Puglisi MA, et al. Mesenchymal stromal cells multipotency and plasticity: induction toward the hepatic lineage. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2009;13(Suppl 1):71–8.
- [61] Hoogduijn MJ, Roemeling-van Rhijn M, Engela AU, et al. Mesenchymal stem cells induce an inflammatory response after intravenous infusion. *Stem Cells Dev.* 2013;22(21):2825–35
- [62] Yi T1, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res.* 2012;35(2):213–21

- [63] Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol.* 2007;212(3):702–9
- [64] Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P, et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* 2009;58(4):570–81
- [65] Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, et al. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J GastroenterolHepatol.* 2009;24(1):70–7
- [66] Chen ML, Lee KD, Huang HC, et al. HNF-4 α determines hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells from bone marrow. *World J Gastroenterol.* 2010;16(40):5092–103
- [67] Coradeghini R, Guida C, Scanarotti C, et al. A comparative study of proliferation and hepatic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2010;191(6):466–77
- [68] Dong XJ, Zhang H, Pan RL, et al. Identification of cytokines involved in hepatic differentiation of mBM MSCs under liver-injury conditions. *World J Gastroenterol.* 2010;16(26):3267–78
- [69] Sancho-Bru P, Roelandt P, Narain N, et al. Directed differentiation of murine-induced pluripotent stem cells to functional hepatocyte-like cells. *J Hepatol.* 2011;54(1):98–107
- [70] Shimomura T, Yoshida Y, Sakabe T, et al. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived UE7T-13 cells: effects of cytokines and CCN family gene expression. *Hepatol Res.* 2007;37(12):1068–79
- [71] Stock P, Staeger MS, Müller LP, et al. Hepatocytes derived from adult stem cells. *Transplant Proc.* 2008;40(2):620–3

- [72] Iwashima S, Ozaki T, Maruyama S, et al. Novel culture system of mesenchymal stromal cells from human subcutaneous adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 2009;18(4):533–43
- [73] Tal'ens-Visconti R, Bonora A, Jover R, et al. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: differentiation into hepatic lineage. *Toxicol In Vitro.* 2007;21(2):324–9
- [74] Tal'ens-Visconti R, Bonora A, Jover R, et al. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol.* 2006;12(36):5834–45
- [75] Yamamoto Y, Banas A, Murata S, et al. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J.* 2008;275(6):1260–73
- [76] Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology.* 2007;46(1):219–28
- [77] Ghaedi M, Tuleuova N, Zern MA, et al. Bottom-up signaling from HGF-containing surfaces promotes hepatic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;407(2):295–300
- [78] Zemel R, Bachmetov L, Ad-El D, et al. Expression of liver specific markers in naive adipose-derived mesenchymal stem cells. *Liver Int.* 2009;29(9):1326–37
- [79] Ek M, Söderdahl T, Kuppers-Munther B, et al. Expression of drug metabolizing enzymes in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(3):496–503
- [80] Fitzpatrick E, Wu Y, Dhadda P, et al., Co culture with mesenchymal stem cells results in improved viability and function of human hepatocytes. *Cell Transplant.* 2015;24(1):73–83

- [81] Khuu DN, Scheers I, Ehnert S, et al. In vitro differentiated adult human liver progenitor cells display mature hepatic metabolic functions: a potential tool for in vitro pharmacotoxicological testing. *Cell Transplant*. 2011;20(2): 287–302
- [82] Okura H, Komoda H, Saga A, et al. Properties of hepatocyte-like cell clusters from human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(4):761–70
- [83] Saulnier N, Piscaglia AC, Puglisi MA, et al. Molecular mechanisms underlying human adipose tissue-derived stromal cells differentiation into a hepatocyte-like phenotype. *Dig Liver Dis*. 2010;42(12):895–901
- [84] Roelandt P, Pauwelyn KA, Sancho-Bru P, et al. Human embryonic and rat adult stem cells with primitive endoderm-like phenotype can be fated to definitive endoderm, and finally hepatocyte-like cells. *PLoS One*. 2010;5(8):e12101
- [85] Yagi K, Kojima M, Oyagi S, et al. Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative medicine. *Yakugaku Zasshi*. 2008;128(1):3–9
- [86] Gruttadauria S, Grosso G, Pagano D, et al. Marrow derived mesenchymal stem cells restore biochemical markers of acute liver injury in experimental model. *Transplant Proc*. 2013;45(2):480–6
- [87] Seki T, Yokoyama Y, Nagasaki H, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes hepatic regeneration after hepatic ischemia reperfusion and subsequent hepatectomy in rats. *J Surg Res*. 2012;178(1):63–70
- [88] Seki A1, Sakai Y, Komura T, et al. Adipose tissue derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. *Hepatology* 2013;58(3):1133–42

[89] Kim SJ, Park KC, Lee JU, et al. Therapeutic potential of adipose tissue-derived stem cells for liver failure according to the transplantation routes. *J Korean Surg Soc.* 2011;81(3):176–86.

