



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΣΕ ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟ ΙΣΤΟ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β.
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΙΑΙΜΙΑΣ ΤΗΣ ΜΗΤΕΡΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟ**

ΑΣΠΙΩΤΗ Φ. ΜΑΡΙΝΑ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΑΘΗΝΑ 2017



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΣΕ ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟ ΙΣΤΟ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β.
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΙΑΙΜΙΑΣ ΤΗΣ ΜΗΤΕΡΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟ**

ΑΣΠΙΩΤΗ Φ. ΜΑΡΙΝΑ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

marina_aspioti@yahoo.gr

ΑΘΗΝΑ 2017



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ IV

ΚΑΙ

ΓΕΝΙΚΟ ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΚΗΦΙΣΙΑΣ «ΟΙ ΑΓΙΟΙ ΑΝΑΡΓΥΡΟΙ»
ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΟ ΤΜΗΜΑ - ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΣΕ ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟ ΙΣΤΟ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β.
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΙΑΙΜΙΑΣ ΤΗΣ ΜΗΤΕΡΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟ**

ΑΣΠΙΩΤΗ Φ. ΜΑΡΙΝΑ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΕΠΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ:

Στυλιανοπούλου Φ, Καθηγήτρια, Τμήμα Νοσηλευτικής ΕΚΠΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ:

Σταματάκης Α., Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Νοσηλευτικής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Γαϊτανάκη Α., Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ
- Σταματάκης Α., Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Νοσηλευτικής ΕΚΠΑ
- Στυλιανοπούλου Φ., Καθηγήτρια, Τμήμα Νοσηλευτικής ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2017

*Στα ανίψια μου, Κωνστάντιο, Εύη & Μάξιμο
και στο μωρό μας, που βρίσκεται προστατευμένο
στον πλακούντα της μητέρας του*

Στην αγαπημένη μου γιαγιά

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διατριβή αυτή αποτελεί ερευνητική εργασία στο πλαίσιο απόκτησης του διπλώματος ειδίκευσης του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Κλινική Βιοχημεία – Μοριακή Διαγνωστική» του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Εκπονήθηκε εν μέρει στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς «οι Άγιοι Ανάργυροι» και εν μέρει στο Εργαστήριο Βιολογίας - Βιοχημείας του Τμήματος Νοσηλευτικής. Ευκαιρίας δοθείσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Ελευσινιώτη Ιωάννη (Διευθυντής Ιατρός στην Πανεπιστημιακή Παθολογική του Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς «οι Άγιοι Ανάργυροι» και Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Νοσηλευτικής ΕΚΠΑ), γιατί με εμπύχωσε όχι μόνο για την διατριβή, αλλά και γενικότερα για την ενασχόλησή μου με το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών. Τον ευχαριστώ από καρδιάς για την εμπιστοσύνη του, την καθοδήγησή του και την αμέριστη υποστήριξή του. Η ιδέα και ο σχεδιασμός της μελέτης αυτής δεν θα ήταν δυνατά χωρίς την πολύτιμη βοήθειά του.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Σταματάκη Αντώνιο (Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας - Βιολογίας Συμπεριφοράς του Τμήματος Νοσηλευτικής ΕΚΠΑ), για την επιστημονική του καθοδήγηση, την υπομονή του, τον πολύτιμο χρόνο που μου διέθεσε και για τις συμβουλές που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Χάρη στη συνεργασία αυτή ολοκληρώθηκε ένα μεγάλο και ίσως το δυσκολότερο κομμάτι της μελέτης μου, αυτό του ανοσοφθορισμού, καθώς και η στατιστική επεξεργασία όλων των δεδομένων.

Η ολοκλήρωση της διατριβής αυτής δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την συμβολή και καθοδήγηση της κυρίας Νικολάου Ειρήνης PhD (Ιατρός Παθολογοανατόμος, Συντονίστρια Διευθύντρια του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου και Τομέαρχη του Εργαστηριακού Τομέα του Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς «οι Άγιοι Ανάργυροι»). Η κυρία Νικολάου έχει τον αμέριστο θαυμασμό και την αγάπη μου, καθώς αποτελεί για μένα πρότυπο ιατρού-διδασκάλου-ανθρώπου. Η βοήθειά της ήταν τόσο ουσιαστική, ηθική και υλική, που το «ευχαριστώ» μοιάζει πολύ λίγο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Στυλιανοπούλου Φωτεινή (Καθηγήτρια Βιολογίας και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοχημείας – Βιολογίας Τμήμα Νοσηλευτικής ΕΚΠΑ), για τις συμβουλές της, τις παρατηρήσεις της και κυρίως για την κατανόησή της καθ'όλη την προσπάθειά μου. Επίσης, θα ήταν μεγάλη παράληψη να μην ευχαριστήσω την κυρία Βαλλιάνου Βασιλική (Διευθύντρια Ιατρός Βιοπαθολόγος, Τμήμα Ανοσοφθορισμού, Σισμανόγλειο Νοσοκομείο) για τις πολύτιμες συμβουλές της.

Χρωστάω, επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κυρία Τσίπουρα Άννα (Διευθύντρια Ιατρός Παθολογοανατόμος, ΓΟΝΚ «οι Άγιοι Ανάργυροι»), στην κυρία Παπαϊωάννου Ελένη (Επικουρική Ιατρός Παθολογοανατόμος, ΓΟΝΚ «οι Άγιοι Ανάργυροι») και την κυρία Δόξα Αναστασία (Παρασκευάστρια Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου ΓΟΝΚ «οι Άγιοι Ανάργυροι») για την πολύτιμη βοήθειά τους, την συμπαράστασή τους και τις γνώσεις που απλόχερα μου μετέδωσαν. Η εργασιακή καθημερινότητα γίνεται πολύ πιο ευχάριστη όταν συνεργάζεσαι με τέτοιους ανθρώπους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους φίλους μου Μπαρμπούτη Αλεξάνδρα, Ψιάχο Γεώργιο, Ευαγγελοπούλου Έφη, Μοναστηριώτη Μαρία και Μακαντάνη Θωμά για την ηθική και υλική υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, καθώς επίσης τον άντρα μου και σύμμαχό μου σε όλες τις δυσκολίες που αντιμετώπισα, τους γονείς μου (π.Φώτιο και Δημητρούλα) και τα αγαπημένα μου αδέρφια (Σπύρο, Μαριλένα, Βαρβάρα και Θεοδώρα) για την συμπαράστασή τους και την αγάπη τους. Κάθε μου πράξη καθοδηγείται από την επιθυμία να τους κάνω υπερήφανους.

Μαρίνα Ασπιώτη

Αθήνα, 2017

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AIF (apoptosis inducing factor) παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης

Anti-HBs αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης S

anti-HBe αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης precore

anti-HBc αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης core

Bax επαγωγέας της απόπτωσης

Bcl-2 αναστολέας της απόπτωσης

BID προαποπτωτικό μόριο

cccDNA (covalently closed circular DNA) υπερελικωμένο κλειστό κυκλικό DNA

death domain περιοχή θανάτου

death ligand συνδέτης θανάτου

death receptor υποδοχέας θανάτου

DED (Death Effector Domain) περιοχή επιτέλεσης θανάτου

DISC (Death Inducing Signaling Complex) σύμπλεγμα σηματοδότησης θανάτου

FADD (FAS Associated Death Domain) κυτταροπλασματική περιοχή θανάτου

FASL (FAS Ligand) συνδέτης θανάτου που προσδέεται στον υποδοχέα FAS

HBIG υπεράνοση γ-σφαιρίνη

HBcAg πυρηνική πρωτεΐνη c (core) του ιού της Ηπατίτιδας B

HBeAg προπυρηνική πρωτεΐνη e (precore) του ιού της Ηπατίτιδας B

HBsAg πρωτεΐνη επιφανείας (S) του ιού της Ηπατίτιδας B - Αυστραλιανό αντιγόνο

HBV (Hepatitis B virus) Ιός της Ηπατίτιδας B

HBV-DNA ιικό φορτίου του Ιού της Ηπατίτιδας Β

hCG ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη

HIER (Heat-Induced Epitope Retrieval) Αποκάλυψη επιτόπων μέσω θέρμανσης

High Power Field μεγάλο οπτικό πεδίο (40X)

HLA (Human Leukocyte Antigens) Ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα

hPL προλακτίνη

HRP (horseradish peroxidase) μόρια υπεροξειδάσης

HVL (High Viral Load) Υψηλό ιικό φορτίο

INF- α ιντερφερόνη-άλφα

LVL (Low Viral Load) Χαμηλό ιικό φορτίο

MHC I (Major Histocompatibility complex) Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας

NDS (normal donkey serum) φυσιολογικός ορός γαϊδάρου

NK cells (Natural Killer Cells) Κύτταρα Φυσικοί Φονείς

P53 ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη

PBS (phosphate-buffered saline) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος

pro-S1 προεπιφανειακή πρωτεΐνη S1 του ιού της Ηπατίτιδας Β

pro-S2 προεπιφανειακή πρωτεΐνη S2 του ιού της Ηπατίτιδας Β

TCR (T-cell Receptor repertoire selection) Υποδοχέας των Τ-λεμφοκυττάρων

TNF (Tumor Necrosis Factor) παράγοντας νέκρωσης όγκων

TRADD (TNF-R Associated Death Domain) κυτταροπλασματική περιοχή θανάτου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	3
<u>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	8
ΚΕΦ.1^ο ΑΝΑΤΟΜΙΑ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ	9
1.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ	9
1.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ	10
1.3 ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ	12
1.4 ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ	12
1.5 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ	13
ΚΕΦ.2^ο Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β	15
2.1 ΤΑ 4 ΠΛΑΙΣΙΑ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΤΟΥ HBV	15
2.1.1 Πρωτεΐνες του περιβλήματος	15
2.1.2 Η προπυρηνική-πυρηνική περιοχή	17
2.1.3 Η περιοχή της DNA πολυμεράσης	17
2.1.4 Η περιοχή X	17
2.2 Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ HBV	18
2.3 ΟΙ ΦΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ	20
2.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	20
2.5 ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ	22
2.6 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	22
2.7 ΟΡΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ HBV ΛΟΙΜΩΞΗΣ	24

2.8 ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β	26
ΚΕΦ.3ο ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ	28
3.1 ΜΗ ΕΙΔΙΚΗ Ή ΦΥΣΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ	29
3.1.1 Ιντερφερόνες	29
3.1.2 Κύτταρα Φυσικοί Φονείς (NK cells)	30
3.2 ΕΙΔΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ	30
3.2.1 Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας	31
3.2.2 Ενεργοποίηση Τ-λεμφοκυττάρων	32
ΚΕΦ.4ο ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗ	35
4.1 ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ	37
4.1.1 Ενδογενές Μονοπάτι	38
4.1.2 Εξωγενές Μονοπάτι	39
4.2 ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ FAS - FAS LIGAND	40
<u>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	42
ΚΕΦ.5ο ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	43
5.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	43
5.2 ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	44
5.3 ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΧΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΕΥΛΙΝΗΣ-ΗΩΣΙΝΗΣ	45
ΚΕΦ.6ο ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ	47
6.1 ΑΝΤΙΣΩΜΑ anti-CD3	48
6.1.1 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για το anti-CD3	48
6.2 ΑΝΤΙΣΩΜΑ anti-CD4	50

6.2.1 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για το anti-CD4	51
6.3 ΑΝΤΙΣΩΜΑ anti-CD8	53
6.3.1 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για το anti-CD8	53
6.4 ΑΝΤΙΣΩΜΑ HBsAg	55
6.4.1 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για το HBsAg	56
6.5 ΑΝΤΙΣΩΜΑ HBcAg	58
6.5.1 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για το HBcAg	58
ΚΕΦ.7ο ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	61
7.1 ΔΙΠΛΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΓΙΑ anti-CD8 ΚΑΙ anti-CD28	61
7.2 ΔΙΠΛΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ anti-CD8 ΚΑΙ anti-FAS LIGAND	64
7.3 ΔΙΠΛΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ anti-CD8 ΚΑΙ anti-FAS	67
ΚΕΦ.8ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	70
8.1 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ ΜΕΤΑ ΤΗ ΧΡΩΣΗ Η/Ε	70
8.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ	72
8.2.1 Ανοσοεντοπισμός HBsAg και HbcAg	72
8.2.2 Ανοσοεντοπισμός CD3, CD4 και CD8	73
8.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΙΠΛΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	78
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	84
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	97
ABSTRACT	99
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	101
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	105

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦ. 1^ο ΑΝΑΤΟΜΙΑ – ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ

1.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης αναπτύσσεται ένα σύστημα υμένων ή εμβρυϊκών μεμβρανών που περιβάλλουν το έμβryo. Η συγχώνευση αυτών των μεμβρανών με το βλεννογόνο της μήτρας σηματοδοτεί την έναρξη σχηματισμού του πλακούντα. Ο σάκος των εμβρυϊκών υμένων αναπτύσσεται εντός της κοιλότητας της μήτρας και σε επαφή με το ενδομήτριο, ενώ το έμβryo συνδέεται με αυτόν μέσω του ομφάλιου λώρου [1]. Ο σχηματισμός του πλακούντα ξεκινά με την εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο την 10^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου και τερματίζεται κατά τον τοκετό [2]. Ενώ ο πλακούντας δείχνει εκτεταμένη ιστολογική ανάπτυξη στο δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, η βασική του μορφολογία είναι ήδη καθορισμένη από πολύ νωρίς στην κύηση, πριν το τέλος του πρώτου τριμήνου.

Ο πλακούντας είναι ένα ιδιαιτέρως ξεχωριστό όργανο. Δημιουργείται, λειτουργεί και υποστρέφει σε 40 εβδομάδες στη φυσιολογική κύηση. Σχηματίζεται από ιστούς που προέρχονται από τη μητέρα (φθατρός) και από το έμβryo (άμνιο, χόριο-χοριακές λάχνες, ομφάλιος λώρος). Καθ'όλη τη διάρκεια της κύησης διαφοροποιείται και εκτελεί βασικές λειτουργίες σχεδόν όλων των εμβρυϊκών συστημάτων. Πιο συγκεκριμένα, υποκαθιστά τα ανώριμα εμβρυϊκά όργανα και επιτελεί, πλήρως ή μερικώς, λειτουργίες ανάλογες με αυτές των πνευμόνων (ανταλλαγή αερίων: O₂ και CO₂ μεταξύ μητέρας και κυήματος), του εντέρου (απορρόφηση θρεπτικών συστατικών και καταβολισμός), των νεφρών (απέκκριση και ρύθμιση ιόντων, εξισορρόπηση υγρών και pH), του ήπατος (σύνθεση πρωτεϊνών, μεταβολισμός ουσιών), της υπόφυσης (σύνθεση ορμονών) και γενικότερα επιτελεί συνθετικές και εκκριντικές λειτουργίες ανάλογες των ενδοκρινών αδένων.

Επιπλέον, ο πλακούντας παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της θερμοκρασίας, ενώ συμμετέχει σε ανοσολογικές ρυθμίσεις καθ'όλη τη διάρκεια της κύησης [3]. Ακόμη, κατά τη διάρκεια των πρώτων εβδομάδων της κύησης συμμετέχει στην αιμοποίηση (εξωμυελικά), ενώ στους 2,5 μήνες της ανάπτυξης (2^{ος}-3^{ος} μήνας ενδομήτριας ζωής) η εξωμυελική φάση της αιμοποίησης αντικαθίσταται από την μυελολυμφατική φάση, η οποία είναι και η οριστική φάση της αιμοποίησης έως τη γέννηση. Στην εξασφάλιση όλων

των παραπάνω λειτουργιών του πλακούντα συμμετέχουν τα εμβρυϊκά αγγεία από την αλλαντοΐδα του εμβρύου [1].

1.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ

Το βασικό δομικό στοιχείο του πλακούντα είναι ο τροφοβλαστικός ιστός. Η τροφοβλάστη επιτελεί την δράση ενδοκρινούς οργάνου, εκκρίνοντας πρωταρχικά τη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) αναστέλλοντας τον εμμηνορρυσιακό κύκλο, ενώ συνολικά παράγει περισσότερους από 35 παράγοντες (πρωτεάσες και αναστολείς πρωτεασών, στεροειδείς και πεπτιδικές ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες, hPL-προλακτίνη και οξυτοκίνη κ.α.). Η τροφοβλάστη επιπλέον ρυθμίζει την εμφύτευση της βλαστοκύστης, λειτουργεί ως αγωγός επικοινωνίας μεταξύ εμβρύου και μητέρας με την κυκλοφορία του αίματος, ενώ σχηματίζει και τις λάχνες του πλακούντα [1-3].

Ο τροφοβλαστικός ιστός αποτελεί τον πρόδρομο των εμβρυϊκών μεμβρανών και του πλακούντα. Τέσσερις με πέντε ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, η τροφοβλάστη διαφοροποιείται από τα εξωτερικά κύτταρα του μοριδίου, καθώς αυτό μεταπίπτει σε βλαστοκύστη. Τα τροφοβλαστικά κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται με εκθετικό ρυθμό ανάπτυξης και περιβάλλουν εσωτερικά την επιφάνεια της βλαστοκύστης. Η προσκόλληση στο ενδομήτριο και η εμφύτευση λαμβάνουν συνήθως χώρα στο ανώτερο τμήμα του οπισθίου τοιχώματος της μήτρας την 6^η με 7^η ημέρα οπότε και η βλαστοκύστη ενσωματώνεται στο ενδομήτριο, ενώ σταδιακά με την πάροδο της κύησης, δημιουργεί προσεκβολές προς την ενδομητρική κοιλότητα. Ταυτόχρονα το στρώμα του ενδομητρίου υφίσταται αλλαγή σε φθαρό [4].

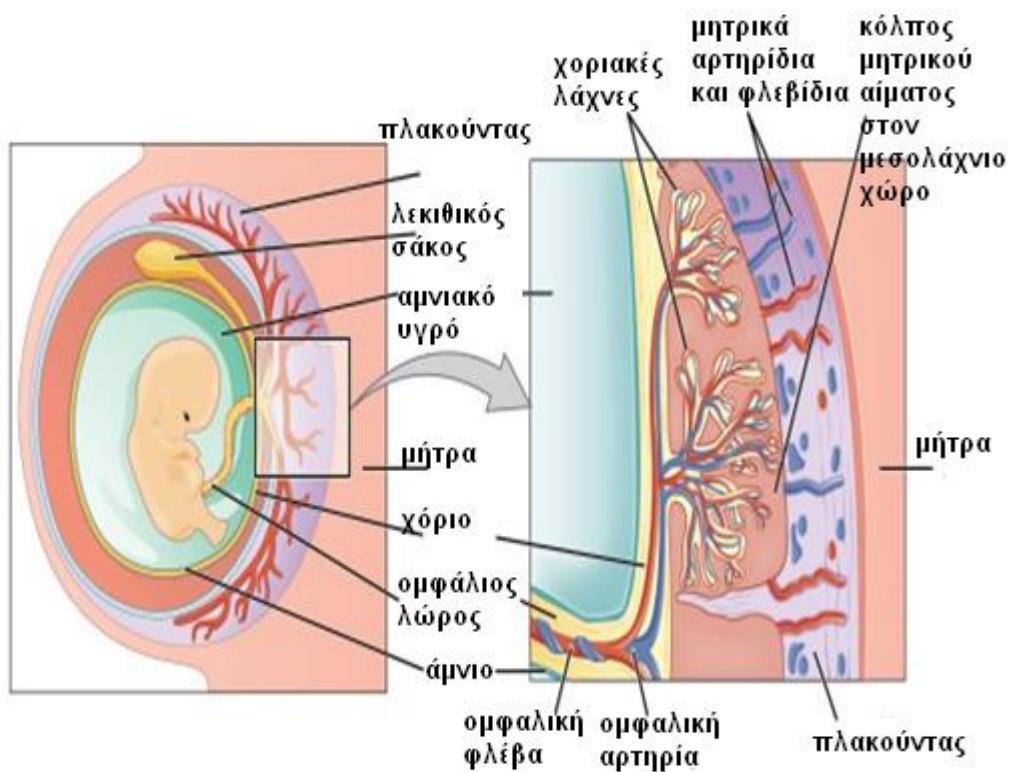
Ιστολογικά, η τροφοβλάστη διαφοροποιείται σε τρεις τύπους κυττάρων:

- **την κυτταροτροφοβλάστη**, το αρχέγονο κύτταρο με την έντονη μιτωτική δραστηριότητα και διηθητική ικανότητα, η οποία περιβάλλει το άμνιο και το λεκιθικό σάκο και αποτελείται από μικρά μονοπύρρηνα κύτταρα με σαφή κυτταρικά όρια, στρογγυλούς πυρήνες με μονήρη φυσαλιδώδη πυρήνια και ελάχιστο διαυγές ή ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα.

- **την συγκυτιοτροφοβλάστη**, την επιθηλιακή επικάλυψη του χοριακού τροφοβλαστικού μανδύα, η οποία μικροσκοπικά αφορά σε συγκυτιακές αθροίσεις πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων με άφθονο ηωσινόφιλο ή βασεόφιλο κυτταρόπλασμα, συχνά με πολλαπλά κυτταροπλασματικά κενοτόπια και έντονους βαθυχρωματικούς πυρήνες, με μικρολαχνώδη παρυφή και απουσία μιτωτικής δραστηριότητας.