[90] Libo Y, Yushua Z, Jiangan Y, et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells differentiated into hepatocyte-like cells in vivo and in vitro. *Mol Med Rep.* 2015; 11(3): 1722–1732

[91] Lisi D, Guangze L, Xin W, et al. Adipose derived Mesenchymal stem cells efficiently rescue carbon tetrachloride-induced acute liver failure in Mouse *Sci World J.* 2014;2014:103643.

[92] Yu W, Fan L, Jiaping L, et al. Adipose derived mesenchymal stem cells transplantation via portal vein improves microcirculation and ameliorates liver fibrosis induced by CCl₄ in rats. *J Transl Med.* 2012; 10:133 [PMCID: PMC3439354 DOI: 10.1186/1479-5876-10-133]

[93] Pascual-Miguel [~]nez I, Salinas-Gomez J, Fernandez-Luengas D, et al. Systemic treatment of acute liver failure with adipose derived stem cells. *J Invest Surg.* 2015;28(2):120–6

[94] Saidi R, Rajeshkumar R, Shariftabrizi A, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells promote liver regeneration *J Invest Surg.* 2015;23:1–6.

[95] Salomone F, Barbagallo I, Puzzo L, et al. Efficacy of adipose tissue-mesenchymal stem cell transplantation in rats with acetaminophen liver injury. *Stem Cell Res.* 2013;11(3):1037–44

[96] Harn HJ, Lin SZ, Hung SH, et al. Adipose-derived stem cells can abrogate chemical-induced liver fibrosis and facilitate recovery of liver function. *Cell Transplant.* 2012;21(12):2753–64

[97] Koellensperger E, Niesen W, Kolbensschlag J, et al. Human adipose tissue derived stem cells promote liver regeneration in a rat model of toxic injury. *Stem Cells Int.* 2013;2013:534263

- [98] ZhuW, Shi XL, Xiao JQ, et al. Effects of xenogeneic adipose derived stem cell transplantation on acute-on-chronic liver failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2013;12(1):60–7
- [99] Sun J, Yuan Y, Qin H, et al. Serum from hepatectomized rats induce the differentiation of adipose tissue mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells and upregulates the expression of hepatocyte growth factor and interleukin-6 in vitro. *Int J Mol Med.* 2013;31(3):667–75
- [100] Avritscher R, Abdelsalam ME, Javadi S, et al. Percutaneous intraportal application of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells using a balloon occlusion catheter in a porcine model of liver fibrosis. *J Vasc Interv Radiol.* 2013;24(12):1871–8
- [101] Yoon E., Babar A., Choudhary M. et al. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update. *J Clin Transl Hepatol.* 2016 Jun 28; 4(2): 131–142.
- [102] McGill MR, Jaeschke H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharm Res* 2013;30: 2174–2187. doi: 10.1007/s11095-013-1007-6.
- [103] Kakisaka K, Kataoka K, Suzuki Y, et al. Necrotic cell death and suppression of T-cell immunity characterized acute liver failure due to drug-induced liver injury. *Cytokine.* 2016 Oct;86:21-8.
- [104] Park HK, Jo W, Choi HJ et al. Time-course changes in the expression levels of miR-122, -155, and -21 as markers of liver cell damage, inflammation, and regeneration in acetaminophen-induced liver injury in rats. *J Vet Sci.* 2016 Mar;17(1):45-51

- [105] Simonetta Bandiera, Sébastien Pfeffer, Thomas F. Baumert et al. miR-122 – A key factor and therapeutic target in liver disease. *Journal of Hepatology* 2015 vol. 62:448–457
- [106] **Shinjiro Tachibana , Akiko Shimomura, Hidekuni Inadera. Toxicity Monitoring with Primary Cultured Hepatocytes Underestimates the Acetaminophen-Induced Inflammatory Responses of the Mouse Liver. *Tohoku J. Exp. Med.* 2011 vol. 225:263-272**
- [107] Hussein Atta, Mahmoud El-Rehany, Olfat Hammam et al. Mutant MMP-9 and HGF Gene Transfer Enhance Resolution of CCl₄-Induced Liver Fibrosis in Rats: Role of ASH1 and EZH2 Methyltransferases Repression. *PLoS One.* 2014 Nov 7;9(11): e112384
- [108] Marques PE1, Amaral SS, Pires DA et al. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology.* 2012 Nov;56(5):1971-82
- [109] Pibiri M, Sulas P, Leoni VP et al. Global gene expression profile of normal and regenerating liver in young and old mice. *Age (Dordr).* 2015 Jun;37(3):9796
- [110] Jing Yang, Laura E. Mowry, Kari Nichole Nejak-Bowen et al. Beta-catenin signaling in murine liver zonation and regeneration: A Wnt-Wnt situation! *Hepatology.* 2014 Sep; 60(3): 964–976.
- [111] Monga SP. Role and regulation of β -catenin signaling during physiological liver growth. *Gene Expr.* 2014;16(2):51-62.
- [112] Ewa Stepniak, Romeo Ricci, Robert Eferl et al. c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. *Genes Dev.* 2006 Aug 15; 20(16): 2306–2314
- [113] Wen Y, Feng D, Wu H, et al. Defective Initiation of Liver Regeneration in Osteopontin-Deficient Mice after Partial Hepatectomy due to Insufficient Activation of IL-6/Stat3 Pathway. *Int J Biol Sci.* 2015; 11(10): 1236–1247

- [114] Gustems M,^{*} Woellmer A., Rothbauer U. et al. c-Jun/c-Fos heterodimers regulate cellular genes via a newly identified class of methylated DNA sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* 2014 Mar; 42(5): 3059–3072.
- [115] Gazit V., Huang J., Weymann A. et al. Analysis of the role of hepatic PPAR γ expression during mouse liver regeneration. *Hepatology.* 2012 Oct;56(4):1489-98
- [116] Sergio Duarte, John Baber, Takehiro Fujii et al. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol.* 2015 May-Jul; 0: 147–156.
- [117] Fajardo-Puerta AB, Mato Prado M, Frampton AE et al. Gene of the month: HGF. *J Clin Pathol.* 2016 Jul;69(7):575-9.
- [118] Paranjpe S, Bowen WC, Mars WM et al. Combined systemic elimination of MET and epidermal growth factor receptor signaling completely abolishes liver regeneration and leads to liver decompensation. *Hepatology.* 2016 Jul 11
- [119] Padrisa-Altés S, Bachofner M, Bogorad RL et al. Control of hepatocyte proliferation and survival by Fgf receptors is essential for liver regeneration in mice. *Gut.* 2015 Sep;64(9):1444-53.
- [120] Itoh N, Nakayama Y, Konishi M. Roles of FGFs As Paracrine or Endocrine Signals in Liver Development, Health, and Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2016 Apr 13;4:30.
- [121] Yuan Q, Loya K, Rani B et al. MicroRNA-221 overexpression accelerates hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology.* 2013 Jan;57(1):299-310.
- [122] Zhou J, Ju W, Wang D, Wu L et al. Down-regulation of microRNA-26a promotes mouse hepatocyte proliferation during liver regeneration. *PLoS One.* 2012;7(4):e33577

- [123] Guang-Yong Sun, , Ling-Yue Dong, and Wei An. Involvement of Hepatic Stimulator Substance in the Regulation of Hepatoblast Maturation into Hepatocytes In Vitro. *Stem Cells Dev.* 2014 Jul 15; 23(14): 1675–1687.
- [124] Ilowski M, Kleespies A, de Toni EN et al. Augmenter of liver regeneration (ALR) protects human hepatocytes against apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jan 7;404(1):148-52.
- [125] Mastellos DC, Deangelis RA, Lambris JD. Complement-triggered pathways orchestrate regenerative responses throughout phylogenesis. *Semin Immunol.* 2013 Feb;25(1):29-38.
- [126] Wang K, Holterman AX. Pathophysiologic role of hepatocyte nuclear factor 6. *Cell Signal.* 2012 Jan;24(1):9-16
- [127] H Kuroki, H Hayashi, S Nakagawa et al. Effect of LSKL peptide on thrombospondin 1-mediated transforming growth factor β signal activation and liver regeneration after hepatectomy in an experimental model. *Br J Surg.* 2015 Jun; 102(7): 813–825
- [128] Friederike Böhm, Ulrike A Köhler, Tobias Speicher, and Sabine Werner. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Mol Med.* 2010 Aug; 2(8): 294–305.
- [129] Shennen A Mao, Jaime M Glorioso, and Scott L Nyberg. Liver Regeneration. *Transl Res.* 2014 Apr; 163(4): 352–362.
- [130] Chen F, Hu SJ. Effect of microRNA-34a in cell cycle, differentiation, and apoptosis: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2012 Feb;26(2):79-86
- [131] Gui Y, Yeganeh M, Donates YC et al. Regulation of MET receptor tyrosine kinase signaling by suppressor of cytokine signaling 1 in hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2015 Nov 12;34(46):5718-28
- [132] DeLeve LD. Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration. *J Clin Invest.* 2013 May;123(5):1861-6