- **την ενδιάμεση τροφοβλάστη**, η οποία βρίσκεται μεταξύ των κυττάρων του φθαρτού και του μυομητρίου και έχει την ικανότητα να διηθεί τα μητρικά αγγεία. Η μορφολογία των κυττάρων, ανάλογα με τη θέση εντόπισης, ποικίλει από πολυεδρικά έως ατρακτόμορφα με άφθονο αμφοφιλικό και κενοτοπιώδες κυτταρόπλασμα και υπερχρωματικούς πυρήνες.

Η κυκλοφορία του αίματος εγκαθιδρύεται στην 10^η με 12^η ημέρα της κύησης, όταν τα ενδιάμεσα τροφοβλαστικά κύτταρα εισβάλλουν εντός του τοιχώματος της μήτρας και της μητρικής αγγείωσης και διαβρώνουν τα μητρικά αιμοφόρα αγγεία [4].



Εικόνα 1: Ενδεικτική τομή πλακούντα

1.3 ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ

Ο τελειόμηνος, πλήρως σχηματισμένος πλακούντας αποτελείται από:

- **Τον πλακουντιακό δίσκο**, ο οποίος συμπεριλαμβάνει το χοριονικό πέταλο με το άμνιο, το χόριο και την υποχοριονική ινική, το κυρίως παρέγχυμα με τις χοριακές λάχνες και τον μεσολάχνιο χώρο, τα διαφράγματα και τα νησίδια της εξωλάχνιας ή ενδιάμεσης τροφοβλάστης και το βασικό πέταλο που περιλαμβάνει το βασικό φθαρτό, ινδοειδή ουσία, αθροίσεις ενδιάμεσης τροφοβλάστης και μητρικά αγγεία.
- **Τις εξωπλακουντιακές μεμβράνες** ή υμένες, που αποτελούνται από το άμνιο, το χόριο, τον γνήσιο φθαρτό και υπολείμματα λεκιθικού ασκού.
- **Τον ομφάλιο λώρο**, στον οποίο ανευρίσκονται ο χαλαρός συνδετικός ιστός του Wharton, δύο ομφαλικές αρτηρίες και μία ομφαλική φλέβα, καθώς και υπολείμματα αλλαντοϊκού και ομφαλομεσεντερικού πόρου [5].

1.4 ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ

Η παθολογοανατομική εξέταση του πλακούντα μετά τη γέννηση και η λεπτομερής μελέτη των χαρακτηριστικών του είναι απαραίτητη για την ανίχνευση πιθανών ανωμαλιών που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη νεογνική ευημερία, καθώς και να δώσει απαντήσεις σε παθολογικές κυήσεις [6].

Ο ώριμος, τελειόμηνος πλακούντας είναι ένα δισκοειδούς σχήματος όργανο, υποστρογγύλο, εν μέρει επιπεδωμένο, με μαλακή, σπογγώδη και εύθρυπτη σύσταση. Η μέγιστη διάμετρός του είναι 20-22 εκ., ενώ το μέγιστο πάχος είναι 2,5 εκ. Έχει βάρος κατά μέσο όρο περίπου 470 γραμμ., αν και πολλοί παράγοντες επηρεάζουν το βάρος του (όπως ο χρόνος αφαίρεσης και παράδοσης στο εργαστήριο, η ζύγιση πριν ή μετά τη μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδη 10%, ο χρόνος της απολίνωσης του ομφάλιου λώρου κ.α.) [7-8].

Μετά τη μονιμοποίηση, μακροσκοπικά μπορούν να παρατηρηθούν δύο επιφάνειες στον πλακούντα: η έσω ή εμβρυϊκή και η έξω ή μητριαία επιφάνεια [7].

Η εμβρυϊκή επιφάνεια του πλακούντα εμπεριέχει την χοριακή πλάκα, η οποία εμφανίζεται επίπεδη με λεία και στιλπνή επιφάνεια με μελανέρυθρη χροιά, ενώ καλύπτεται από άμνιο, αμνιακό μεσέγγυμα και συνδετικό ιστό. Αυτοί οι ιστοί αποτελούν τον αμνιακό σάκο, εντός του οποίου αναπτύσσεται το έμβρυο [4-7]. Το άμνιο είναι μια λεπτή μεμβράνη, η οποία επαλείφει το χοριονικό πέταλο και τα αγγεία της εμβρυϊκής επιφάνειας και επικάθεται στο υποκείμενο χόριο. Αποτελείται από κυβοειδή κύτταρα και ελάχιστο συνδετικό υπόστρωμα, ενώ συμμετέχει στην παραγωγή αμνιακού υγρού. Στις περισσότερες περιπτώσεις στην εμβρυϊκή επιφάνεια αναγνωρίζεται έκκεντρα το σημείο πρόσφυσης του ομφάλιου λώρου [7].

Η έξω επιφάνεια του πλακούντα (βασικό πέταλο ή μητριάια επιφάνεια) κατά τη διάρκεια της κύησης είναι προσκολλημένη στο τοίχωμα της μήτρας, ενώ μετά τον τοκετό διαχωρίζεται από το σώμα της μήτρας και γίνεται εμφανής. Η μητριάια επιφάνεια του πλακούντα αποτελεί ένα μίγμα εμβρυϊκής εξωλαχνωτής τροφοβλάστης και φθαρτό υμένα της μήτρας [7]. Έχει χροιά βαθυέρυθρη και αιμορραγική, ενώ η όψη της είναι σπογγώδης και λοβωτή. Η μητριάια επιφάνεια καλύπτεται από το βασικό πέταλο, το οποίο έχει υφή φθαρτού. Η επιφάνεια του βασικού πετάλου τέμνεται από διασταυρούμενες αύλακες του πλακούντα, σχηματίζοντας βαθιές σχισμές και διαιρώντας την σε 10-30 υπόκυρτες περιοχές, που ονομάζονται κοτυληδόνες (λοβοί ή λοβίδια) [9].

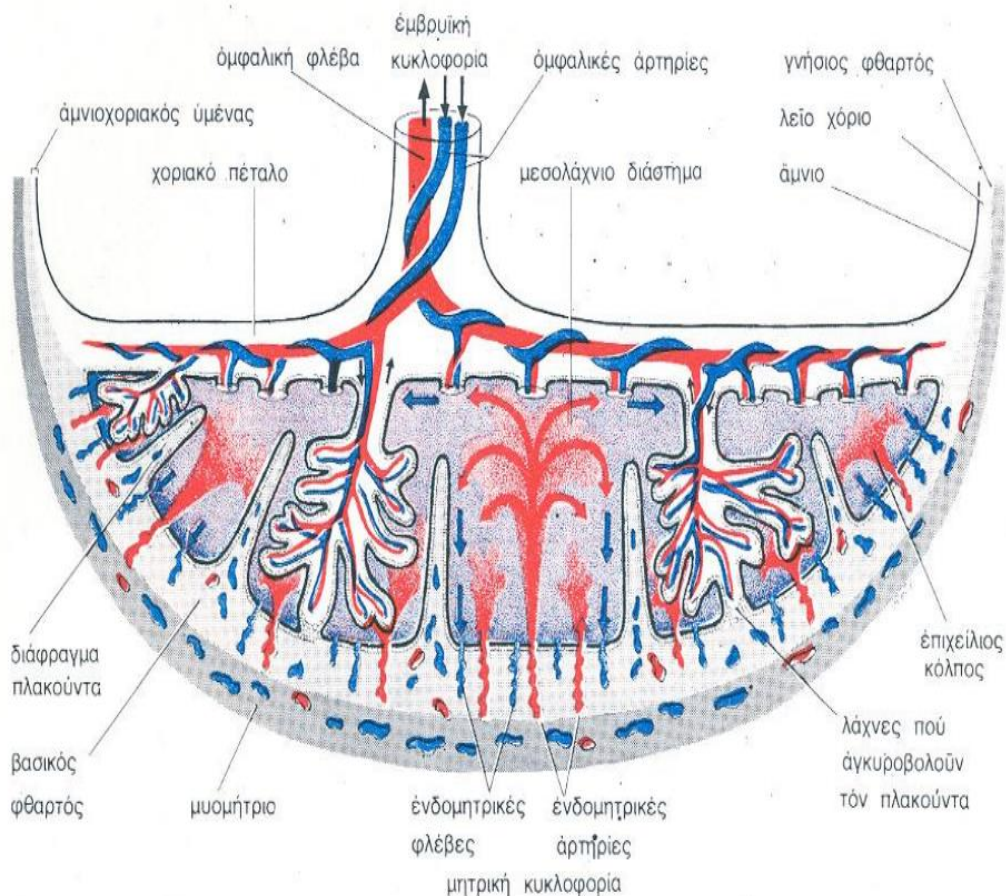
1.5 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ

Ο πλακούντας αποτελείται από το βασικό και το χοριονικό πέταλο. Το βασικό πέταλο αποτελείται από το συγκύτιο (το εξωτερικό τοίχωμα του μεσολάχιου χώρου), την μεμβράνη του Roh, την μεμβράνη του Nitabuch, φθαρτό και υπολείμματα τροφοβλαστικού ιστού. Το χοριονικό πέταλο αποτελείται από μεσέγγυμα και τροφοβλαστικά κύτταρα, ενώ ταυτόχρονα περικλείει τα ομφαλικά αγγεία.

Μεταξύ βασικού και χοριονικού πετάλου διαμορφώνονται οι διακλαδώσεις των χοριακών λαχνών και ο μεσολάχιος χώρος. Οι λάχνες είναι θηλωματώδεις και διακλαδιζόμενες προσεκβολές της τροφοβλάστης, οι οποίες εξορμώνται από το χοριονικό πέταλο και αποτελούν βασικό δομικό συστατικό του ώριμου πλακούντα. Σε έναν τελειόμηνο πλακούντα αναγνωρίζονται περίπου 40-60 λαχνωτά δέντρα ή εμβρυϊκές κοτυληδόνες.

Εντός του στρώματος των χοριακών λαχνών αναπτύσσονται τα εμβρυϊκά αγγεία, ενώ περιέχει κύτταρα συνδετικού ιστού, κύτταρα Hofbauer (ιστικά μακροφάγα-αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα τάξης II του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας), πλασματοκύτταρα και ελεύθερα λιπίδια. Οι χοριακές λάχνες υποβάλλονται σε σημαντικές αλλαγές κατά τη διάρκεια μιας φυσιολογικής κύησης, συμβατές με την ανάπτυξη και ωρίμανση του πλακούντα. Στον τελειόμηνο πλακούντα, οι ώριμες λάχνες περικλείουν αρκετά τριχοειδή και διατεταμένα κολλοειδή. Το σημείο αυτό, λόγω της αγγειοβρίθειας, ευθύνεται για την ανταλλαγή αερίων και ουσιών μεταξύ της μητέρας και του εμβρύου [10].

Στην παρούσα εργασία, στις τομές που ελήφθησαν από τους εξεταζόμενους πλακούντες, αναγνωρίζονται τόσο η μητριαία επιφάνεια (φθαρτός), όσο και οι χοριακές λάχνες.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση τομής φυσιολογικού τελειόμηνου πλακούντα

ΚΕΦ. 2° Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β

Ο ιός της ηπατίτιδας Β (Hepatitis B virus-HBV) είναι ένας DNA ιός με διάμετρο 42 nm και ανήκει στην οικογένεια Hepadnaviridae. Χαρακτηριστικό των ιών αυτής της οικογένειας είναι ο τροπισμός για τα ηπατοκύτταρα, προκαλώντας ηπατίτιδα (οξεία και χρόνια), καθώς και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [12]. Ο ιός της ηπατίτιδας Β προσβάλλει τα ηπατοκύτταρα και προκαλεί τη νόσο της ηπατίτιδας Β, μια λοίμωξη του ήπατος με μεγάλη θνησιμότητα και νοσηρότητα παγκοσμίως. Η ηπατίτιδα Β μπορεί να εμφανιστεί ως οξεία ή χρόνια λοίμωξη, με την χρόνια να αποτελεί την κυριότερη αιτία κίρρωσης του ήπατος, ενώ σχετίζεται σημαντικά με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε έδαφος κίρρωσης. Παγκοσμίως έχουν αναγνωρισθεί οκτώ γονότυποι (Α,Β,С,D,Е,F,G,H) του ιού μέχρι σήμερα.

Ο ιός της ηπατίτιδας Β περιέχει κυκλικό, μερικώς δίκλωνο DNA (relaxed circular, partially double-stranded DNA) με μέγεθος 3,2 kb και φέρει πολύπλοκη δομή [13]. Εξωτερικά καλύπτεται από πρωτεϊνικό περίβλημα, το οποίο αποτελείται από την πρωτεΐνη επιφανείας (S) με αντιγονικό επίτοπο HBsAg και τις πρωτεΐνες προ-S1 και προ-S2. Ο νουκλεοκαψιδικός πυρήνας είναι σφαιρικός και αποτελείται από το DNA του ιού 3200 βάσεων, την DNA πολυμεράση που δρα ως ανάστροφη μεταγραφάση και την πυρηνική πρωτεΐνη (c) με επίτοπο HBcAg [12].

Το γονιδίωμα του ιού της ηπατίτιδας Β έχει 4 πλαίσια ανάγνωσης [14-15], τα οποία αλληλοεπικαλύπτονται σε σημαντική έκταση και κωδικοποιούν το σχηματισμό επτά πολυπεπτιδίων: την DNA πολυμεράση του ιού, τις πρωτεΐνες του εξωτερικού περιβλήματος, την πυρηνική πρωτεΐνη core (c), την προπυρηνική πρωτεΐνη precore (e) και την πολυλειτουργική πρωτεΐνη X [12].

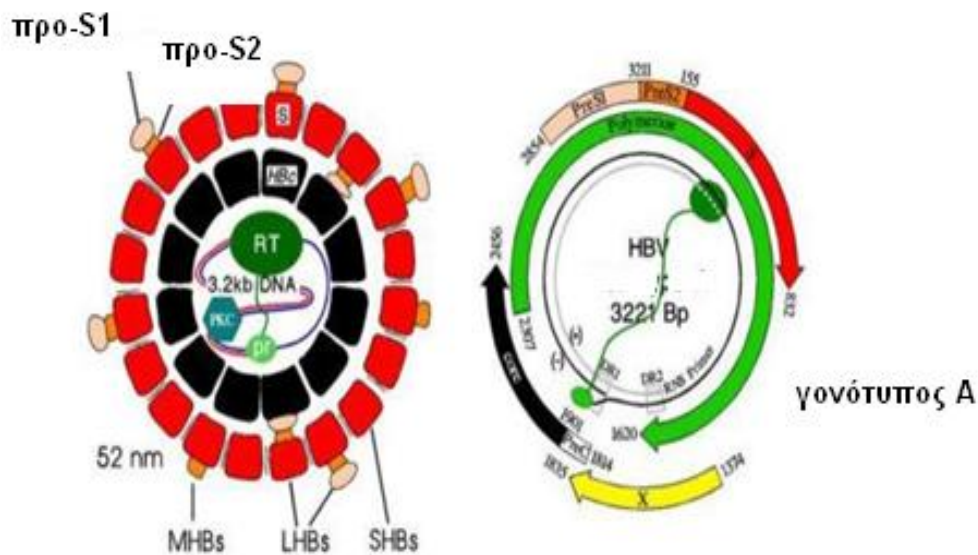
2.1 ΤΑ 4 ΠΛΑΙΣΙΑ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΤΟΥ HBV

2.1.1 Πρωτεΐνες του περιβλήματος

Το πλαίσιο ανάγνωσης της πρωτεΐνης του περιβλήματος του ιού, καλύπτει περισσότερο από το ένα τρίτο του ιικού γονιδιώματος και είναι κωδικό για τρεις πρωτεΐνες: την

πρωτεΐνη επιφανείας (S), την προεπιφανειακή πρωτεΐνη S1 και την προεπιφανειακή πρωτεΐνη S2 [16].

Η πρωτεΐνη S περιέχει το αντιγόνο επιφανείας (HBsAg), γνωστό και ως Αυστραλιανό αντιγόνο και καλύπτει το ένα τρίτο του ιικού γονιδιώματος. Εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο, ενώ οι προεπιφανειακές (προ-S1 και προ-S2) είναι μεγαλύτερες, εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο [16] και φαίνεται να βοηθούν τον ιό να εισβάλει στο ηπατοκύτταρο, αφού ο HBV συνδέεται με υποδοχέα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης μέσω του αμινικού άκρου της επιφανειακής πρωτεΐνης [17-18]. Οι προεπιφανειακές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν T και B κυτταρικούς επιτόπους.



Εικόνα 3: Το γονιδίωμα του HBV

Το Αυστραλιανό αντιγόνο δεν είναι λοιμογόνο, διότι δεν περιέχει DNA του ιού και αποτελείται από άλλα αντιγόνα, βάσει των οποίων υποδιαιρείται σε τέσσερις αντιγονικούς υποτύπους: adw, ayw, adr και ayr και σε εννέα ορότυπους: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq- και adrq+ [19-20]. Οι υπότυποι και οι ορότυποι δεν έχουν διαφορά

στην λοιμογόνο δράση ή την κλινική εικόνα, ωστόσο η διάκρισή τους είναι σημαντική για επιδημιολογικούς λόγους.

2.1.2 Η προπυρηνική-πυρηνική περιοχή

Διαθέτει δύο κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης (ATG) και είναι κωδική για δύο πρωτεΐνες: την πρωτεΐνη e και την πρωτεΐνη c. Η μετάφραση της πρωτεΐνης e αρχίζει από το πρώτο κωδικόνιο, ενώ της c από το δεύτερο [21].

Η πρωτεΐνη e αποτελείται από 212 αμινοξέα και στο αμινοτελικό της άκρο υπάρχει ένα πεπτίδιο 29 αμινοξέων το οποίο, μετά τη σύνθεσή της, την κατευθύνει εντός του ενδοπλασματικού δικτύου των ηπατοκυττάρων. Η πρωτεΐνη e δεν αποτελεί δομική πρωτεΐνη του ιού, αλλά δείκτη ο οποίος σχετίζεται με τον ενεργό πολλαπλασιασμό του [21-22].

Η πρωτεΐνη c αποτελείται από 183 αμινοξέα και μεταφέρεται στον πυρήνα των ηπατοκυττάρων με οδηγό το καρβοξυτελικό της άκρο. Εκφράζει τον αντιγονικό επίτοπο HBcAg, χρησιμοποιείται για τη δόμηση νέων ικών σωματιδίων και είναι απαραίτητη για την αναπαραγωγή του ιού [22].

2.1.3 Η περιοχή της DNA πολυμεράσης

Το πλαίσιο ανάγνωσης της DNA πολυμεράσης είναι κωδικό για πρωτεΐνη 812 αμινοξέων, η οποία αποτελείται από την τελική πρωτεΐνη, την ανάστροφη μεταγραφάση, την RNAάση και την πολυμεράση [21-22].

2.1.4 Η περιοχή X

Αυτή η περιοχή κωδικογραφεί την πρωτεΐνη X, η οποία αποτελείται από 154 αμινοξέα και ενώ ο ρόλος της ακόμη παραμένει άγνωστος, εικάζεται ότι η χρησιμότητά της έγκειται στο να ελέγχει την ένταση και τον τρόπο πολλαπλασιασμού του ιού, ενώ πιθανολογείται ο ρόλος της στην ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου [23].

2.2 Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ HBV

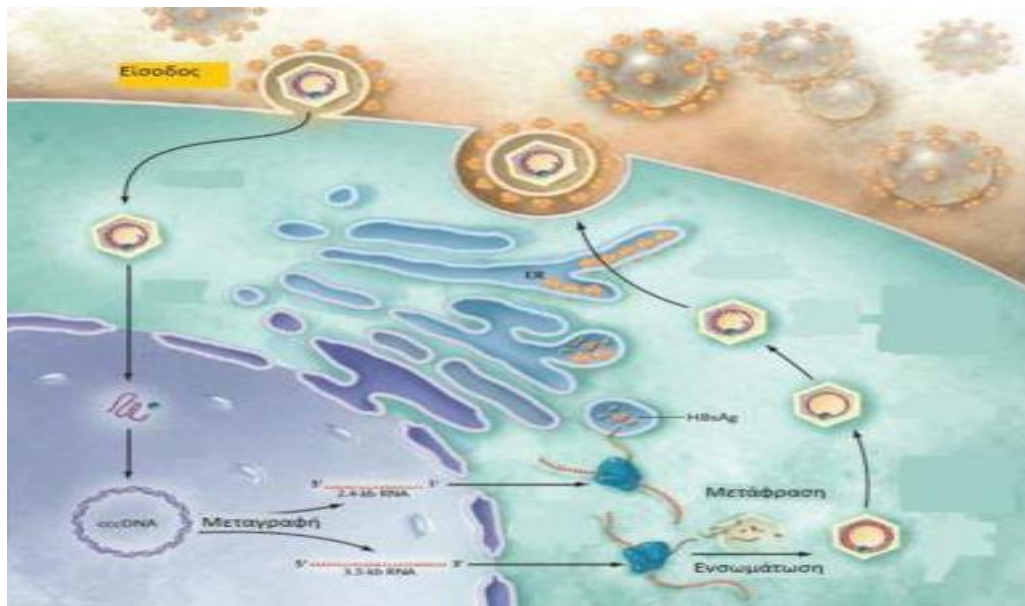
Το γονιδιώμα του ιού της ηπατίτιδας Β πολλαπλασιάζεται μέσω ενός διάμεσου RNA μεσολαβητή, χρησιμοποιώντας τη δική του τρoνσκριπτάση που είναι τμήμα της DNA πολυμεράσης του ιού. Ο HBV πολλαπλασιάζεται στα ηπατοκύτταρα, αλλά μπορεί να πολλαπλασιαστεί επίσης στα παγκρεατικά κύτταρα, στα σπληνοκύτταρα, στα νεφρικά σωληνάρια και ενδεχομένως στα λεμφοκύτταρα [24].