- [133] Diehl AM, Chute J. Underlying potential: cellular and molecular determinants of adult liver repair. *J Clin Invest*. 2013 May;123(5):1858-60.
- [134] Wei-hui Liu, Li-na Ren, Tao Wang et al. The Involving Roles of Intrahepatic and Extrahepatic Stem/Progenitor Cells (SPCs) to Liver Regeneration. *Int J Biol Sci*. 2016; 12(8): 954–963
- [135] Kol A, Wood JA, Carrade Holt DD et al. Multiple intravenous injections of allogeneic equine mesenchymal stem cells do not induce a systemic inflammatory response but do alter lymphocyte subsets in healthy horses. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Apr 15;6:73.
- [136] Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*. 2012 Sep 20;21(14):2724-52.
- [137] De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med*. 2012 Jun;12(5):574-91.
- [138] Banas A. Purification of adipose tissue mesenchymal stem cells and differentiation toward hepatic-like cells. *Methods Mol Biol*. 2012;826:61-72.
- [139] Ochiya T, Yamamoto Y, Banas A. Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation*. 2010 Feb;79(2):65-73.
- [140] Liu WH, Song FQ, Ren LN et al. The multiple functional roles of mesenchymal stem cells in participating in treating liver diseases. *J Cell Mol Med*. 2015 Mar;19(3):511-20.
- [141] Ye JS1, Su XS, Stoltz JF, de Isla N, Zhang L. Signaling pathways involved in the process of mesenchymal stem cells differentiating into hepatocytes. *Cell Prolif*. 2015 Apr;48(2):157-65.

- [142] Ulvestad M, Nordell P, Asplund A et al. Drug metabolizing enzyme and transporter protein profiles of hepatocytes derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Biochem Pharmacol.* 2013 Sep 1;86(5):691-702.
- [143] Feras Al Battah, Joery De Kock, Tamara Vanhaecke, and Vera Rogiers. Current Status of Human Adipose-Derived Stem Cells: Differentiation into Hepatocyte-Like Cells. *ScientificWorldJournal.* 2011; 11: 1568–1581
- [144] Martins PN, Neuhaus P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Int.* 2007 Apr;27(3):384-92.
- [145] Cover C, Liu J, Farhood A Et al. Pathophysiological role of the acute inflammatory response during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006 Oct 1;216(1):98-107
- [146] Tachibana S, Shimomura A, Inadera H. Toxicity monitoring with primary cultured hepatocytes underestimates the acetaminophen-induced inflammatory responses of the mouse liver. *Tohoku J Exp Med.* 2011;225(4):263-72.
- [147] Harrill AH, Ross PK, Gatti DM, Threadgill DW, Rusyn I. Population-based discovery of toxicogenomics biomarkers for hepatotoxicity using a laboratory strain diversity panel. *Toxicol Sci.* 2009 Jul;110(1):235-43.
- [148] James LP, Letzig L, Simpson PM et al. Pharmacokinetics of acetaminophen-protein adducts in adults with acetaminophen overdose and acute liver failure. *Drug Metab Dispos.* 2009 Aug;37(8):1779-84.
- [149] Yoshikawa Y, Morita M, Hosomi H et al. Knockdown of superoxide dismutase 2 enhances acetaminophen-induced hepatotoxicity in rat. *Toxicology.* 2009 Oct 1;264(1-2):89-95.
- [150] Gardner CR, Gray JP, Joseph LB et al. Potential role of caveolin-1 in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 May 15;245(1):36-46

[151] Hang H1, Yu Y2, Wu N2, Huang Q2, Xia Q3, Bian J2. Induction of highly functional hepatocytes from human umbilical cord mesenchymal stem cells by HNF4 α transduction. PLoS One. 2014 Aug 19;9(8):e104133

[152] Han SM1, Coh YR1, Ahn JO1, Jang G2, Yum SY2, Kang SK3 et al. Enhanced hepatogenic transdifferentiation of human adipose tissue mesenchymal stem cells by gene engineering with Oct4 and Sox2. PLoS One. 2015 Mar 27;10(3):e0108874