Ο ιός της ηπατίτιδας Β κυκλοφορεί στον ορό ως σωματίο Dane, το οποίο προσκολλάται στη μεμβράνη του ηπατοκυττάρου, αποβάλλει το περίβλημά του και με ενδοκυττάρωση από την κολποειδική περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης, μετακινείται στον πυρήνα. Εν συνεχεία, η ανάστροφη τρoνσκριπτάση αποκόπτεται από το 5' άκρο της αρνητικής αλυσίδας, ταυτόχρονα με ένα μικρό τμήμα RNA από το 5' άκρο της θετικής αλυσίδας, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του DNA από το πυρηνοκαψίδιο του ιού και την μεταφορά του στον πυρήνα του ηπατοκυττάρου, όπου οργανώνεται γύρω από νουκλεοσώματα για να ωριμάσει και να σχηματιστεί το μικροχρωμόσωμα του ιού με υπερελικωμένο κλειστό κυκλικό DNA (covalently closed circular DNA) [25]. Το cccDNA αποτελεί τον οδηγό για τη μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος από την RNA πολυμεράση [24].

Τουλάχιστον τέσσερα RNA μετάγραφα έχουν ανακαλυφθεί: ένα προγενωμικό RNA και τρία υπογενωμικά mRNA, τα οποία συντίθενται με την δράση της RNA πολυμεράσης και μεταφράζονται στις πρωτεΐνες-συστατικά του ιού [26]. Το προγενωμικό με ανάστροφη μεταγραφή αποτελεί τον οδηγό πολλαπλασιασμού του γονιδιώματος, ενώ ως mRNA χρησιμεύει για την σύνθεση του HBcAg, του HBeAg και της πολυμεράσης του ιού HBV [27]. Τα τρία υπογενωμικά mRNA μεταφράζονται στις πρωτεΐνες του περιβλήματος και της πρωτεΐνης X [27]. Μετά την μεταγραφή, το προγενωμικό RNA μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα του ηπατοκυττάρου, όπου σχηματίζεται το νουκλεοκαψίδιο (core) του ιού [28]. Μέσα στο νουκλεοκαψίδιο του HBV, το προγενωμικό RNA μεταγράφεται ανάστροφα σε κυκλικό, μερικώς δίκλωνο DNA με τη βοήθεια της ιικής πολυμεράσης. Η σύνθεση ξεκινάει από την αρνητική αλυσίδα με την δράση της ανάστροφης τρoνσκριπτάσης και συνεχίζεται και στη θετική αλυσίδα του DNA, με οδηγό την αρνητική [29]. Στη συνέχεια τα νουκλεοκαψίδια μετακινούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου περιβάλλονται από πρωτεΐνες επιφανείας και είτε εξέρχονται από το

ηπατοκύτταρο, είτε μεταφέρονται εκ νέου στον πυρήνα του κυττάρου για να απελευθερώσουν το γονιδίωμα του ιού και να παραχθεί cccDNA [30].

Στα πρώτα στάδια της λοίμωξης, ο αριθμός των περιβλημάτων είναι μικρός και τα νουκλεοκαψίδια δεν ακολουθούν την οδό προς το ενδοπλασματικό δίκτυο, αλλά επιστρέφουν προς τον πυρήνα για να ελευθερωθεί το γονιδίωμα του ιού και να συγκεντρωθεί αρκετό cccDNA. Ταυτόχρονα παράγονται συνεχώς από τα αντίστοιχα mRNA οι πρωτεΐνες επιφανείας και όταν επιτευχθεί μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών του περιβλήματος, τότε ξεκινάει ο μηχανισμός αρνητικής ανάδρασης στο cccDNA [29], έχοντας ως αποτέλεσμα την κατεύθυνση των νουκλεοκαψιδίων προς την οδό του ενδοπλασματικού δικτύου για τον σχηματισμό βιρίων και την μόλυνση περισσότερων κυττάρων [31].



Εικόνα 4: Κύκλος αναπαραγωγής του HBV

Η λοίμωξη από ηπατίτιδα Β, οξεία ή χρόνια, προϋποθέτει σταθερό πολλαπλασιασμό μορίων cccDNA για την συνεχή παραγωγή του προγενωμικού RNA και των ιικών πρωτεϊνών. Υπολογίζεται ότι ο αριθμός του cccDNA ανά ηπατοκύτταρο κυμαίνεται από 5 έως 50 μόρια, ενώ παρουσιάζει και μακρά περίοδο ημίσειας ζωής [24]. Για το λόγο αυτό, βασικό πρόβλημα στην θεραπεία της ηπατίτιδας Β είναι η εκρίζωση του cccDNA από το ήπαρ, καθώς και η αντοχή του σε θεραπευτικά σχήματα [32].

2.3 ΟΙ ΦΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ

Η λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας Β περιλαμβάνει τρεις ή τέσσερις φάσεις:

- **Φάση της ανοχής ή πρώτη φάση.** Στην φάση αυτή, το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς παρουσιάζει αδράνεια μπροστά στον ταχύτατα αναπτυσσόμενο ιό. Η πρώτη φάση διαρκεί περίπου δύο με τέσσερις εβδομάδες στον ενήλικα και αντιστοιχεί σε περίοδο επώασης της οξείας λοίμωξης [33], ενώ κατά την περιγεννητική μετάδοση της ηπατίτιδας Β, η φάση ανοχής διαρκεί δεκαετίες [34]. Στη φάση αυτή, επειδή δεν υπάρχει ανοσολογική απάντηση, δεν υπάρχει ηπατική φλεγμονή, ενώ και οι ηπατικές δοκιμασίες εμφανίζονται φυσιολογικές ή σχεδόν φυσιολογικές.
- **Φάση της κάθαρσης ή δεύτερη φάση.** Στη φάση αυτή συνεχίζεται ο ικός πολλαπλασιασμός, αλλά το ανοσοποιητικό σύστημα προσπαθεί να τον καταπολεμήσει. Κατά την οξεία λοίμωξη, η δεύτερη φάση μπορεί να διαρκέσει από δύο έως τέσσερις εβδομάδες και συνυπάρχει με κλινικά συμπτώματα, ενώ στη χρόνια λοίμωξη διαρκεί από μήνες έως και χρόνια [33]. Στη φάση αυτή ο ιός προκαλεί συμπτώματα και ηπατικές βλάβες, ενώ ανιχνεύονται στο αίμα αυξημένες τρανσαμινάσες και το αυστραλιανό αντιγόνο. Αν το ανοσοποιητικό σύστημα καταφέρει να ελέγξει τον ιό, τότε η νόσος υποστρέφει, αλλιώς ο ασθενής οδηγείται σε παρατεταμένη περίοδο ηπατικής φλεγμονής με συχνή κατάληξη την κίρρωση [33].
- **Φάση της ενσωμάτωσης ή τρίτη φάση.** Κατά τη φάση αυτή το ικό DNA ενσωματώνεται σε αυτό του ηπατοκυττάρου και μειώνεται κατά πολύ ο ρυθμός του πολλαπλασιασμού του. Τα επίπεδα ιαιμίας είναι χαμηλά και ο ασθενής έχει χαμηλή μολυσματικότητα. Η φάση αυτή είναι η φάση της φορείας του ιού και διαρκεί εφ' όρου ζωής, αν ο ασθενής δεν υποτροπιάσει και αναζωπυρωθεί ο ιός (**φάση αναζωπύρωσης ή τέταρτη φάση**) [35].

2.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας Β αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για την δημόσια υγεία, καθώς υπολογίζεται ότι σχεδόν 2 δισεκατομμύρια άνθρωποι είτε νοσούν, είτε έχουν νοσήσει στο παρελθόν από τον HBV. Σύμφωνα με την έκθεση του Παγκόσμιου

Οργανισμού Υγείας που δημοσιεύτηκε τον Απρίλιο του 2017, η ιική ηπατίτιδα προκάλεσε 1,34 εκατομμύρια θανάτους το 2015, εκ των οποίων 720.000 θάνατοι προήλθαν από χρόνια ηπατική νόσο (κίρρωση ή πρωτοπαθή καρκίνο του ήπατος). Το 2015 σε παγκόσμιο επίπεδο 257 εκατομμύρια άνθρωποι ζούσαν με χρόνια μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας Β, σύμφωνα με την έκθεση του WHO [36]. Η λοίμωξη από τον HBV μεταπίπτει σε χρονιότητα περίπου σε ποσοστό 5%, ενώ η χρόνια φορεία προκαλεί σε σημαντικό βαθμό κίρρωση του ήπατος, ηπατική ανεπάρκεια και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [37].

Ο ιός παρουσιάζει ποικιλία ενδημικότητας με βάση τη γεωγραφική κατανομή. Υψηλή ενδημικότητα εμφανίζεται στην Κίνα και τη Νοτιοανατολική Ασία, στη Μέση Ανατολή, την Ανατολική Ευρώπη και την Κεντρική Αφρική. Σε αυτές τις περιοχές, το μεγαλύτερο ποσοστό νέων λοιμώξεων συμβαίνει είτε κάθετα από τη μητέρα στο παιδί, είτε στην παιδική ηλικία [36].

Ομάδες υψηλού κινδύνου αποτελούν οι εργαζόμενοι στον χώρο της υγείας, οι χρήστες ναρκωτικών ουσιών και άτομα με “απρόσεκτη” σεξουαλική συμπεριφορά [36]. Άλλωστε η μετάδοση του ιού γίνεται ακόμη και με μια μικρή ποσότητα αίματος.

Καταλυτική τα τελευταία 20 χρόνια ήταν η ανακάλυψη του εμβολίου έναντι της ηπατίτιδας Β. Ο συστηματικός εμβολιασμός, καθώς και η ανακάλυψη νέων φαρμάκων κατάφεραν να μειώσουν σημαντικά τον επιπολασμό της νόσου, κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες.

Η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις περιοχές ενδιάμεσης ενδημικότητας με επιπολασμό HBsAg 2-7%, ενώ ο κύριος γονότυπος που συναντάται στην Ελλάδα και γενικότερα στις περιοχές της Μεσογείου είναι ο γονότυπος D. Σε παλαιότερες μελέτες η Ελλάδα είχε υψηλότερο επιπολασμό, ωστόσο λόγω της κατάλληλης διαπαιδαγώγησης, της ενημέρωσης του πληθυσμού και της εισαγωγής του εμβολιασμού (από το 1998), ο επιπολασμός της ηπατίτιδας έχει μειωθεί σήμερα περίπου στο 1,5-3% σύμφωνα με έκθεση του ΚΕΕΛΠΝΟ, με τα ποσοστά αυτά να αυξάνονται στις ομάδες των μεταναστών [38]. Σημαντικό ρόλο στην μείωση των κρουσμάτων ηπατίτιδας Β έπαιξε και η εκπαίδευση του υγειονομικού προσωπικού, ενώ καθιερώθηκε και υποχρεωτικός προγεννητικός έλεγχος.

2.5 ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ

Ο ιός της ηπατίτιδας Β μεταδίδεται με μολυσμένα υγρά του σώματος (αίμα, σπέρμα, σίελος), ενώ ως τρόποι μετάδοσης αναγνωρίζονται :

- η περιγεννητική (κατά τον τοκετό ή τον θηλασμό),
- η σεξουαλική επαφή με μολυσμένο άτομο χωρίς προφύλαξη,
- η χρήση μολυσμένων αντικειμένων (ξυραφάκια, σύριγγες, βελόνα τατουάζ)
- η μετάγγιση με μολυσμένο αίμα (εξαιρετικά σπάνιο σήμερα)

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ηπατίτιδα Β δεν μεταδίδεται από νερό, τροφή, μαγειρικά σκεύη, τουαλέτες ή με την κοινωνική επαφή (χειραψία, αγκαλιά, φτέρνισμα) [38].

2.6 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Τα συμπτώματα της οξείας ηπατίτιδας Β εμφανίζονται μετά από ένα διάστημα επώασης του ιού, το οποίο μπορεί να είναι από μερικές εβδομάδες έως λίγους μήνες από την είσοδο του ιού στο ανθρώπινο σώμα. Τα συμπτώματα της οξείας ηπατίτιδας Β εμφανίζουν ποικιλία αλλά και συστηματικότητα, αν και μερικές φορές είναι πολύ ήπια ή δεν εμφανίζονται καθόλου. Σπανιότατα η οξεία ηπατίτιδα Β μπορεί να έχει κεραυνοβόλο μορφή με αρκετά βαριά συμπτώματα και αυξημένη θνητότητα. Τα κύρια συμπτώματα της οξείας ηπατίτιδας Β είναι:

- καταβολή και έντονη αδυναμία
- ανορεξία, ναυτία, εμετοί, διάρροιες
- μυαλγίες, αρθραλγίες
- κεφαλαλγίες
- φωτοφοβία
- φαρυγγίτιδα, βήχας και ρινόρροια
- αλλαγές στην όσφρηση και τη γεύση

- σπάνια εμπύρετο και αποστροφή στο κάπνισμα
- απώλεια βάρους.

Τα συμπτώματα αυτά συνήθως ακολουθούνται από την εμφάνιση ίκτερου, κατά την εγκατάσταση του οποίου οι ασθενείς εμφανίζουν φαινότυπο ίκτερου (κίτρινο χρώμα), σκουρόχρωμα ούρα και αποχρωματισμένα κόπρανα [39]. Μετά την εμφάνιση ίκτερου, τα γενικά συμπτώματα υποχωρούν και επάγεται ηπατική διόγκωση που μπορεί να συνυπάρχει με άλγος στο δεξιό άνω υπογάστριο [40]. Πιο σπάνια, οι ασθενείς εμφανίζουν εικόνα χολόστασης, μεγαλοσπληνία και τραχηλική λεμφαδενοπάθεια και ακόμη πιο σπάνια έχει περιγραφεί εικόνα οξείας παγκρεατίτιδας [41].

Στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β, η συμπτωματολογία επίσης ποικίλει από εντελώς ασυμπτωματική έως ηπατική ανεπάρκεια. Το πιο σύνηθες σύμπτωμα είναι η κόπωση, ενώ η εμφάνιση ίκτερου αφορά σε πιο βαριές περιπτώσεις. Η έλλειψη συμπτωμάτων είναι αρκετά συχνή, ωστόσο ο ιός εξακολουθεί να προκαλεί βλάβες στο ήπαρ, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ινώδους ιστού μέσα στο ήπαρ. Στη συνέχεια, αναλόγως και με τον βαθμό ηπατικής ανεπάρκειας εξαιτίας του ινώδους ιστού, τα συμπτώματα μπορεί να εξελιχθούν σε κίρρωση του ήπατος με συνοδό ασκίτη, οίδημα, αιμορραγία κιρσών οισοφάγου, εγκεφαλοπάθεια και διαταραχές πήξης του αίματος, ενώ όπως έχει προαναφερθεί, όλοι οι ασθενείς με κίρρωση του ήπατος έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ηπατοκαρκινώματος [42].

Σήμερα επτά φάρμακα έχουν λάβει έγκριση για τη θεραπεία ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β στην Ευρώπη: η ιντερφερόνη-άλφα (INF-α), η πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη-α και τα νουκλεοσιτιδικά ανάλογα (η λαμβιβουτίνη, η τελμπιβουδίνη, η αδεφοβίρη και η τενοφοβίρη). Τα φάρμακα έχουν ως στόχο την ενίσχυση της άμυνας του οργανισμού και την μείωση του ιικού πολλαπλασιασμού. Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί ακόμη και να εκριζωθεί ο ιός της ηπατίτιδας.

Στους ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα δεν χορηγείται θεραπεία, παρά μόνο ανακούφιση των συμπτωμάτων [43].

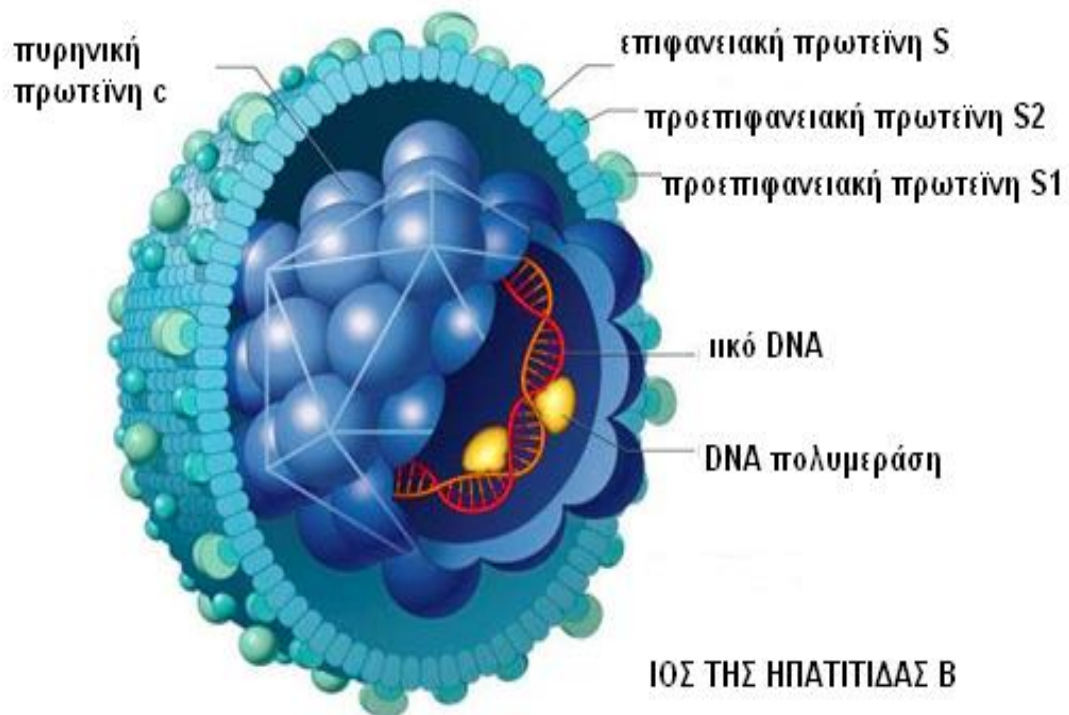
2.7 ΟΡΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ HBV ΛΟΙΜΩΞΗΣ

Η ανακάλυψη του HBsAg (Αυστραλιανό αντιγόνο) στα τέλη της δεκαετίας του 1960 και η σύνδεσή του με την ηπατίτιδα Β, αποτέλεσε την βάση της ορολογικής διάγνωσης της ιογενούς ηπατίτιδας. Σήμερα στα εργαστήρια εξετάζονται οι παρακάτω ηπατικοί δείκτες για τον καθορισμό της ηπατίτιδας και του σταδίου της, εφόσον αυτή υπάρχει:

- **HBsAg:** Το λεγόμενο και αυστραλιανό αντιγόνο αποτελεί τον επίτοπο της πρωτεΐνης επιφανείας και ανιχνεύεται στον ορό ασθενών με οξεία και χρόνια λοίμωξη από τον ιό. Οι συγκεντρώσεις του HBsAg στον ορό δεν σχετίζονται με τον ιικό πολλαπλασιασμό, ούτε είναι ενδεικτικές για την βαρύτητα της νόσου ή τον καθορισμό αυτής σε οξεία και χρόνια [44]. Ανιχνεύεται πρώτος στον ορό (λίγες εβδομάδες μετά την έκθεση στον ιό) και πιστοποιεί την ύπαρξη ηπατίτιδας Β. Μετά την φάση κάθαρσης του ιού από το ανοσοποιητικό σύστημα, το αντιγόνο εξαφανίζεται από τον ορό (3-4 μήνες μετά την αρχική έκθεση). Παραμονή μετά από αυτό το διάστημα σημαίνει χρόνια λοίμωξη [45].

- **Anti-HBs:** Το αντίσωμα έναντι του HBsAg εμφανίζεται κατά την αποδρομή της οξείας ηπατίτιδας από μερικές μέρες έως και τρεις μήνες μετά την εξαφάνιση του HBsAg (παράθυρο S). Η εμφάνισή του μπορεί να σημαίνει ίαση ή και ανοσία σε νέα λοίμωξη. Το θετικό αποτέλεσμα μόνο στον δείκτη anti-HBs χωρίς την εμφάνιση κάποιου εκ των άλλων δεικτών συνήθως δείχνει εμβολιασμό.

- **HBeAg/anti-HBe:** Το αντιγόνο HBe αποτελεί μη δομική πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου του ιού και ανιχνεύεται τόσο σε ασθενείς με οξεία, όσο και σε εκείνους με χρόνια ηπατίτιδα και αποτελεί κριτήριο αυξημένης μολυσματικότητας. Εμφανίζεται σχεδόν ταυτόχρονα με το αυστραλιανό αντιγόνο και παύει να ανιχνεύεται πριν την κάθαρση αυτού. Παραμονή του αντιγόνου HBeAg πέραν των 6 μηνών είναι ενδεικτικό κριτήριο μετάπτωσης της νόσου σε χρόνια λοίμωξη. Στη χρόνια λοίμωξη τα επίπεδα του αντιγόνου αυτού είναι άμεσα συνδεδεμένα με υψηλού βαθμού ιαιμία, αυξημένη μολυσματικότητα και ενεργό πολλαπλασιασμό [46].



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση του ιού της ηπατίτιδας Β

- **HBcAg/anti-HBc:** Το αντιγόνο της πρωτεΐνης core αποτελεί τον δείκτη του ιικού πολλαπλασιασμού και ανιχνεύεται με ανοσοϊστοχημεία στο ηπατικό παρέγχυμα και όχι στον ορό. Τα αντισώματα έναντι του HBcAg μπορεί να είναι IgG ή και IgM. Υψηλοί τίτλοι IgM του αντισώματος εμφανίζονται σε οξεία λοίμωξη ταυτόχρονα με τη συμπτωματολογία και σταδιακά υποχωρούν με την παράλληλη αύξηση του τίτλου των IgG που παραμένει εφ' όρου ζωής.
- **HBV-DNA:** Η ανίχνευση του HBV-DNA στον ορό σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη είναι πολύ σημαντική γιατί προδικάζει την πορεία της νόσου, καθώς και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Τα επίπεδά του συνδέονται με τον ιικό πολλαπλασιασμό και αποτελούν τον ακριβέστερο δείκτη μολυσματικότητας του ασθενούς. Στη φάση της ανοχής μετά από οξεία λοίμωξη έχουμε υψηλά επίπεδα HBV-DNA, στη φάση της κάθαρσης χαμηλότερα, στη φάση της ενσωμάτωσης πολύ χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα, ενώ αν επέλθει φάση αναζωπύρωσης αυξάνονται και πάλι σε πολύ υψηλά επίπεδα [46].

2.8 ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β

Η χρονιότητα της νόσου καθιστά τους φορείς μόνιμη δεξαμενή δυνητικής μετάδοσης του ιού και ίσως λόγω αυτού ανευρίσκονται τα υψηλά ποσοστά της κάθετης μετάδοσης από τη μητέρα στο παιδί παγκοσμίως, ενώ αντίστοιχα ο κίνδυνος περιγεννητικής μετάδοσης της νόσου προδιαθέτει το νεογνό να αναπτύξει χρονιότητα και ταυτόχρονα να παρουσιάζει μικρή ανταπόκριση στις αντι-ικικές θεραπείες.

Περιγεννητικά υπάρχουν τρεις πιθανοί τρόποι μετάδοσης του ιού:

- διαπλακουντιακά (αιματογενής ή κυτταρική μεταφορά),
- κατά τη διάρκεια του τοκετού και
- κατά τη διάρκεια του θηλασμού.

Χαρακτηριστικό της κάθετης μετάδοσης από τη μητέρα στο παιδί, όπως προαναφέρθηκε, είναι ότι τα νεογνά και τα νήπια που μολύνονται από τον ιό της ηπατίτιδας Β, παρουσιάζουν σε ποσοστό 90% μετάπτωση της νόσου σε χρονιότητα, ενώ ο τίτλος ιικού φορτίου της μητέρας συνδέεται άμεσα με την αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης νεογνικής λοίμωξης.

Στατιστικά φαίνεται πως 5% των περιπτώσεων μόλυνσης οφείλεται σε διαπλακουντιακή μετάδοση, ενώ κατά τον τοκετό η κάθετη μετάδοση αγγίζει το 95%. Έτσι λοιπόν φαίνεται πως ο πλακούντας προστατεύει σε μεγάλο βαθμό το έμβρυο από μόλυνση, ενώ κατά τον τοκετό ενοχοποιούνται: η αιματογενής διασπορά πριν ή κατά τον τοκετό, η κατάποση μολυσμένου αμνιακού υγρού ή αίματος κατά τη διάρκεια του τοκετού και η επαφή με αίμα της μητέρας λόγω πιθανού τραυματισμού. Τέλος, ο μητρικός θηλασμός αυξάνει τις πιθανότητες μόλυνσης, ειδικά αν υπάρχει τραυματισμός της θηλής [47].

Σε οξεία λοίμωξη της μητέρας από τον ιό της ηπατίτιδας Β στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, 10% των νεογνών είναι οροθετικά, με το ποσοστό αυτό να αυξάνεται δραματικά σε 80-90% αν η οξεία ηπατίτιδα της μητέρας συμβεί στο τελευταίο τρίμηνο της κύησης [47].

Η μετάδοση της μόλυνσης περιγεννητικά σχετίζεται με το ιικό φορτίο της μητέρας και την ορολογική της κατάσταση. Έχει αποδειχθεί ότι οι συγκεντρώσεις HBV-DNA και η θετικότητα σε HBsAg και HBeAg, αυξάνουν τις πιθανότητες νόσησης του νεογνού (70-

90%), ενώ στην περίπτωση που η μητέρα έχει αναπτύξει αντίσωμα HBe, η πιθανότητα μετάδοσης μειώνεται αρκετά (10-20%) [48].

Η περιγεννητική λοίμωξη αρχικά είναι συνήθως ασυμπτωματική, ωστόσο η σοβαρότητά της έγκειται στο γεγονός ότι σε συντριπτικά ποσοστά (90%) μεταπίπτει σε χρονιότητα και τα παιδιά που μολύνονται με κάθετη μετάδοση έχουν αυξημένες πιθανότητες (25%) κίρρωσης ήπατος και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος στην ενήλικη ζωή [48].

Η περιγεννητική μόλυνση, έστω και ασυμπτωματικά, ανιχνεύεται στο δεύτερο μήνα της ζωής του νεογνού, ενώ αντι-ική θεραπεία δοκιμάζεται κατά κανόνα μετά το δεύτερο έτος με όχι και τόσο ικανοποιητικά αποτελέσματα. Με αυτά τα κριτήρια, η πρόληψη αποτελεί μονόδρομο και ο προγεννητικός έλεγχος καθίσταται υποχρεωτικός.

Αν μια μητέρα κατά τον προγεννητικό έλεγχο βρεθεί θετική στο αυστραλιανό αντιγόνο, τότε εφαρμόζεται συγκεκριμένο πρωτόκολλο, το οποίο έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα (80-98% επιτυχία στην πρόληψη μόλυνσης του νεογνού). Στην περίπτωση, λοιπόν, οροθετικής μητέρας στο αντιγόνο, το νεογνό πρέπει να εμβολιαστεί μέσα σε διάστημα 12 ωρών από τον τοκετό με υπεράνοση γ-σφαιρίνη (HBIG) 0,5ml και να του χορηγηθεί η πρώτη δόση του εμβολίου έναντι της ηπατίτιδας Β. Ο εμβολιασμός θα πρέπει να ολοκληρωθεί στους πρώτους έξι μήνες της ζωής του νεογνού. Η επιτυχία ή όχι του εμβολιασμού ελέγχεται τουλάχιστον ένα μήνα μετά την τρίτη δόση (ορολογικός έλεγχος HBsAg και anti-HBs). Αν το παιδί δεν έχει αναπτύξει αντισώματα, τότε χορηγείται αναμνηστική δόση και επανελέγχονται τα αντισώματα μετά την πάροδο ενός μήνα [49].

ΚΕΦ.3° ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

Ο ιός της ηπατίτιδας Β είναι ηπατοτρόπος ιός, αλλά δεν είναι άμεσα κυτταροτοξικός για τα ηπατοκύτταρα καθώς, λόγω του δίκλωνου DNA του, δεν έχει άμεση κυτταροπαθογόνο δράση. Η ανοσολογική απάντηση του ξενιστή είναι εκείνη που καθορίζει την έκβαση της λοίμωξης, καθώς και την συμπτωματολογία αυτής, ενώ επηρεάζεται από τον πολλαπλασιασμό του ιού. Για το λόγο αυτό, όπως προαναφέρθηκε, ο HBV συνοδεύεται από μεγάλη ποικιλία συμπτωμάτων.

Μετά την είσοδο του ιού στον οργανισμό, η ανοσολογική απάντηση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της μη ειδικής ή φυσικής ανοσίας (έκκριση ιντερφερονών α και β, ενεργοποίηση των NK cells, ενεργοποίηση φαγοκυττάρων), αλλά και της ειδικής ανοσίας, η οποία περιλαμβάνει τη χυμική και την κυτταρική ανοσιακή απάντηση (ενεργοποίηση T-κυτταροτοξικών και T-βοηθητικών λεμφοκυττάρων) [50].

Στην οξεία φάση της λοίμωξης, η ανοσολογική απάντηση είναι έντονη, πολυκλωνική και ειδική και στη συνέχεια αυτοπεριορίζεται. Οι ιντερφερόνες α, β και γ και ο παράγων νέκρωσης όγκου α (TNF-α) παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στην φάση της κάθαρσης του ιού [51], ενώ ταυτόχρονα τα εξειδικευμένα CD8(+)T-λεμφοκύτταρα καταστρέφουν τα προσβεβλημένα ηπατοκύτταρα [50].

Στη χρόνια ηπατίτιδα Β, τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα δεν συμμετέχουν πια και η ανοσολογική απάντηση του ασθενούς στηρίζεται στα CD4(+)T-λεμφοκύτταρα, τα οποία όμως δεν μπορούν να ελέγξουν τον πολλαπλασιασμό του ιού [52].

Η ηπατοκυτταρική νέκρωση προκαλείται από τα κυτταροτοξικά CD8(+)T-λεμφοκύτταρα στην προσπάθειά τους να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό του ιού. Τα CD8(+)T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα ιικά αντιγόνα (κυρίως HBcAg και λιγότερο HBsAg) στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων, μέσω του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου I, ενώ τα CD4(+)T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα ιικά αντιγόνα που εκφράζονται στην επιφάνεια των μακροφάγων του ηπατικού λοβίου, με την βοήθεια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου II. Την διέγερση των λεμφοκυττάρων ακολουθεί ένας καταρράκτης έκκρισης κυτταροκινών, οι οποίες ενισχύουν το σήμα

πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων και η χυμική αντίδραση ενισχύεται με την ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων [53].

Παρά την διαρκή προσπάθεια του οργανισμού να καταπολεμήσει την ιική εισβολή και παρά την ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας, είναι δυνατόν η λοίμωξη από τον ιό να επιμείνει και να προκαλέσει βλάβες ή διαταραχές στα κύτταρα. Μια τέτοια διαταραχή είναι κι αυτή των Τ-λεμφοκυττάρων, τα οποία αν εκτεθούν σε πολύ υψηλό ιικό φορτίο, υπερδιεγείρονται, εξαντλούνται και εν συνεχεία οδηγούνται σε αποπτωτικό θάνατο. Επίσης, έχει παρατηρηθεί σε παιδιά με χρόνια ηπατίτιδα Β πως, παρά την είσοδο του αντιγόνου HBsAg στον παιδικό οργανισμό μέσω της μητέρας, παράγεται μειωμένη ιντερφερόνη-γ από τα περιφερικά λεμφοκύτταρα, η οποία υποδηλώνει μειωμένη παρουσία ειδικών κυτταροτοξικών CD8(+)T- λεμφοκυττάρων και έτσι ο ιός καταφέρνει να διαφεύγει του ανοσοποιητικού συστήματος και να πολλαπλασιάζεται ανενόχλητος. Εικάζεται πως αυτό οφείλεται στο ότι η πρωτεΐνη e της μητέρας διαπερνά τον διαπλακουντιακό φραγμό και προκαλεί ανοχή των θυμοεξαρτώμενων κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων του νεογνού έναντι των πρωτεϊνών HBcAg και HBeAg. Η φάση της ανοχής στο νεογνό μπορεί να είναι παρατεταμένη, διαρκώντας μήνες ή και χρόνια, παρουσιάζοντας σημαντική αιμία. Ωστόσο, μετά την πάροδο αυτής της φάσης, ενεργοποιούνται τα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα και η ανοσιακή απάντηση οδηγεί σε μείωση του ιικού φορτίου [54].

Η τελική έκβαση της ηπατίτιδας Β επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η ηλικία του ξενιστή, τα επίπεδα αιμίας, το φύλο, η ανοσολογική κατάσταση του ασθενούς και ο τρόπος ζωής του, καθώς και οι μεταλλάξεις του ιού [55].

3.1 ΜΗ ΕΙΔΙΚΗ Ή ΦΥΣΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

3.1.1 Ιντερφερόνες

Όταν ο ιός εισβάλλει στα κύτταρα και τα μολύνει, προκαλεί ταυτόχρονα την παραγωγή ιντερφερονών, οι οποίες είναι γνωστό ότι έχουν αντι-ική δράση. Οι πρωτεΐνες αυτές ως κύριο στόχο έχουν την παρεμπόδιση της διασποράς της μόλυνσης και του πολλαπλασιασμού των μολυσμένων κυττάρων. Οι ιντερφερόνες είναι τρεις: η α, η β και η γ, η οποία παράγεται όμως σε δεύτερο χρόνο συγκριτικά με τις δύο πρώτες. Η κύρια

δράση των ιντερφερονών είναι η ενεργοποίηση γονιδίων που καταστρέφουν το αγγελιοφόρο RNA, αναστέλλοντας έτσι τη μετάφραση των ιικών πρωτεϊνών και εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό του ιού [56]. Επίσης, οι ιντερφερόνες προάγουν την έκφραση των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου I (MHC I) στην επιφάνεια των προσβεβλημένων κυττάρων, στοχοποιώντας τα με αυτόν τον τρόπο για να καταστραφούν από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα. Τέλος, η δράση των ιντερφερονών ενεργοποιεί τα κύτταρα φυσικούς φονείς (Natural Killer cells) για την καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων [57].

3.1.2 Κύτταρα Φυσικοί Φονείς (NK cells)

Τα Natural Killer cells χαρακτηρίζονται από ευδιάκριτα κυτταροπλασματικά κοκκία, τα οποία και απελευθερώνουν στα κύτταρα στόχους. Οι δραστικές πρωτεΐνες διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη των μολυσμένων κυττάρων και προάγουν την απόπτωση του κυττάρου. Τα NK κύτταρα ενεργοποιούνται μετά την παραγωγή των ιντερφερονών από τα μολυσμένα κύτταρα, καθώς επίσης και των κυτοκινών που προέρχονται από τα μακροφάγα [58].

3.2 ΕΙΔΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

Η ειδική κυτταρική ανοσία στηρίζεται στη δράση δύο ειδών T-λεμφοκυττάρων: των CD8(+) T-λεμφοκυττάρων και των CD4(+) T-λεμφοκυττάρων. Τα CD4(+) T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα χωρίζονται σε δύο υποπληθυσμούς (Th1 και Th2). Η IL-12 καθορίζει τη διαφοροποίηση σε Th1 πληθυσμό, ο οποίος εκκρίνει κυτταροκίνες με άμεση ή έμμεση αντι-ικκή δράση (κυρίως IFN- γ , TNF- α και IL-2). Η τελευταία, όταν παράγεται, προκαλεί την επιστράτευση των πρόδρομων κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων [59]. Η διαφοροποίηση προς το Th2 πληθυσμό που παράγει κυρίως IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, χρησιμεύει στην ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων και την παραγωγή αντισωμάτων.

Τα CD8(+) T-κυτταροτοξικά-κατασταλτικά λεμφοκύτταρα έχουν εξειδικευμένη κυτταροτοξική δράση απέναντι στα μολυσμένα κύτταρα, τα οποία αναγνωρίζουν από ειδικά αντιγόνα στην επιφάνειά τους. Αυτή η εξειδίκευση των T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων στην καταστροφή του κυττάρου-στόχου τα καθιστά βασικά κύτταρα

ανοσοεπιτήρησης έναντι των ιών. Ο θάνατος του μολυσμένου κυττάρου επιτυγχάνεται είτε μέσω κυτταροτοξικών ουσιών (κυρίως της περφορίνης), οι οποίες αυξάνουν τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και έτσι οδηγείται το κύτταρο στο θάνατο, είτε προάγοντας την έκφραση γονιδίων που επιταχύνουν την απόπτωση [60].

Τα Τ-λεμφοκύτταρα ασκούν τη δράση τους μόνο όταν αναγνωρίσουν στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων ορισμένα αντιγονικά πεπτίδια (επίτοπους), τα οποία παρουσιάζονται ενωμένα με μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες από τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας.

3.2.1 Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας

Τα μόρια ΜHC Τάξης I και II είναι μεμβρανοσυνδεδεμένες γλυκοπρωτεΐνες, στενά σχετιζόμενες μεταξύ τους ως προς τη δομή και τη λειτουργία. Και οι δύο τύποι λειτουργούν ως απόλυτα εξειδικευμένα αντιγονοπαρουσιαστικά μόρια και δημιουργούν ασυνήθιστα σταθερά συμπλέγματα με τα αντιγονικά πεπτίδια, παρουσιάζοντάς τα στην κυτταρική επιφάνεια προκειμένου να αναγνωριστούν από τα Τ-λεμφοκύτταρα. Τα αντιγόνα που συνδέονται με μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου I (MHC I) αναγνωρίζονται από τα Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα CD8(+), ενώ τα αντιγόνα που συνδέονται με μόρια ΜHC II, αναγνωρίζονται από τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα CD4(+) [63].

Το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας συμμετέχει τόσο στη χυμική, όσο και στην κυτταρομεσολαβητική ανοσολογική απόκριση. Σε αντίθεση με τα αντισώματα, τα οποία αναγνωρίζουν τα αντιγόνα από μόνα τους, τα Τ-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν ένα αντιγόνο μόνο όταν αυτό συνδυάζεται με ένα μόριο ΜHC. Η βασική βιολογική λειτουργία των μορίων ΜHC είναι: η αντιγονοπαρουσίαση, η διαδικασία επιλογής TCR (T-cell Receptor repertoire selection), η ρύθμιση της ενεργότητας των NK κυττάρων (Natural Killer Cells), καθώς και η προστασία του εμβρυϊκού ιστού από το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα κατά την κύηση. Επιπλέον, επειδή τα μόρια ΜHC λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικές δομές, το συγκεκριμένο σύνολο των μορίων ΜHC που εκφράζονται σε ένα άτομο επηρεάζει το ρεπερτόριο των αντιγόνων, στα οποία τα Τ-

βοηθητικά και τα T-κυτταροτοξικά κύτταρα αυτού του ατόμου μπορούν να αποκριθούν [62].

Το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας διαδραματίζει έναν πολύ σπουδαίο βιολογικό ρόλο στον οργανισμό, καθώς συμμετέχει μεν στην αναγνώριση και στην παρουσίαση αντιγόνων (ιών, μικροβίων, μοσχευμάτων), στη διάκριση του «εαυτού» από το «μη-εαυτό», αλλά και στην αναγνώριση τροποποιημένων ιδίων αντιγόνων (νεοπλασματικά κύτταρα). Χάρη στην στενή συνεργασία του με τα λεμφοκύτταρα επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση της ανοσιακής απάντησης και των κυτταροτοξικών μηχανισμών [61].

3.2.2 Ενεργοποίηση T-λεμφοκυττάρων

- **Μόριο CD3**

Ανοσολογικά, το CD3 είναι ένας συνυποδοχέας των T-κυττάρων, ο οποίος συμμετέχει στην ενεργοποίηση τόσο των κυτταροτοξικών CD8(+), όσο και των βοηθητικών CD4(+) T-λεμφοκυττάρων, ενώ δεν εκφράζεται στα NK κύτταρα. Το CD3 είναι ένα σύμπλεγμα που αποτελείται από έξι πολυπεπίδια με τέσσερις συνήθως τρυσυγγλυκοποιημένες CD3 αλυσίδες (γ,δ,ε,ζ) και τρία διαφορετικά διμερή (γε, δε και ζζ). Οι αλυσίδες αυτές σχετίζονται με τον υποδοχέα των T-κυττάρων TCR (T-Cell Receptor) και προκαλούν την σηματοδότηση προς ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων.

- **Μόριο CD4**

Το CD4 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 55kDa και έχει τέσσερις ανοσοσφαιρινικές εξωμεμβρανικές περιοχές (D1-D4). Δρα ως συνυποδοχέας μαζί με τον TCR στην ενεργοποίηση των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων που επάγεται από αντιγόνο και παρουσιάζεται μέσω μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου II. Συγκεκριμένα, το CD4 ενισχύει το σήμα που παράγεται από τον TCR, επιστρατεύοντας μία κινάση τυροσίνης και ξεκινώντας έτσι τον καταρράκτη ενεργοποίησης των T-βοηθητικών κυττάρων [73].

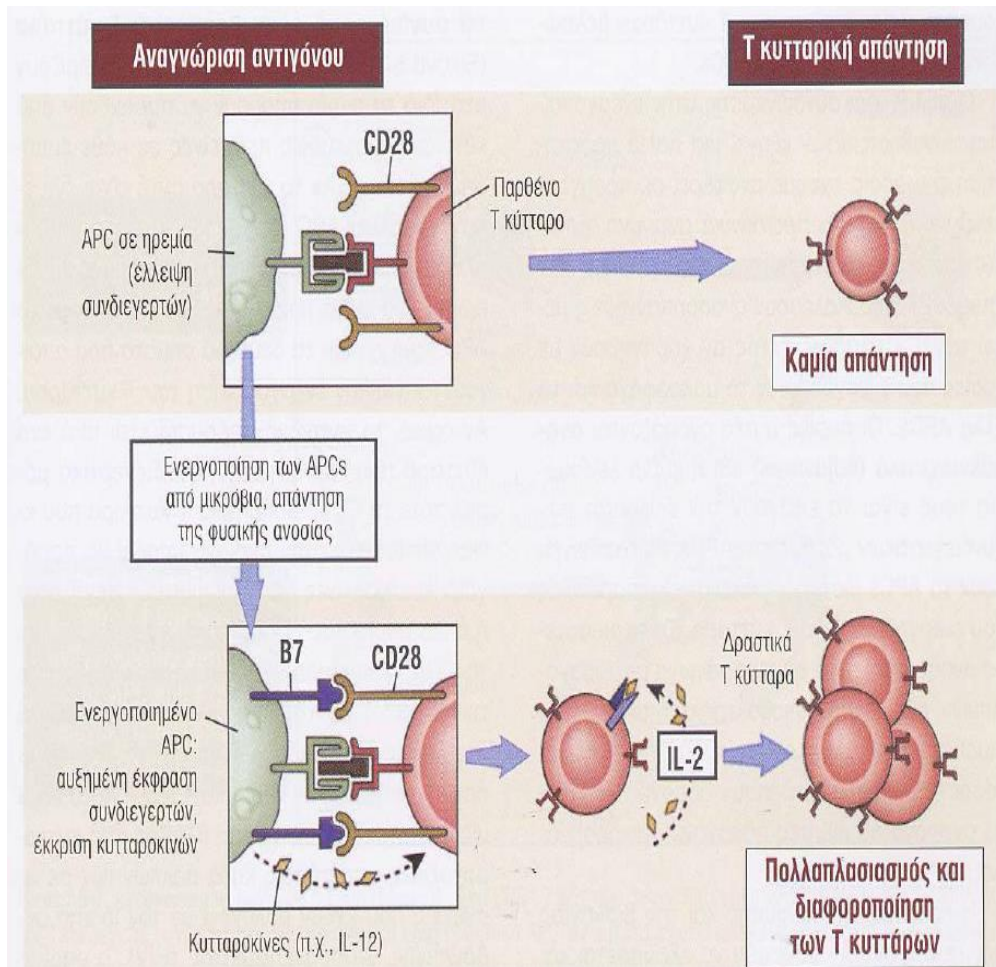
- **Μόριο CD8**

Το CD8 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 68kDa, η οποία εκφράζεται ως ετεροδιμερές ενωμένο με δισουλφιδικό δεσμό (περιλαμβάνει μία α-αλυσίδα και μία β-αλυσίδα) ή ως ομοδιμερές (με δύο α-αλυσίδες). Δρα ως συνυποδοχέας μαζί με τον TCR για την ενεργοποίηση των T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων και επάγεται εξειδικευμένα μετά την αναγνώριση αντιγονικών πεπτιδίων, τα οποία παρουσιάζονται μέσω των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου I. Μετά τη σύνδεση του συνυποδοχέα CD8 με τα μόρια MHC τύπου I, ενισχύεται το σήμα που παράγεται από τον TCR και ξεκινάει ένας καταρράκτης φωσφορυλιώσεων που ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων.

- **Μόριο CD28**

Γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία πως για να διεγερθεί ένα T-λεμφοκύτταρο χρειάζεται δύο σήματα. Το πρώτο σήμα προέρχεται από τη σύνδεση του υποδοχέα των λεμφοκυττάρων TCR με το αντιγονικό πεπτίδιο που παρουσιάζεται από τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, ενώ το δεύτερο σήμα προέρχεται από τη σύνδεση συνδιεγερτικών μορίων με τον συνδέτη τους. Ένα τέτοιο συνδιεγερτικό μόριο είναι και το CD28.

Η συμμετοχή του μορίου CD28 στην ενεργοποίηση των T-κυττάρων είναι πολύ σημαντική για την μετάδοση του σήματος ενεργοποίησης. Αν το συνδιεγερτικό σήμα του CD28 δεν εκτελεστεί παράλληλα με το πρώτο σήμα που προέρχεται από τη σύνδεση του TCR υποδοχέα, τότε τα T-λεμφοκύτταρα παραμένουν σε κατάσταση μακρόχρονης αδράνειας και δεν ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένα αντιγονικά ερεθίσματα (αντιγονοειδική ανοχή). Η κατάσταση αυτή βιβλιογραφικά αναφέρεται ως ανέργια των T-λεμφοκυττάρων και αφορά σε λειτουργική αδρανοποίησή τους.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση για την ενεργοποίηση και την ανέργια των T-κυττάρων

ΚΕΦ.4° ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

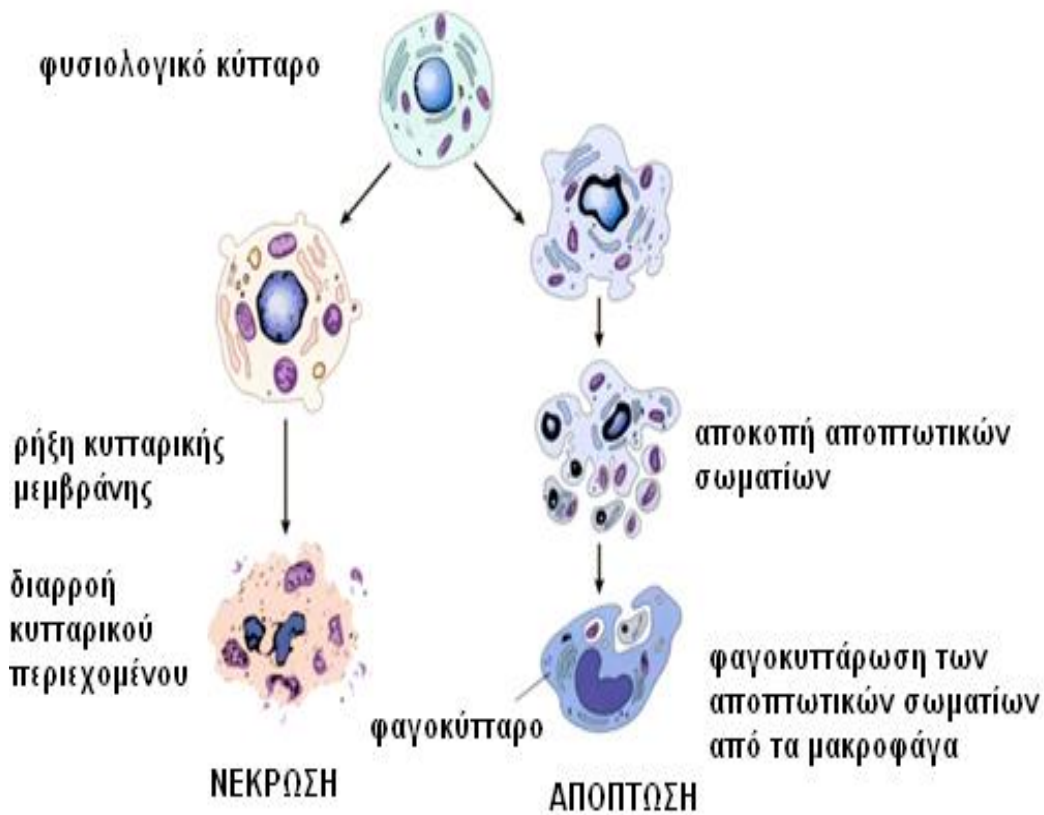
Στους πολυκύτταρους οργανισμούς η ομοιόσταση διατηρείται με την ισορροπία μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού θανάτου. Είναι γνωστό ότι υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι κυτταρικού θανάτου των ευκαρυωτικών κυττάρων: η νέκρωση και η απόπτωση. Τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη, περιέγραψε πρώτη φορά ο Glucksmann, το 1951. Έκτοτε έχουν γίνει πολυάριθμες μελέτες, αλλά ακόμη και σήμερα δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητή η διαδικασία της απόπτωσης.

Ως ορισμός της απόπτωσης θα μπορούσε να θεωρηθεί η περιγραφή της από τους Kerr JFR και Searle (Kerr et al, Br J Cancer 1972), οι οποίοι αποδίδουν την απόπτωση ως φυσιολογική διαδικασία που χρησιμοποιείται από έναν οργανισμό για να εξαλείψει εκλεκτικά κύτταρα, τα οποία δεν είναι πλέον απαραίτητα, έχουν υποστεί βλάβη ή είναι επικίνδυνα.

Η νέκρωση (accidental cell death) είναι η μορφή κυτταρικού θανάτου, η οποία προκαλείται από απότομες κυτταρικές βλάβες (πχ ισχαιμία, υποξία, τραυματισμός κ.α.) και χαρακτηρίζεται από ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, οίδημα του κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων, διαρροή κυτταροπλασματικού περιεχομένου και λύση του κυττάρου. Αντιθέτως, απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (programmed cell death) αποκαλείται η φυσιολογική, γενετικώς ελεγχόμενη, άριστα οργανωμένη και κυρίως επιθυμητή κυτταρική διαδικασία, η οποία οδηγεί στην αυτοκαταστροφή ενός κυττάρου και διαφέρει μορφολογικά και βιοχημικά από την νέκρωση. Η νέκρωση συχνά οδηγεί σε οξεία φλεγμονώδη αντίδραση σε αντίθεση με την απόπτωση, η οποία είναι φιλική προς τον οργανισμό και δεν προκαλεί φλεγμονή [64].

Η απόπτωση είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανάπτυξη και τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού, καθώς μέσω αυτής της διαδικασίας καταστρέφονται γηρασμένα, κατεστραμμένα ή μολυσμένα κύτταρα. Η απόπτωση είναι η μορφή κυτταρικού θανάτου, χάρη στην οποία επιτυγχάνεται η συνεχής ανανέωση των ιστών με

κυτταρική διαίρεση, ενώ ταυτόχρονα διατηρείται το επίπεδο σταθερότητας των διαφόρων ιστολογικών διαμερισμάτων [64].



Εικόνα 7: Διαφορές νέκρωσης και απόπτωσης

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης χωρίζονται σε 4 κύριες φάσεις:

- **Φάση έναρξης ή φάση σηματοδότησης**, κατά την οποία το κύτταρο λαμβάνει το σήμα θανάτου, εξωκυττάριο ή ενδοκυττάριο.
- **Φάση ελέγχου και εκτέλεσης**, κατά την οποία ενεργοποιείται ο καταρράκτης των κασπασών και διαταράσσεται η λειτουργία της μιτοχονδριακής μεμβράνης (απελευθέρωση κυτοχρώματος c).
- **Φάση δομικών αλλαγών και αποδόμησης του DNA**, κατά την οποία παρατηρείται διάσπαση της λαμινίνης της πυρηνικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την θραύση και αποδόμηση του γενετικού υλικού.
- **Φάση αναγνώρισης των αποπτωτικών κυττάρων**, ενθλάκωση και φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών σωματιδίων από γειτονικά μακροφάγα [66].

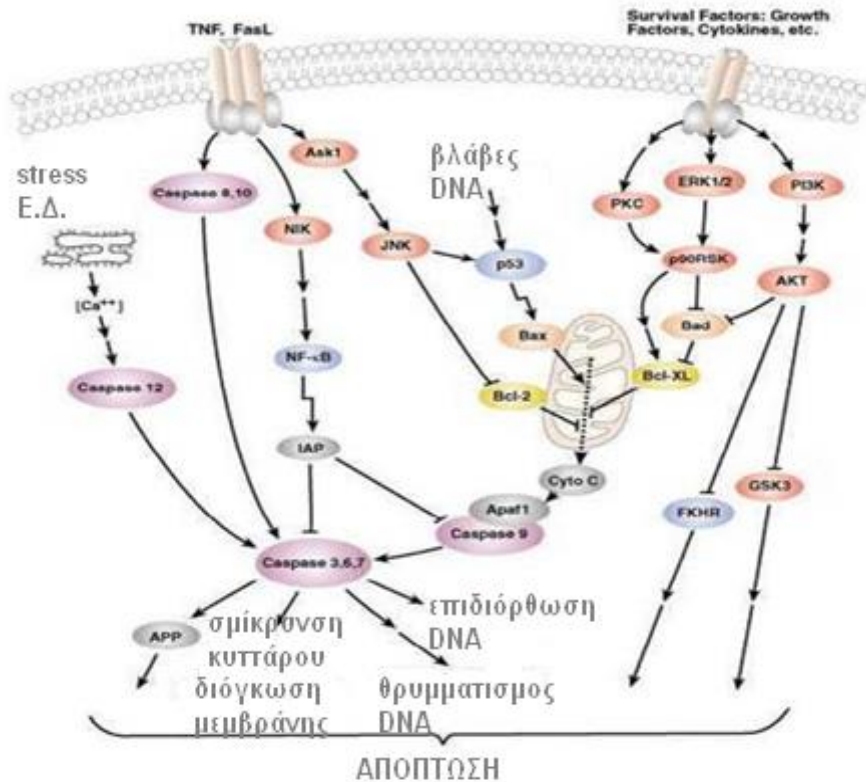
Τα κύτταρα που υπόκεινται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο επιδεικνύουν διακριτές μορφολογικές αλλαγές, οι οποίες με τη σειρά που επιτελούνται είναι:

- μείωση του κυτταρικού όγκου,
- τροποποίηση του κυτταροσκελετού,
- δημιουργία εγκολπώσεων στην κυτταρική μεμβράνη,
- έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης,
- ρήξη του μιτοχονδρίου και απελευθέρωση κυττοχρώματος c,
- συμπύκνωση της χρωματίνης,
- αποικοδόμηση του DNA με διανουκλεοσωμικό τεμαχισμό, σε μικρά θραύσματα
- αποκοπή μικρών μεμβρανικών αποπτωτικών σωματίων με ακέραια οργανίδια
- φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα [67].

Η κυτταρική αυτοκτονία προκαλείται από ενδογενή ή εξωγενή ερεθίσματα και απαιτεί κατανάλωση ενέργειας (σε αντίθεση με την νέκρωση) για τη σύνθεση RNA και πρωτεϊνών (κασπάσες) [67].

4.1 ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ

Στο ενδογενές μονοπάτι, η απόπτωση επάγεται με τη μεσολάβηση των μιτοχονδρίων, ενώ στο εξωγενές, η απόπτωση ολοκληρώνεται μέσω αλληλεπίδρασης συνδετών με αντίστοιχους διαμεμβρανικούς υποδοχείς θανάτου [68]. Στο ενδογενές μονοπάτι χρειάζονται περίπου 24 ώρες μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία της απόπτωσης, ενώ στο εξωγενές ο κυτταρικός θάνατος επέρχεται μέσα σε λίγες ώρες. Μια ακόμη διαφορά ανάμεσα στα δύο μονοπάτια είναι το ότι στο ενδογενές μονοπάτι είναι απαραίτητη η πρωτεϊνοσύνθεση, κάτι που δεν συμβαίνει στο εξωγενές.



Εικόνα 8: Καταρράκτης σηματοδότησης για την επαγωγή της απόπτωσης. Στη σχηματική αναπαράσταση αναγνωρίζονται τα δύο μονοπάτια ενεργοποίησης, το ενδογενές και το εξωγενές

Το εξωγενές μονοπάτι παίζει ρόλο κυρίως στην ομοιόσταση των ιστών και του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ το ενδογενές επέρχεται ως απάντηση σε ερεθίσματα ή ενδοκυττάρειες απειλές, όπως για παράδειγμα βλάβες στο γενετικό υλικό. Τα δύο αυτά μονοπάτια ωστόσο, αλληλεπιδρούν και επικοινωνούν [68].

4.1.1 Ενδογενές Μονοπάτι

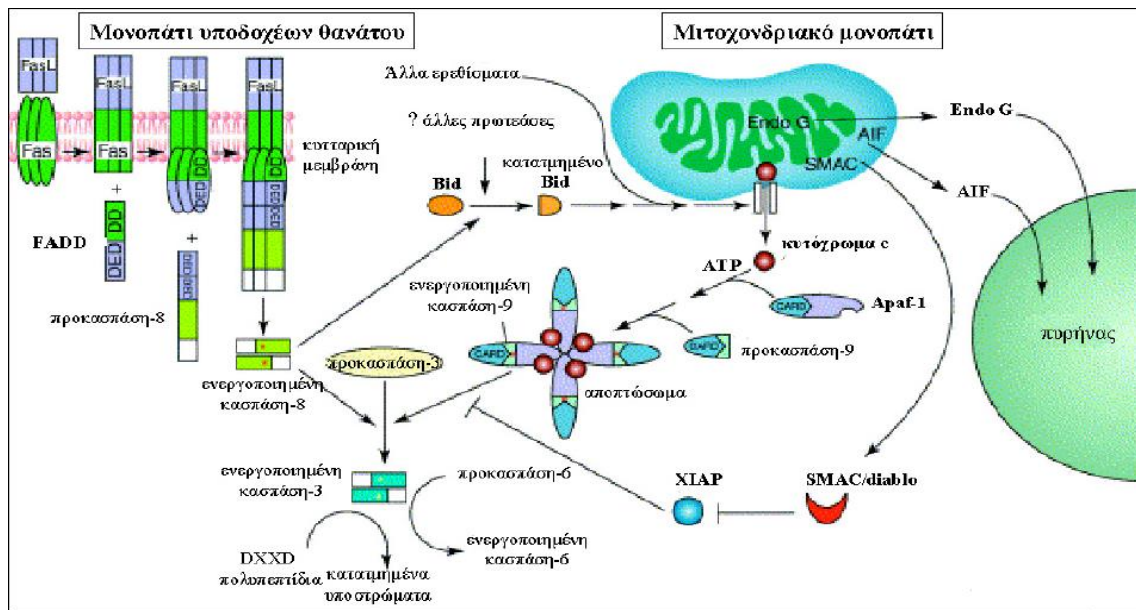
Στο ενδογενές μονοπάτι, η διαδικασία της κυτταρικής απόπτωσης ξεκινάει από τα μιτοχόνδρια ως απάντηση σε καταστάσεις κυτταρικού στρες ή βλαβών στο γενετικό υλικό. Η ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού γίνεται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη P53, η οποία ενεργοποιεί μέλη της υπερικογένειας *BCL2* που έχουν προαποπτωτική δράση. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της κασπάσης 8, η οποία τεμαχίζει το προαποπτωτικό μόριο BID, έχοντας ως αποτέλεσμα την μεταφορά του αποκομμένου BID στα μιτοχόνδρια. Άλλα μέλη της υπερικογένειας του *BCL2* (*BAX*, *BAK*) έχουν ως ρόλο την αύξηση της

διαπερατότητας της έξω-μιτοχονδριακής μεμβράνης, οδηγώντας στην απελευθέρωση του κυττοχρώματος c, παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης (apoptosis inducing factor-AIF), καθώς και άλλων προαποπτωτικών παραγόντων. Το κυττόχρωμα c προσδένει την APAF1, η οποία μαζί με ATP ή dATP, στρατολογεί την προ-κασπάση 9 σχηματίζοντας ένα μακρομοριακό σύμπλεγμα, το αποπτώσωμα. Εν συνεχεία, η προ-κασπάση 9 διμερίζεται και ενεργοποιείται η κασπάση 9, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τις κασπάσες 3,6 και 7 [69,70].

4.1.2 Εξωγενές Μονοπάτι

Ο εξωκυττάριος δρόμος ενεργοποιείται με τη σύνδεση ενός εξωκυττάριου σήματος θανάτου (death ligand) με τον αντίστοιχο υποδοχέα θανάτου (death receptor). Ο καταρράκτης σηματοδότησης ξεκινά από τους μεμβρανικούς υποδοχείς θανάτου της υπεροικογένειας του TNF υποδοχέα (TNF-R), οι οποίοι χαρακτηρίζονται από ένα συντηρημένο κυτταροπλασματικό μοτίβο, την «περιοχή θανάτου» (death domain) στο καρβοξυτελικό τους άκρο.

Η περιοχή θανάτου των υποδοχέων προσδένεται σε ομόλογες περιοχές κυτταροπλασματικών μορίων. Από τα πολλά μέλη της υπεροικογένειας των υποδοχέων θανάτου, οι πιο καλά μελετημένοι είναι οι: FAS, TRAIL-R1, TRAIL-R2 και ο TNF-R1. Στους υποδοχείς αυτούς προσδένονται οι αντίστοιχοι συνδέτες θανάτου: FASL, TRAIL και TNF. Η σύνδεση αυτή (υποδοχέα-συνδέτη) οδηγεί στην ενεργοποίηση τριμερών του υποδοχέα, στη μετάδοση του αποπτωτικού σήματος και στην πρόσδεση άλλων κυτταροπλασματικών περιοχών θανάτου, όπως το FADD (FAS Associated Death Domain) και το TRADD (TNF-R Associated Death Domain). Εν συνεχεία, αφού το FADD προσδεθεί στο κυτταροπλασματικό άκρο του υποδοχέα, επιστρατεύει άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες μέσω των «περιοχών επιτέλεσης θανάτου» DED (Death Effector Domains), συμπεριλαμβανομένων και των προκασπασών 8 και 10. Έτσι σχηματίζεται το σύμπλεγμα DISC (Death Inducing Signaling Complex) και απελευθερώνονται οι ενεργές κασπάσες 8 και 10, οι οποίες με την σειρά τους ενεργοποιούν τις κασπάσες 3 και 7 ή τις πρωτεΐνες της υπεροικογένειας του BCL2, αναλόγως με τον τύπο του κυττάρου. Η διαδικασία της απόπτωσης, εφ'όσον ξεκινήσει, είναι μη αναστρέψιμη [69,70].



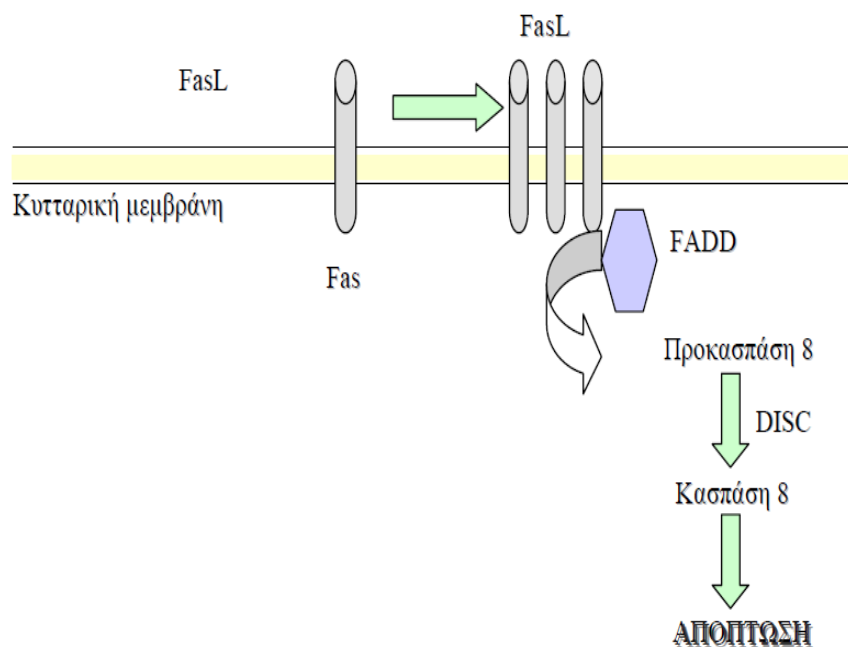
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της αποπτωτικής διαδικασίας

4.2 ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ FAS - FAS LIGAND

Ο προσδέτης Fas Ligand (CD95L ή APO-1) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη κυτταρικής επιφανείας 40 kDa και ανήκει στην οικογένεια του παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF). Προσδένεται στον υποδοχέα Fas, με αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης (εξωγενές μονοπάτι). Η πρόσδεση του προσδέτη Fas (Fas Ligand) στον υποδοχέα Fas αποτελεί την έναρξη του ενδοκυττάριου σήματος και την ενεργοποίηση της κασπάσης 8 που τελικά οδηγεί το κύτταρο στον θάνατο.

Το γονίδιο *Fas ligand* εδράζεται στο χρωμόσωμα 1 στον άνθρωπο και κωδικοποιεί για το μόριο Fas Ligand (FasL ή CD95L), το οποίο αποτελεί προσδετικό μόριο του υποδοχέα Fas. Πολλά κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα Fas στην επιφάνειά τους, ενώ ο προσδέτης Fas Ligand εκφράζεται κατά κύριο λόγο στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων. Η απόπτωση μέσω της σύνδεσης Fas-FasL προκαλεί τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των T-κυτταροτοξικών και την αποφυγή περαιτέρω ιστικής καταστροφής. Μετέχει στην εξάλειψη ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων κατά τη λήξη μιας ανοσολογικής αντίδρασης, στην καταστροφή προσβεβλημένων κυττάρων από ιούς, στην καταστροφή καρκινικών κυττάρων, καθώς και στην εξάλειψη κυττάρων φλεγμονής σε ανοσολογικά προνομιούχους ιστούς (οφθαλμός, πλακούντας, όρχις).

Η απόπτωση μέσω της οδού Fas-FasL αποδεικνύεται πως αποτελεί σπουδαίο μηχανισμό για τη διατήρηση του ανοσολογικού προνομίου για τους προνομιούχους ιστούς. Σε μελέτες που έχουν γίνει στον οφθαλμό έχει αποδειχθεί η συνεχής έκφραση της πρωτεΐνης Fas Ligand και ότι προάγεται η απόπτωση μέσω Fas-FasL, διότι δεν προκαλεί καταστρεπτικές φλεγμονώδεις απαντήσεις. Ουσιαστικά μέσω του συστήματος αυτού επιτυγχάνεται ο τερματισμός της ανοσολογικής απάντησης, η οποία προκαλεί τον κατευθυνόμενο κυτταρικό θάνατο των T-κυτταροτοξικών, συμβάλλοντας στην διατήρηση του ανοσολογικού προνομίου, χωρίς την πρόκληση φλεγμονής ή διαταραχής της ομοιοστασίας των μη προσβεβλημένων κυτταρικών υποπληθυσμών [71].



Εικόνα 10: Απόπτωση μέσω της σύνδεσης Fas – Fas Ligand

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦ.5° ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό την διερεύνηση των υποπληθυσμών των T-λεμφοκυττάρων, με ή χωρίς ιικό φορτίο, στον πλακουντιακό ιστό γυναικών με χρόνια ηπατίτιδα Β σε σχέση με τα επίπεδα ιαιμίας της μητέρας κατά την περιγεννητική περίοδο. Επιπλέον, συγκρίνονται τα επίπεδα και τα χαρακτηριστικά των T-λεμφοκυττάρων μεταξύ δύο ομάδων: της ομάδας των εγκύων με χαμηλό ιικό φορτίο HBV-DNA (LVL, Low Viral Load) και της ομάδας των εγκύων με υψηλό ιικό φορτίο HBV-DNA (HVL, High Viral Load).

Όπως έχει αναφερθεί στο Γενικό Μέρος της διπλωματικής αυτής, περιγεννητικά υπάρχουν τρεις πιθανοί τρόποι μετάδοσης του ιού: διαπλακουντιακά (αιματογενής ή κυτταρική μεταφορά), κατά τη διάρκεια του τοκετού και κατά τη διάρκεια του θηλασμού. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η διαπλακουντιακή μετάδοση, δηλαδή κάθετα από τη μητέρα στο κύημα. Στατιστικά φαίνεται πως μόλις 5% των περιπτώσεων μόλυνσης οφείλεται σε διαπλακουντιακή μετάδοση, ενώ κατά τον τοκετό η κάθετη μετάδοση αγγίζει το 95%. Αυτή η μεγάλη στατιστική διαφορά μας οδηγεί να παραδεχτούμε ότι ο πλακούντας προστατεύει σε μεγάλο βαθμό το κύημα από τη μόλυνση με τον ιό, με μηχανισμό που δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός και ενώ ανοσολογικά είναι ευρέως γνωστή η απόκριση του οργανισμού στην ιική εισβολή, τα μυστικά της πλακουντιακής άμυνας παραμένουν καλά κρυμμένα [47].

Βασική προϋπόθεση για τη συμμετοχή της μητέρας στο εν λόγω πείραμα ήταν η επιβεβαιωμένη ύπαρξη HBV-DNA στο αίμα του ομφάλιου λώρου, ενώ ταυτόχρονα όλα τα νεογέννητα να γεννηθούν απαλλαγμένα από τη νόσο. Κύρια υπόθεση της παρούσας διατριβής είναι πως τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα έχουν διττό ρόλο στην προφύλαξη του εμβρύου, κατά τη διάρκεια μιας κύησης όπου η μητέρα είναι φορέας της ηπατίτιδας Β. Σκοπός μας είναι να αποδείξουμε πως τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα προφυλάσσουν το κύημα, τόσο από διαπλακουντιακή μόλυνση με τον ιό HBV, όσο και από την δική τους κυτταροτοξικότητα.

Με την υπόθεση αυτή επιχειρείται να μελετηθεί και ο μηχανισμός που χρησιμοποιούν τα λεμφοκύτταρα του πλακούντα για να επιτύχουν την προστασία του εμβρύου. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η έκφραση συγκεκριμένων αντιγονικών επιτόπων για τον διαχωρισμό και την ομαδοποίηση των κυτταρικών πληθυσμών, καθώς και η συμμετοχή της αποπτωτικής διαδικασίας.

5.2 ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την υλοποίηση της μελέτης ακολούθησαν οι παρακάτω φάσεις:

- Επιλογή δειγμάτων πλακούντα σε κύβους παραφίνης
- Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης και σύγκριση των βιοψιών
- Ανοσοϊστοχημεία (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, HBsAg, HBcAg)
- Διπλός ανοσοφθορισμός (anti-CD8 με anti-CD28, anti-CD8 με anti-FAS και anti-CD8 με anti-FAS Ligand)
- Συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων – Στατιστική ανάλυση
- Συμπεράσματα

Για την εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πλακούντα εγκλεισμένα σε παραφίνη. Τα πλακουντιακά δείγματα προέρχονται από μητέρες με ηπατίτιδα Β και πάρθηκαν αμέσως μετά τον τοκετό. Προγενέστερα, μετρήθηκε το ιικό φορτίο (HBV-DNA) των νοσούντων γυναικών στο αίμα του ομφάλιου λώρου και οι βάσει αυτού, χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες: (HVL: High Viral Load και LVL: Low Viral Load) και τα νεογέννητα εξετάστηκαν και κρίθηκαν υγιή στον ιό της ηπατίτιδας Β.

Συνολικά οι εξεταζόμενοι κύβοι παραφίνης ήταν 53 (εκ των προτέρων έφεραν κωδική αρίθμηση, η οποία διατηρήθηκε σε όλη τη διάρκεια του πειράματος), χωρισμένοι στις δύο κατηγορίες (βλ. Παράρτημα: Πίνακας Ι) με βάση το ιικό φορτίο (υψηλό ή χαμηλό) καθορισμένο ανάλογα με το HBV-DNA της μητέρας.

Η συγγραφή της παρούσας μελέτης έγινε με τη χρήση του προγράμματος επεξεργασίας κειμένου Microsoft Word. Για τις τροποποιήσεις των εικόνων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Adobe Photoshop και Microsoft Office Picture Manager, ενώ η κατασκευή της βιβλιοθήκης των βιβλιογραφικών αναφορών και η εισαγωγή τους στην παρούσα μελέτη έγινε με το πρόγραμμα EndNote X7.2.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, τα σχήματα και οι πίνακες κατασκευάστηκαν με τη χρήση των στατιστικών προγραμμάτων Excel και SPSS. Η ανάλυση περιελάμβανε μέσες τιμές και σταθερές αποκλίσεις για όλα τα συνεχή δεδομένα. Τα δεδομένα παρουσιάστηκαν σαν αριθμοί και σαν ποσοστά, όπου ήταν κατάλληλο.

Η σύγκριση των δύο ομάδων (χαμηλού ικού φορτίου και υψηλού ικού φορτίου) στηρίχθηκε στα αποτελέσματα που αναλύθηκαν με το παραμετρικό test ANOVA. Τα δεδομένα ακολούθησαν κανονική κατανομή μετά την απομάκρυνση των ακραίων τιμών. Διάστημα εμπιστοσύνης (p value) $<0,05$ ήταν απαιτούμενο για τη στατιστική σημαντικότητα της μελέτης.

5.3 ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΧΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗΣ-ΗΩΣΙΝΗΣ

Με τη χρήση ημι-αυτόματου μικροτόμου Leica πάρθηκαν τομές από όλους τους κύβους παραφίνης για να γίνει η επιλογή των κατάλληλων δειγμάτων για την παρούσα εργασία.

Για να απλωθούν σωστά οι τομές, αρχικά τοποθετήθηκαν πάνω σε δοχείο με πάγο και αφού πάγωσαν αρκετά καλά, κόπηκαν στα 3 μm και μεταφέρθηκαν πρώτα σε δοχείο με νερό βρύσης και στη συνέχεια σε υδατόλουτρο με απεσταγμένο νερό στους 48°C, από όπου και συλλέχθηκαν με αντικειμενοφόρες πλάκες. Στη συνέχεια τα δείγματα αφέθηκαν σε κλίβανο στους 70 °C για μία ώρα και κατόπιν μεταφέρθηκαν στο αυτόματο μηχάνημα Autostainer της εταιρείας Leica για χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης.

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της αποπαραφίνωσης και της ενυδάτωσης των ιστών με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε τρία μπανάκια με ξυλόλη για 5' στο κάθε ένα, οι ιστοί συνέχισαν με εμβαπτίσεις σε οινοπνεύματα με φθίνουσες συγκεντρώσεις (δύο μπανάκια 95% αιθανόλης για 3' στο καθένα, ένα μπανάκι 80% αιθανόλης για 3', ένα μπανάκι 70% αιθανόλης για 3') και τέλος οι ιστοί ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό. Εν συνεχεία, οι ιστοί

παρέμειναν στο μπανάκι με την Αιματοξυλίνη Harris (δύο φορές διηθημένη) για 10' για τη σήμανση των πυρήνων και ξεπλύθηκαν πάλι με τρεχούμενο νερό.

Ακολούθησε μια εμβάπτιση σε μπανάκι με 1% ισοπροπανόλη για 10'' και αφού ξαναξεπλύθηκαν οι ιστοί, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα Ηωσίνης 70% για 1' για τον χρωματισμό του κυτταροπλάσματος.

Ακολούθησε νέο ξέπλυμα με τρεχούμενο νερό και στη συνέχεια αφυδάτωση των τομών με οينوπνεύματα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (70% για 1', 80% για 1', δύο μπανάκια 95% για 1' και δύο μπανάκια με απόλυτη αιθανόλη για 1' το κάθε ένα). Στη συνέχεια, τρία μπανάκια ξυλόλης από 1' το καθένα για την διαύγασή τους.

Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την επικάλυψη των τομών με καλυπτρίδες 50x50mm με τη βοήθεια ρητίνης DPX.

ΚΕΦ.6° ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μέθοδος ανίχνευσης βιολογικών μορίων σε ιστολογικές τομές, η οποία στηρίζεται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος με τη χρήση μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων. Το υπό ανίχνευση μόριο παίζει τον ρόλο του αντιγόνου, το οποίο ανιχνεύεται από μόριο που παίζει το ρόλο του αντισώματος επισημασμένο με χρωμογόνο.

Με τη χρήση ημι-αυτόματου μικροτόμου Leica, πάρθηκαν τομές από όλα τα block παραφίνης σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Η χρήση θετικά φορτισμένων πλακών κρίθηκε απαραίτητη για την αποφυγή σφαλμάτων κατά τη διαδικασία των χρώσεων (πχ. απώλεια ιστού).

Για την ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανίχνευσης EnVision™ FLEX+ της Dako, σε συνδυασμό με τα κατάλληλα όργανα Austostainer Link και Dako PT Link, τα οποία προορίζονται για χρήση σε τομές ιστού εγκλεισμένου σε παραφίνη μετά από μονιμοποίηση σε φορμαλίνη. Το σύστημα ανιχνεύει πρωτογενή αντισώματα ποντικού και κουνελιού, ενώ η αντίδραση είναι ανιχνεύσιμη μέσω του χρωμογόνου DAB. Επιπλέον, το σύστημα ανίχνευσης EnVision™ FLEX+ χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με το EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER), το οποίο περιέχει πρωτεΐνη σταθεροποίησης και έναν αντιμικροβιακό παράγοντα, για να επιτευχθεί ενίσχυση του σήματος των πρωτογενών αντισωμάτων.

Ο λόγος που προτιμήθηκε αυτοματοποιημένη ανοσοϊστοχημική διαδικασία ήταν για να μειωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο η εμπλοκή του ανθρώπινου παράγοντα και να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα και η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.

Η μικροσκόπηση και καταμέτρηση των ανοσοθετικών κυττάρων για τα αντιγόνα CD3, CD4, CD8, HBsAg και HBcAg έγινε σε οπτικό μικροσκόπιο Leica DM1000. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με τη χρήση κάμερας οπτικού μικροσκοπίου Leica DFC 290 και με τη βοήθεια του προγράμματος Leica Application Suite LAS V4.5 του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς «οι Άγιοι Ανάργυροι».

Η παρουσία ανοσοθετικών κυττάρων στα πλακίδια για HBsAg και HBcAg αναζητήθηκε σε όλα τα οπτικά πεδία των ιστών (με φακό 40X) και το αποτέλεσμα δόθηκε σε ποιοτική μορφή.

Η μέτρηση των ανοσοθετικών κυττάρων στα πλακίδια για CD3, CD4 και CD8 έγινε με φακό 20X. Στις λάχνες μετρήθηκαν 30 οπτικά πεδία σε hot spots, παραλείποντας τα λεμφοκύτταρα εντός των αγγείων και εκείνα που βρισκόταν κοντά σε αιματοπήγματα του πλακουντιακού ιστού, για να αποφευχθεί η καταμέτρηση ψευδώς θετικών κυττάρων. Στον φθαρτό μετρήθηκαν 10 οπτικά πεδία με φακό 20X σε hot spots των ιστών. Ο λόγος που αποφασίστηκε ο διαχωρισμός των πεδίων σε φθαρτό και χοριακές λάχνες είναι για να μελετηθεί αν υπάρχει διαφορετική συμπεριφορά των λεμφοκυττάρων στην μητρική και στην εμβρυϊκή επιφάνεια.

6.1 ANTIΣΩΜΑ anti-CD3

Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου μορίου CD3 είναι ένας αξιόπιστος παν-λευκοκυτταρικός δείκτης, ο οποίος εκφράζεται από τα περιφερικά T-λεμφοκύτταρα, τα θυμοκύτταρα και τα ενεργοποιημένα NK κύτταρα.

Ο κλώνος που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο (clone PS1) είναι mouse monoclonal της εταιρίας Biocare Medical και αναγνωρίζει έναν επίτοπο της ε-αλυσίδας του ανθρώπινου μορίου CD3. Κυρίως εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και σποραδικά κυτταροπλασματικά [72]. Στο παρόν πρωτόκολλο έγινε αραιώση 1/150 με κατάλληλο Primary Antibody Diluent της εταιρείας Genemed Biotechnologies, Inc. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε ιστός αμυγδαλής.

6.1.1 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για το anti-CD3

- Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση

Αρχικά πάρθηκαν τομές πάχους 3μm από τους κύβους παραφίνης και των δύο κατηγοριών σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι πλάκες έμειναν στον κλίβανο στους 36°C για ένα βράδυ, ενώ το επόμενο πρωί εισήχθησαν σε κλίβανο στους 70°C για 30', ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία της αποπαραφίνωσης χωρίς να τραυματιστούν οι ιστοί.

Στη συνέχεια οι τομές εισήχθησαν σε αυτόματο μηχάνημα αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης (Autostainer Leica), όπου διαδοχικά εμβαπτίσθηκαν σε τρία μπανάκια με ξυλόλη για 5' στο κάθε ένα και συνέχισαν με εμβαπτίσεις σε οιοπνεύματα με φθίνουσες συγκεντρώσεις (δύο μπανάκια 95% αιθανόλης για 3' στο καθένα, ένα μπανάκι 80% αιθανόλης για 3', ένα μπανάκι 70% αιθανόλης για 3') και τέλος οι ιστοί ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό, ώστε να ενυδατωθεί σωστά ο ιστός.

- Αποκάλυψη αντιγονικών επιτόπων

Το επόμενο βήμα ήταν η θερμικά επαγόμενη ανάκτηση των επιτόπων (HIER: Heat-Induced Epitope Retrieval) με τη χρήση του EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH, σε αραιώση 1:50, το οποίο είναι το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων με τη συγκεκριμένη μέθοδο και αφορά σε διάλυμα Tris/EDTA με pH 9. Οι τομές μεταφέρθηκαν στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα αποκάλυψης αντιγόνων PT Link της Dako και αφού έγινε προθέρμανση του EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution στους 65 °C, συνεχίστηκε η θέρμανση στους 97 °C για 30'.

Η διαδικασία αποκάλυψης των αντιγονικών επιτόπων διήρκησε συνολικά μιάμιση ώρα, μέχρι να πέσει η θερμοκρασία ξανά στους 65 °C και να ολοκληρωθεί ο κύκλος της αποκάλυψης. Στο σημείο αυτό οι πλάκες με τις τομές μεταφέρθηκαν άμεσα σε ειδικό πλαστικό δοχείο (PT Link Rinse Station) με EnVision™ FLEX Wash Buffer αραιωμένο 1:20 και σε θερμοκρασία δωματίου. Αφέθηκαν να κρυώσουν και να ξεπλυθούν για 2' πριν εισαχθούν για ανοσοϊστοχημική χρώση στο πλήρως αυτοματοποιημένο μηχάνημα Austostainer Dako Link και τη χρήση του εγκεκριμένου kit.

- Ανοσοϊστοχημική χρώση

Βήμα 1: για την απενεργοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης του ιστού, οι τομές καλύφθηκαν αρχικά με 200μl EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου, 15mmol/L NaN₃ και απορρυπαντικό) και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με Wash Buffer.

Βήμα 2: οι τομές καλύφθηκαν με 200μl από το πρωτοταγές αντίσωμα anti-CD3 (mouse monoclonal) της Biocare Medical με αραιώση 1/150. Ξέπλυμα με Wash Buffer.

Βήμα 3: οι τομές καλύφθηκαν με 200μl από το σημασμένο δευτεροταγές αντίσωμα (enzyme-labeled) FLEX/HRP (μόρια υπεροξειδάσης και μόρια δευτερογενών αντισωμάτων αίγας, έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού και ποντικιού, συζευγμένα σε δεξτράνη, με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει πρωτεΐνη σταθεροποίησης και συντηρητικό).

Βήμα 4: στη συνέχεια οι τομές καλύφθηκαν με 200μl από το εκ των προτέρων προετοιμασμένο διάλυμα EnVision™ FLEX DAB+Chromogen αραιωμένο στο EnVision™ FLEX substrate buffer (20 σταγόνες στα 20ml), όπου τα αντιγόνα-στόχος απέκτησαν το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα. Τέλος, οι τομές ξεπλύθηκαν με Wash Buffer.

- Αφυδάτωση των τομών και επικάλυψη

Μετά το τέλος της διαδικασίας της ανοσοϊστοχημείας, οι τομές μεταφέρθηκαν στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα επικάλυψης Autostainer Leica για τα επόμενα βήματα αυτού του πρωτοκόλλου, δηλαδή αφυδάτωση και επικάλυψη των τομών.

Οι τομές αρχικά εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα Αιματοξυλίνης Harris (δύο φορές διηθημένη) για 5' για την σήμανση των πυρήνων και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό. Οι πυρήνες απέκτησαν το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Ακολούθησε αφυδάτωση των τομών με οινόπνευμα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (70% για 1', 80% για 1', δύο μπανάκια 95% για 1' και δύο μπανάκια με απόλυτη αιθανόλη για 1' το κάθε ένα). Στη συνέχεια, τρία μπανάκια ξυλόλης από 1' το καθένα για την διαύγασή τους.

Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την επικάλυψη των τομών με καλυπτρίδες 50x50mm με τη βοήθεια ριτίνης DPX.

6.2 ANTIΣΩΜΑ anti-CD4

Το CD4 εκφράζεται στα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα, στα θυμοκύτταρα, στην πλειοψηφία των ώριμων περιφερικών T-λεμφοκυττάρων, στα μονοκύτταρα, στα μακροφάγα και στα δενδριτικά κύτταρα.

Ο κλώνος που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο (clone 1F6) είναι mouse monoclonal της εταιρίας Leica και εντοπίζεται μεμβρανικά. Έγινε αραιώση 1/50 με

κατάλληλο Primary Antibody Diluent της εταιρείας Genemed Biotechnologies, Inc. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε ιστός αμυγδαλής.

6.2.1 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για το anti-CD4

- Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση

Αρχικά πάρθηκαν τομές πάχους 3μm από τους κύβους παραφίνης και των δύο κατηγοριών σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι πλάκες έμειναν στον κλίβανο στους 36°C για ένα βράδυ, ενώ το επόμενο πρωί εισήχθησαν σε κλίβανο στους 70°C για 30', ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία της αποπαραφίνωσης χωρίς να τραυματιστούν οι ιστοί.

Στη συνέχεια οι τομές εισήχθησαν σε αυτόματο μηχάνημα αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης (Autostainer Leica), όπου διαδοχικά εμβαπτίσθηκαν σε τρία μπανάκια με ξυλόλη για 5' στο κάθε ένα και συνέχισαν με εμβαπτίσεις σε οινοπνεύματα με φθίνουσες συγκεντρώσεις (δύο μπανάκια 95% αιθανόλης για 3' στο καθένα, ένα μπανάκι 80% αιθανόλης για 3', ένα μπανάκι 70% αιθανόλης για 3') και τέλος οι ιστοί ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό, ώστε να ενυδατωθεί σωστά ο ιστός.

- Αποκάλυψη αντιγονικών επιτόπων

Το επόμενο βήμα ήταν η θερμικά επαγόμενη ανάκτηση των επιτόπων (HIER: Heat-Induced Epitope Retrieval) με τη χρήση του EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH, σε αραιώση 1:50, το οποίο είναι το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων με τη συγκεκριμένη μέθοδο και αφορά σε διάλυμα Tris/EDTA με pH 9. Οι τομές μεταφέρθηκαν στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα αποκάλυψης αντιγόνων PT Link της Dako και αφού έγινε προθέρμανση του EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution στους 65 °C, συνεχίστηκε η θέρμανση στους 97 °C για 30'.

Η διαδικασία αποκάλυψης των αντιγονικών επιτόπων διήρκησε συνολικά μιάμιση ώρα, μέχρι να πέσει η θερμοκρασία ξανά στους 65 °C και να ολοκληρωθεί ο κύκλος της αποκάλυψης. Στο σημείο αυτό οι πλάκες με τις τομές μεταφέρθηκαν άμεσα σε ειδικό πλαστικό δοχείο (PT Link Rinse Station) με EnVision™ FLEX Wash Buffer αραιωμένο 1:20 και σε θερμοκρασία δωματίου. Αφέθηκαν να κρυσώσουν και να ξεπλυθούν για 2' πριν

εισαχθούν για ανοσοϊστοχημική χρώση στο πλήρως αυτοματοποιημένο μηχάνημα Austostainer Dako Link και τη χρήση του εγκεκριμένου kit.

- Ανοσοϊστοχημική χρώση

Βήμα 1: για την απενεργοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης του ιστού, οι τομές καλύφθηκαν αρχικά με 200μl EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου, 15mmol/L NaN₃ και απορρυπαντικό) και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με Wash Buffer.

Βήμα 2: οι τομές καλύφθηκαν με 200ml από το πρωτοταγές αντίσωμα anti-CD4 (mouse monoclonal) της εταιρείας Leica με αραιώση 1/50. Ξέπλυμα με Wash Buffer.

Βήμα 3: οι τομές καλύφθηκαν με 200μl από το σημασμένο δευτεροταγές αντίσωμα (enzyme-labeled) FLEX/HRP (μόρια υπεροξειδάσης και μόρια δευτερογενών αντισωμάτων αίγας, έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού και ποντικιού, συζευγμένα σε δεξτράνη, με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει πρωτεΐνη σταθεροποίησης και συντηρητικό).

Βήμα 4: στη συνέχεια οι τομές καλύφθηκαν με 200μl από το εκ των προτέρων προετοιμασμένο διάλυμα EnVision™ FLEX DAB+Chromogen αραιωμένο στο EnVision™ FLEX substrate buffer (20 σταγόνες στα 20ml), όπου τα αντιγόνα-στόχος απέκτησαν το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα. Τέλος, οι τομές ξεπλύθηκαν με Wash Buffer.

- Αφυδάτωση των τομών και επικάλυψη

Μετά το τέλος της διαδικασίας της ανοσοϊστοχημείας, οι τομές μεταφέρθηκαν στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα επικάλυψης Autostainer Leica για τα επόμενα βήματα αυτού του πρωτοκόλλου, δηλαδή αφυδάτωση και επικάλυψη των τομών.

Οι τομές αρχικά εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα Αιματοξυλίνης Harris (δύο φορές διηθημένη) για 5' για την σήμανση των πυρήνων και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό. Οι πυρήνες έλαβαν το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Ακολούθησε αφυδάτωση των τομών με οιοπνεύματα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (70% για 1', 80% για 1', δύο μπανάκια 95% για 1' και δύο μπανάκια με απόλυτη αιθανόλη για 1' το κάθε ένα). Στη συνέχεια, τρία μπανάκια ξυλόλης από 1' το καθένα για την διαύγασή τους.

Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την επικάλυψη των τομών με καλυπτρίδες 50x50mm με τη βοήθεια ρητίνης DPX.

6.3 ANΤΙΣΩΜΑ anti-CD8

Το CD8 εκφράζεται (κυρίως ως ετεροδιμερές) από τα ώριμα κυτταροτοξικά κατασταλτικά T-λεμφοκύτταρα και από την πλειοψηφία των θυμοκυττάρων [74].

Ο κλώνος που χρησιμοποιήθηκε στο εν λόγω πρωτόκολλο (C8/144B) είναι mouse monoclonal της εταιρίας Dako και εντοπίζεται μεμβρανικά. Έγινε αραίωση 1/100 με κατάλληλο Primary Antibody Diluent της εταιρείας Genemed Biotechnologies, Inc. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε ιστός αμυγδαλής.

6.3.1 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για το anti-CD8

- Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση

Αρχικά πάρθηκαν τομές πάχους 3μm από τους κύβους παραφίνης και των δύο κατηγοριών σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι πλάκες έμειναν στον κλίβανο στους 36°C για ένα βράδυ, ενώ το επόμενο πρωί εισήχθησαν σε κλίβανο στους 70°C για 30', ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία της αποπαραφίνωσης χωρίς να τραυματιστούν οι ιστοί.

Στη συνέχεια οι τομές εισήχθησαν σε αυτόματο μηχάνημα αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης (Autostainer Leica), όπου διαδοχικά εμβαπτίσθηκαν σε τρία μπανάκια με ξυλόλη για 5' στο κάθε ένα και συνέχισαν με εμβαπτίσεις σε οινόπνευμα με φθίνουσες συγκεντρώσεις (δύο μπανάκια 95% αιθανόλης για 3' στο καθένα, ένα μπανάκι 80% αιθανόλης για 3', ένα μπανάκι 70% αιθανόλης για 3') και τέλος οι ιστοί ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό, ώστε να ενυδατωθεί σωστά ο ιστός.

- Αποκάλυψη αντιγονικών επιτόπων

Το επόμενο βήμα ήταν η θερμικά επαγόμενη ανάκτηση των επιτόπων (HIER: Heat-Induced Epitope Retrieval) με τη χρήση του EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH, σε αραίωση 1:50, το οποίο είναι το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων με τη συγκεκριμένη μέθοδο και αφορά σε διάλυμα

Tris/EDTA με pH 9. Οι τομές μεταφέρθηκαν στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα αποκάλυψης αντιγόνων PT Link της Dako και αφού έγινε προθέρμανση του EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution στους 65 °C, συνεχίστηκε η θέρμανση στους 97 °C για 30'.

Η διαδικασία αποκάλυψης των αντιγονικών επιτόπων διήρκησε συνολικά μιάμιση ώρα, μέχρι να πέσει η θερμοκρασία ξανά στους 65 °C και να ολοκληρωθεί ο κύκλος της αποκάλυψης. Στο σημείο αυτό οι πλάκες με τις τομές μεταφέρθηκαν άμεσα σε ειδικό πλαστικό δοχείο (PT Link Rinse Station) με EnVision™ FLEX Wash Buffer αραιωμένο 1:20 και σε θερμοκρασία δωματίου. Αφέθηκαν να κρυσώσουν και να ξεπλυθούν για 2' πριν εισαχθούν για ανοσοϊστοχημική χρώση στο πλήρως αυτοματοποιημένο μηχάνημα Austostainer Dako Link και τη χρήση του εγκεκριμένου kit.

- Ανοσοϊστοχημική χρώση

Βήμα 1: για την απενεργοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης του ιστού, οι τομές καλύφθηκαν αρχικά με 200μl EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου, 15mmol/L NaN₃ και απορρυπαντικό) και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με Wash Buffer.

Βήμα 2: οι τομές καλύφθηκαν με 200ml από το πρωτοταγές αντίσωμα anti-CD8 (mouse monoclonal) της Dako με αραιώση 1/100. Ξέπλυμα με Wash Buffer.

Βήμα 3: οι τομές καλύφθηκαν με 200μl από το σημασμένο δευτεροταγές αντίσωμα (enzyme-labeled) FLEX/HRP (μόρια υπεροξειδάσης και μόρια δευτερογενών αντισωμάτων αίγας, έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού και ποντικιού, συζευγμένα σε δεξτράνη, με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει πρωτεΐνη σταθεροποίησης και συντηρητικό).

Βήμα 4: στη συνέχεια οι τομές καλύφθηκαν με 200μl από το εκ των προτέρων προετοιμασμένο διάλυμα EnVision™ FLEX DAB+Chromogen αραιωμένο στο EnVision™ FLEX substrate buffer (20 σταγόνες στα 20ml), όπου τα αντιγόνα-στόχος απέκτησαν το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα.

Τέλος, οι τομές ξεπλύθηκαν με Wash Buffer.

- Αφυδάτωση των τομών και επικάλυψη

Μετά το τέλος της διαδικασίας της ανοσοϊστοχημείας, οι τομές μεταφέρθηκαν στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα επικάλυψης Autostainer Leica για τα επόμενα βήματα αυτού του πρωτοκόλλου, δηλαδή αφυδάτωση και επικάλυψη των τομών.

Οι τομές αρχικά εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα Αιματοξυλίνης Harris (δύο φορές διηθημένη) για 5' για την σήμανση των πυρήνων και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό. Οι πυρήνες έλαβαν το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Ακολούθησε αφυδάτωση των τομών με οιοπνεύματα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (70% για 1', 80% για 1', δύο μπανάκια 95% για 1' και δύο μπανάκια με απόλυτη αιθανόλη για 1' το κάθε ένα). Στη συνέχεια, τρία μπανάκια ξυλόλης από 1' το καθένα για την διαύγασή τους. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την επικάλυψη των τομών με καλυπτρίδες 50x50mm με τη βοήθεια ρητίνης DPX.

Κατά τη μικροσκόπηση των κεχρωσμένων ιστών, αναγκαστήκαμε να απορρίψουμε ορισμένα δείγματα λόγω ελλιπούς αντιγονικής συμπεριφοράς, πράγμα που αποδεικνύεται από το αρνητικό εσωτερικό control των ιστών, που ιστοπαθολογικά είναι τα λεμφοκύτταρα εντός των αγγείων, ενώ ταυτόχρονα ο λεμφαδενικός ιστός που χρησιμοποιήθηκε ως θετικό control ήταν θετικά κεχρωσμένος. Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε πως οι συγκεκριμένοι ιστοί είτε έχασαν την αντιγονικότητά τους επειδή δεν μονιμοποιήθηκαν καλά πριν την επεξεργασία, είτε είχαν μεγάλη παραμονή στην φορμόλη (αυτόλυση ιστού;) πριν την επεξεργασία. Και οι δύο πιθανές εξηγήσεις έχουν το ίδιο αποτέλεσμα, το οποίο είναι η ελλιπής αντιγονικότητα του ιστού σε ορισμένα «ευαίσθητα» αντισώματα κατά την ανοσοϊστοχημεία, στην προκειμένη περίπτωση το αντίσωμα anti-CD8 της εταιρείας Dako.

Τα δείγματα που απορρίφθηκαν από την επεξεργασία επειδή δεν έβαψαν στο αντίσωμα anti-CD8, ήταν όλα της LVL ομάδας και ήταν τα εξής: 28, 41, 48A, 51, 52, 55.

6.4 ANTIΣΩΜΑ HBsAg

Αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης επιφανείας S του ιού της ηπατίτιδας B. Το συγκεκριμένο αντίσωμα επισημαίνει το κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων.

Ο κλώνος που χρησιμοποιήθηκε στο εν λόγω πρωτόκολλο (clone T9) είναι mouse monoclonal της εταιρίας Dako και χρησιμοποιήθηκε με αραιώση 1/50 με κατάλληλο Primary Antibody Diluent της εταιρείας Genemed Biotechnologies, Inc. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε μολυσμένος ηπατικός ιστός.

6.4.1 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για το HBsAg

- Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση

Αρχικά πάρθηκαν τομές πάχους 3μm από τους κύβους παραφίνης και των δύο κατηγοριών σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι πλάκες έμειναν στον κλίβανο στους 36°C για ένα βράδυ, ενώ το επόμενο πρωί εισήχθησαν σε κλίβανο στους 70°C για 30', ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία της αποπαραφίνωσης χωρίς να τραυματιστούν οι ιστοί.

Στη συνέχεια οι τομές εισήχθησαν σε αυτόματο μηχάνημα αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης (Autostainer Leica), όπου διαδοχικά εμβαπτίσθηκαν σε τρία μπανάκια με ξυλόλη για 5' στο κάθε ένα και συνέχισαν με εμβαπτίσεις σε οινοπνεύματα με φθίνουσες συγκεντρώσεις (δύο μπανάκια 95% αιθανόλης για 3' στο καθένα, ένα μπανάκι 80% αιθανόλης για 3', ένα μπανάκι 70% αιθανόλης για 3') και τέλος οι ιστοί ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό, ώστε να ενυδατωθεί σωστά ο ιστός.

- Αποκάλυψη αντιγονικών επιτόπων

Το επόμενο βήμα ήταν η θερμικά επαγόμενη ανάκτηση των επιτόπων (HIER: Heat-Induced Epitope Retrieval) με τη χρήση του EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH, σε αραιώση 1:50, το οποίο είναι το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων με τη συγκεκριμένη μέθοδο και αφορά σε διάλυμα Tris/EDTA με pH 9. Οι τομές μεταφέρθηκαν στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα αποκάλυψης αντιγόνων PT Link της Dako και αφού έγινε προθέρμανση του EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution στους 65 °C, συνεχίστηκε η θέρμανση στους 97 °C για 30'.

Η διαδικασία αποκάλυψης των αντιγονικών επιτόπων διήρκησε συνολικά μιάμιση ώρα, μέχρι να πέσει η θερμοκρασία ξανά στους 65 °C και να ολοκληρωθεί ο κύκλος της αποκάλυψης.

Στο σημείο αυτό οι πλάκες με τις τομές μεταφέρθηκαν άμεσα σε ειδικό πλαστικό δοχείο (PT Link Rinse Station) με EnVision™ FLEX Wash Buffer αραιωμένο 1:20 και σε θερμοκρασία δωματίου. Αφέθηκαν να κρυσώσουν και να ξεπλυθούν για 2' πριν εισαχθούν για ανοσοϊστοχημική χρώση στο πλήρως αυτοματοποιημένο μηχάνημα Austostainer Dako Link και τη χρήση του εγκεκριμένου kit.

- Ανοσοϊστοχημική χρώση

Βήμα 1: για την απενεργοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης του ιστού, οι τομές καλύφθηκαν αρχικά με 200μl EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου, 15mmol/L NaN₃ και απορρυπαντικό) και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με Wash Buffer.

Βήμα 2: οι τομές καλύφθηκαν με 200ml από το πρωτοταγές αντίσωμα HBsAg (surface) της Dako (mouse monoclonal) με αραιώση 1/50. Ξέπλυμα με Wash Buffer.

Βήμα 3: οι τομές καλύφθηκαν με 200μl από το σημασμένο δευτεροταγές αντίσωμα (enzyme-labeled) FLEX/HRP (μόρια υπεροξειδάσης και μόρια δευτερογενών αντισωμάτων αίγας, έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού και ποντικιού, συζευγμένα σε δεξτράνη, με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει πρωτεΐνη σταθεροποίησης και συντηρητικό).

Βήμα 4: στη συνέχεια οι τομές καλύφθηκαν με 200μl από το εκ των προτέρων προετοιμασμένο διάλυμα EnVision™ FLEX DAB+Chromogen αραιωμένο στο EnVision™ FLEX substrate buffer (20 σταγόνες στα 20ml), όπου τα αντιγόνα-στόχος απέκτησαν το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα. Τέλος, οι τομές ξεπλύθηκαν με Wash Buffer.

- Αφυδάτωση των τομών και επικάλυψη

Μετά το τέλος της διαδικασίας της ανοσοϊστοχημείας, οι τομές μεταφέρθηκαν στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα επικάλυψης Autostainer Leica για τα επόμενα βήματα αυτού του πρωτοκόλλου, δηλαδή αφυδάτωση και επικάλυψη των τομών.

Οι τομές αρχικά εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα Αιματοξυλίνης Harris (δύο φορές διηθημένη) για 5' για την σήμανση των πυρήνων και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό. Οι πυρήνες έλαβαν το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα.

Ακολούθησε αφυδάτωση των τομών με οιοπνεύματα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (70% για 1', 80% για 1', δύο μπανάκια 95% για 1' και δύο μπανάκια με απόλυτη αιθανόλη για 1' το κάθε ένα). Στη συνέχεια, τρία μπανάκια ξυλόλης από 1' το καθένα για την διαύγασή τους. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την επικάλυψη των τομών με καλυπτρίδες 50x50mm με τη βοήθεια ρητίνης DPX.

6.5 ANTISΩΜΑ HBcAg

Αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας B. Το συγκεκριμένο αντίσωμα επισημαίνει τον πυρήνα και σποραδικά το κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων.

Στο εν λόγω πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα rabbit polyclonal της εταιρίας Dako, με αραιώση 1/400 με κατάλληλο Primary Antibody Diluent της εταιρείας Genemed Biotechnologies, Inc. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε μολυσμένος ηπατικός ιστός.

6.5.1 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για το HBcAg

- Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση

Αρχικά πάρθηκαν τομές πάχους 3μm από τους κύβους παραφίνης και των δύο κατηγοριών σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι πλάκες έμειναν στον κλίβανο στους 36°C για ένα βράδυ, ενώ το επόμενο πρωί εισήχθησαν σε κλίβανο στους 70°C για 30', ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία της αποπαραφίνωσης χωρίς να τραυματιστούν οι ιστοί.

Στη συνέχεια οι τομές εισήχθησαν σε αυτόματο μηχάνημα αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης (Autostainer Leica), όπου διαδοχικά εμβαπτίσθηκαν σε τρία μπανάκια με ξυλόλη για 5' στο κάθε ένα και συνέχισαν με εμβαπτίσεις σε οιοπνεύματα με φθίνουσες συγκεντρώσεις (δύο μπανάκια 95% αιθανόλης για 3' στο καθένα, ένα μπανάκι 80% αιθανόλης για 3', ένα μπανάκι 70% αιθανόλης για 3') και τέλος οι ιστοί ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό, ώστε να ενυδατωθεί σωστά ο ιστός.

- Αποκάλυψη αντιγονικών επιτόπων

Το επόμενο βήμα ήταν η θερμικά επαγόμενη ανάκτηση των επιτόπων (HIER: Heat-Induced Epitope Retrieval) με τη χρήση του EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution,

High pH, σε αραιώση 1:50, το οποίο είναι το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων με τη συγκεκριμένη μέθοδο και αφορά σε διάλυμα Tris/EDTA με pH 9. Οι τομές μεταφέρθηκαν στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα αποκάλυψης αντιγόνων PT Link της Dako και αφού έγινε προθέρμανση του EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution στους 65 °C, συνεχίστηκε η θέρμανση στους 97 °C για 30'. Η διαδικασία αποκάλυψης των αντιγονικών επιτόπων διήρκησε συνολικά μιάμιση ώρα, μέχρι να πέσει η θερμοκρασία ξανά στους 65 °C και να ολοκληρωθεί ο κύκλος της αποκάλυψης.

Στο σημείο αυτό οι πλάκες με τις τομές μεταφέρθηκαν άμεσα σε ειδικό πλαστικό δοχείο (PT Link Rinse Station) με EnVision™ FLEX Wash Buffer αραιωμένο 1:20 και σε θερμοκρασία δωματίου. Αφέθηκαν να κρυσώσουν και να ξεπλυθούν για 2' πριν εισαχθούν για ανοσοϊστοχημική χρώση στο πλήρως αυτοματοποιημένο μηχάνημα Austostainer Dako Link και τη χρήση του εγκεκριμένου kit.

- Ανοσοϊστοχημική χρώση

Βήμα 1: για την απενεργοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης του ιστού, οι τομές καλύφθηκαν αρχικά με 200μl EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου, 15mmol/L NaN₃ και απορρυπαντικό) και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με Wash Buffer.

Βήμα 2: οι τομές καλύφθηκαν με 200ml από το πρωτοταγές αντίσωμα HBcAg (core) της Dako (rabbit polyclonal) με αραιώση 1/400. Ξέπλυμα με Wash Buffer.

Βήμα 3: οι τομές καλύφθηκαν με 200μl από το σημασμένο δευτεροταγές αντίσωμα (enzyme-labeled) FLEX/HRP (μόρια υπεροξειδάσης και μόρια δευτερογενών αντισωμάτων αίγας, έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού και ποντικιού, συζευγμένα σε δεξτράνη, με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει πρωτεΐνη σταθεροποίησης και συντηρητικό).

Βήμα 4: στη συνέχεια οι τομές καλύφθηκαν με 200μl από το εκ των προτέρων προετοιμασμένο διάλυμα EnVision™ FLEX DAB+Chromogen αραιωμένο στο EnVision™ FLEX substrate buffer (20 σταγόνες στα 20ml), όπου τα αντιγόνα-στόχος απέκτησαν το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα. Τέλος, οι τομές ξεπλύθηκαν με Wash Buffer.

- Αφυδάτωση των τομών και επικάλυψη

Μετά το τέλος της διαδικασίας της ανοσοϊστοχημείας, οι τομές μεταφέρθηκαν στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα επικάλυψης Autostainer Leica για τα επόμενα βήματα αυτού του πρωτοκόλλου, δηλαδή αφυδάτωση και επικάλυψη των τομών.

Οι τομές αρχικά εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα Αιματοξυλίνης Harris (δύο φορές διηθημένη) για 5' για την σήμανση των πυρήνων και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό. Οι πυρήνες έλαβαν το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα.

Ακολούθησε αφυδάτωση των τομών με οινόπνεύματα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (70% για 1', 80% για 1', δύο μπανάκια 95% για 1' και δύο μπανάκια με απόλυτη αιθανόλη για 1' το κάθε ένα). Στη συνέχεια, τρία μπανάκια ξυλόλης από 1' το καθένα για την διαύγασή τους.

Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την επικάλυψη των τομών με καλυπτρίδες 50x50mm με τη βοήθεια ρητίνης DPX.

ΚΕΦ.7° ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Ο ανοσοφθορισμός είναι μέθοδος ανίχνευσης και εντόπισης αντισωμάτων ή αντιγόνων σε ιστούς και κύτταρα με τη χρήση σημασμένων αντισωμάτων με φθοριόχρωμα. Φθοριοχρώματα ή φθορίζουσες χρωστικές ουσίες είναι ειδικές ουσίες με ιδιότητα φθορισμού. Κάθε φθοριόχρωμα απελευθερώνει φθορίζον φως συγκεκριμένου μήκους κύματος.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε διπλός έμμεσος ανοσοφθορισμός. Στην τεχνική αυτή έγινε ταυτόχρονη χρήση δύο αντιορρών σημασμένων με διαφορετικά φθοριοχρώματα, για την παράλληλη ανίχνευση δύο διαφορετικών αντιγόνων στο ίδιο ιστικό υπόστρωμα.

Για τα πρωτόκολλα ανοσοφθορισμού επιλέχθηκαν δείγματα υψηλού και χαμηλού ιικού φορτίου (5 εκ των HVL και 5 εκ των LVL), τα οποία κατά την ανοσοϊστοχημεία εμφάνιζαν περισσότερα CD8(+) κύτταρα σε hot spots ανά ομάδα. Στις τομές αυτές εφαρμόστηκαν τρία πρωτόκολλα διπλού ανοσοφθορισμού (anti-CD8 με anti-CD28, anti-CD8 με anti-Fas και anti-CD8 με anti-Fas Ligand) με διαφορετικούς χρωματικούς συνδυασμούς.

Η ποσοτικοποίηση των διπλών ανοσοφθορισμών έγινε με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού Eclipse E 400, Nikon. Οι φωτογραφίες διπλών ανοσοφθορισμών ελήφθησαν σε μηχανοκίνητο ορθό συνεστιακό μικροσκόπιο σταθερής τράπεζας Leica TCS SP στη Μονάδα Οπτικής Μικροσκοπίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Η μέτρηση των διπλά φθορίζοντων αντισωμάτων έγινε με φακό 40X και καταμετρήθηκαν όλα τα οπτικά πεδία κάθε δείγματος, φτάνοντας σε απόλυτο αριθμό διπλά θετικών αντισωμάτων και εν γένει, μετατροπή αυτού σε ποσοστό.

7.1 ΔΙΠΛΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΓΙΑ anti-CD8 ΚΑΙ anti-CD28

Το CD28 μετέχει στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στην επιλογή κλώνων, στην παραγωγή των κυτταροκινών και στην προώθηση της επιβίωσης των T-λεμφοκυττάρων. Επίσης, έχει ενεργό ρόλο στην

επικοινωνία των Τ-λεμφοκυττάρων με τα Β-λεμφοκύτταρα, μέσω του ειδικού προσδέτη του (CD86).

Στο εν λόγω πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για το αντίσωμα anti-CD8 ο κλώνος C8/144B (mouse monoclonal) της εταιρίας Dako με αραίωση 1/100, ενώ για το αντίσωμα anti-CD28 χρησιμοποιήθηκε polyclonal rabbit της εταιρίας Bioss, με αραίωση 1/200. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε λεμφαδενικός ιστός.

1^η ημέρα:

- Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση

Αρχικά πάρθηκαν τομές πάχους 3μm από τους κύβους παραφίνης και των δύο κατηγοριών σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι πλάκες έμειναν στον κλίβανο στους 36°C για ένα βράδυ, ενώ το επόμενο πρωί εισήχθησαν σε κλίβανο στους 70°C για 30', ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία της αποπαραφίνωσης χωρίς να τραυματιστούν οι ιστοί.

Στη συνέχεια οι τομές εισήχθησαν σε αυτόματο μηχάνημα αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης (Autostainer Leica), όπου διαδοχικά εμβαπτίστηκαν σε τρία μπανάκια με ξυλόλη για 5' στο κάθε ένα και συνέχισαν με εμβαπτίσεις σε οινόπνευμα με φθίνουσες συγκεντρώσεις (δύο μπανάκια 95% αιθανόλης για 3' στο καθένα, ένα μπανάκι 80% αιθανόλης για 3', ένα μπανάκι 70% αιθανόλης για 3') και τέλος οι ιστοί ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό, ώστε να ενυδατωθεί σωστά ο ιστός.

- Αποκάλυψη αντιγονικών επιτόπων

Το επόμενο βήμα ήταν η θερμικά επαγόμενη ανάκτηση των επιτόπων (HIER: Heat-Induced Epitope Retrieval) με τη χρήση του EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH, σε αραίωση 1:50, το οποίο είναι το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων με τη συγκεκριμένη μέθοδο και αφορά σε διάλυμα Tris/EDTA με pH 9.

Οι τομές μεταφέρθηκαν στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα αποκάλυψης αντιγόνων PT Link της Dako και αφού έγινε προθέρμανση του EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution στους 65 °C, συνεχίστηκε η θέρμανση στους 97 °C για 30'. Η διαδικασία αποκάλυψης των αντιγονικών επιτόπων διήρκησε συνολικά μιάμιση ώρα, μέχρι να πέσει η θερμοκρασία ξανά στους 65 °C και να ολοκληρωθεί ο κύκλος της αποκάλυψης. Στο

σημείο αυτό οι πλάκες με τις τομές μεταφέρθηκαν άμεσα σε ειδικό πλαστικό δοχείο (PT Link Rinse Station) με EnVision™ FLEX Wash Buffer αραιωμένο 1:20 και σε θερμοκρασία δωματίου. Αφέθηκαν να ξεπλυθούν και να κρυσώσουν για 30'.

Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν τρεις φορές διαδοχικά σε διάλυμα PBS, για 5' κάθε φορά.

- Blocking

Προετοιμάζεται το διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί για το Blocking 10% NDS (Normal Donkey Serum) σε PBS. Περιχαρακώνονται οι τομές και καλύπτονται με 300μl για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Στο επόμενο βήμα τινάζεται το διάλυμα πάνω από τις τομές, χωρίς να ξεπλυθούν.

- 1^ο αντίσωμα (anti-CD8)

Στη συνέχεια καλύφθηκαν οι τομές με 300μl από το πρώτο αντίσωμα, το anti-CD8 (mouse monoclonal) της DAKO, με αραιώση 1/100 με κατάλληλο Primary Antibody Diluent της εταιρείας Genemed Biotechnologies, Inc. Οι τομές τοποθετήθηκαν στο ψυγείο (4°C) σε ειδικό πλαστικό δοχείο χρώσεων για 24 ώρες.

2^η ημέρα:

Οι τομές βγήκαν από το ψυγείο και ξεπλύθηκαν με διάλυμα PBS τρεις φορές, για 10' η κάθε φορά.

Προετοιμάζεται το δευτεροταγές/φθορίζον αντίσωμα, το οποίο επιλέχθηκε να είναι anti-mouse, λόγω του ότι το πρώτο αντίσωμα anti-CD8 ήταν mouse. Επιλέχθηκε κόκκινο donkey anti-mouse με αραιώση 1/300 με 2% NDS σε PBS. Καλύφθηκαν οι τομές με 300μl και αφέθηκαν να επωαστούν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό περιβάλλον.

Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS από 10' η κάθε φορά.

- 2^ο αντίσωμα (anti-CD28)

Προετοιμάζεται το διάλυμα με το anti-CD28, το οποίο είναι της εταιρείας Bioss (polyclonal rabbit) και χρησιμοποιήθηκε με αραιώση 1/200 με 4% NDS σε PBS. Από αυτό το διάλυμα

καλύφθηκε κάθε τομή με 300μl. Στη συνέχεια αφέθηκαν στο ψυγείο (4°C) στο ειδικό πλαστικό δοχείο για 48 ώρες.

3^η ημέρα:

Ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS για 10' η κάθε φορά σε σκοτεινές συνθήκες και προετοιμάστηκε το δεύτερο φθορίζον αντίσωμα που θα χρησιμοποιηθεί έναντι του anti-CD28 (anti-rabbit, λόγω του ότι το anti-CD28 ήταν rabbit) και επιλέχθηκε διαφορετικό χρώμα του κόκκινου που ήδη χρησιμοποιήθηκε για το πρώτο αντίσωμα. Στην προκειμένη περίπτωση επιλέχθηκε πράσινο donkey anti-rabbit με αραιώση 1/300 με 2% NDS σε PBS και με αυτό το διάλυμα καλύφθηκε με 300μl κάθε τομή. Οι τομές αφέθηκαν στο ειδικό σκοτεινό πλαστικό δοχείο χρώσεων για επώαση 2 ώρες.

Στη συνέχεια, οι τομές ξεπλύθηκαν με PBS τρεις φορές διαδοχικά, για 10' η κάθε φορά σε σκοτεινές συνθήκες.

Τέλος, οι τομές καλύφθηκαν με γλυκερόλη σε PBS.

- Αποτέλεσμα διπλού ανοσοφθορισμού:

Το αντίσωμα anti-CD8 σημάνθηκε με κόκκινο χρώμα, ενώ το αντίσωμα anti-CD28 σημάνθηκε με πράσινο.

7.2 ΔΙΠΛΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ anti-CD8 ΚΑΙ anti-FAS LIGAND

Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για το αντίσωμα anti-CD8 ο κλώνος C8/144B (mouse monoclonal) της εταιρίας Dako με αραιώση 1/100, ενώ για το αντίσωμα anti-Fas Ligand (CD178) χρησιμοποιήθηκε polyclonal rabbit της εταιρίας Acris, με αραιώση 1/100.

Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε λεμφαδενικός ιστός.

1^η ημέρα:

- Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση

Αρχικά πάρθηκαν τομές πάχους 3μm από τους κύβους παραφίνης και των δύο κατηγοριών σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι πλάκες έμειναν στον κλίβανο στους

36°C για ένα βράδυ, ενώ το επόμενο πρωί εισήχθησαν σε κλίβανο στους 70°C για 30', ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία της αποπαραφίνωσης χωρίς να τραυματιστούν οι ιστοί.

Στη συνέχεια οι τομές εισήχθησαν σε αυτόματο μηχάνημα αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης (Autostainer Leica), όπου διαδοχικά εμβαπτίσθηκαν σε τρία μπανάκια με ξυλόλη για 5' στο κάθε ένα και συνέχισαν με εμβαπτίσεις σε οινοπνεύματα με φθίνουσες συγκεντρώσεις (δύο μπανάκια 95% αιθανόλης για 3' στο καθένα, ένα μπανάκι 80% αιθανόλης για 3', ένα μπανάκι 70% αιθανόλης για 3') και τέλος οι ιστοί ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό, ώστε να ενυδατωθεί σωστά ο ιστός.

- Αποκάλυψη αντιγονικών επιτόπων

Το επόμενο βήμα ήταν η θερμικά επαγόμενη ανάκτηση των επιτόπων (HIER: Heat-Induced Epitope Retrieval) με τη χρήση του EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH, σε αραιώση 1:50, το οποίο είναι το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων με τη συγκεκριμένη μέθοδο και αφορά σε διάλυμα Tris/EDTA με pH 9. Οι τομές μεταφέρθηκαν στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα αποκάλυψης αντιγόνων PT Link της Dako και αφού έγινε προθέρμανση του EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution στους 65 °C, συνεχίστηκε η θέρμανση στους 97 °C για 30'. Η διαδικασία αποκάλυψης των αντιγονικών επιτόπων διήρκεσε συνολικά μιάμιση ώρα, μέχρι να πέσει η θερμοκρασία ξανά στους 65 °C και να ολοκληρωθεί ο κύκλος της αποκάλυψης.

Στο σημείο αυτό οι πλάκες με τις τομές μεταφέρθηκαν άμεσα σε ειδικό πλαστικό δοχείο (PT Link Rinse Station) με EnVision™ FLEX Wash Buffer αραιωμένο 1:20 και σε θερμοκρασία δωματίου. Αφέθηκαν να ξεπλυθούν και να κρυσώσουν για 30'.

Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν τρεις φορές διαδοχικά σε διάλυμα PBS, για 5' κάθε φορά.

- Blocking

Προετοιμάζεται το διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί για το Blocking 10% NDS (Normal Donkey Serum) σε PBS. Περιχαράκωνονται οι τομές και καλύπτονται με 300μl για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Στο επόμενο βήμα τινάζεται το διάλυμα πάνω από τις τομές, χωρίς να ξεπλυθούν.

- 1^ο αντίσωμα (anti-CD8)

Στη συνέχεια καλύπτονται οι τομές με 300μl από το πρώτο αντίσωμα, το anti-CD8 (mouse monoclonal) της DAKO, με αραιώση 1/100 με κατάλληλο Primary Antibody Diluent της εταιρείας Genemed Biotechnologies, Inc. Οι τομές τοποθετούνται στο ψυγείο (4°C) σε ειδικό πλαστικό δοχείο χρώσεων για 24 ώρες.

2^η ημέρα:

Οι τομές βγαίνουν από το ψυγείο και ξεπλένονται με διάλυμα PBS τρεις φορές, για 10' η κάθε φορά.

Προετοιμάζεται το δευτεροταγές/φθορίζον αντίσωμα, το οποίο επιλέχθηκε να είναι anti-mouse, λόγω του ότι το πρώτο αντίσωμα anti-CD8 ήταν mouse. Επιλέχθηκε κόκκινο donkey anti-mouse με αραιώση 1/300 με 2% NDS σε PBS. Καλύφθηκαν οι τομές με 300μl και αφέθηκαν να επωαστούν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό περιβάλλον. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS από 10' η κάθε φορά.

- 2^ο αντίσωμα (anti-Fas Ligand)

Προετοιμάζεται το διάλυμα με το anti-Fas Ligand, το οποίο είναι της εταιρείας Acris (rabbit polyclonal) και θα χρησιμοποιηθεί με αραιώση 1/100 με 4% NDS σε PBS. Από αυτό το διάλυμα καλύφθηκε κάθε τομή με 300μl. Στη συνέχεια αφέθηκαν στο ψυγείο (4°C) στο ειδικό πλαστικό δοχείο για 48 ώρες.

3^η ημέρα:

Ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS για 10' η κάθε φορά σε σκοτεινές συνθήκες και προετοιμάστηκε το δεύτερο φθορίζον αντίσωμα που θα χρησιμοποιηθεί έναντι του anti-Fas Ligand (anti-rabbit, λόγω του ότι το anti-Fas Ligand ήταν rabbit) και επιλέχθηκε διαφορετικό χρώμα του κόκκινου που ήδη χρησιμοποιήθηκε για το πρώτο αντίσωμα. Στην προκειμένη περίπτωση επιλέχθηκε πράσινο donkey anti-rabbit με αραιώση 1/300 με 2% NDS σε PBS και από αυτό το διάλυμα καλύφθηκε με 300μl κάθε τομή. Οι τομές αφέθηκαν στο ειδικό σκοτεινό πλαστικό δοχείο χρώσεων για επώαση 2 ώρες. Στη συνέχεια, οι τομές ξεπλύθηκαν με PBS τρεις φορές διαδοχικά, για 10' η κάθε φορά σε σκοτεινές συνθήκες. Τέλος, οι τομές καλύφθηκαν με γλυκερόλη σε PBS.

- Αποτέλεσμα διπλού ανοσοφθορισμού:

Το αντίσωμα anti-CD8 σημάνθηκε με κόκκινο χρώμα, ενώ το αντίσωμα anti-Fas Ligand σημάνθηκε με πράσινο.

7.3 ΔΙΠΛΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ anti-CD8 ΚΑΙ anti-FAS

Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για το αντίσωμα anti-CD8 ο κλώνος C8/144B (mouse monoclonal) της εταιρίας Dako με αραιώση 1/100, ενώ για το αντίσωμα anti-Fas (CD95) χρησιμοποιήθηκε polyclonal goat της εταιρίας Abcam, με αραιώση 1/133. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε ιστός από αμυγδαλή.

1^η ημέρα:

- Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση

Αρχικά πάρθηκαν τομές πάχους 3μm από τους κύβους παραφίνης και των δύο κατηγοριών σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι πλάκες έμειναν στον κλίβανο στους 36°C για ένα βράδυ, ενώ το επόμενο πρωί εισήχθησαν σε κλίβανο στους 70°C για 30', ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία της αποπαραφίνωσης χωρίς να τραυματιστούν οι ιστοί.

Στη συνέχεια οι τομές εισήχθησαν σε αυτόματο μηχάνημα αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης (Autostainer Leica), όπου διαδοχικά εμβαπτίσθηκαν σε τρία μπανάκια με ξυλόλη για 5' στο κάθε ένα και συνέχισαν με εμβαπτίσεις σε οιοπνεύματα με φθίνουσες συγκεντρώσεις (δύο μπανάκια 95% αιθανόλης για 3' στο καθένα, ένα μπανάκι 80% αιθανόλης για 3', ένα μπανάκι 70% αιθανόλης για 3') και τέλος οι ιστοί ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό, ώστε να ενυδατωθεί σωστά ο ιστός.

- Αποκάλυψη αντιγονικών επιτόπων

Το επόμενο βήμα ήταν η θερμικά επαγόμενη ανάκτηση των επιτόπων (HIER: Heat-Induced Epitope Retrieval) με τη χρήση του EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH, σε αραιώση 1:50, το οποίο είναι το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων με τη συγκεκριμένη μέθοδο και αφορά σε διάλυμα Tris/EDTA με pH 9. Οι τομές μεταφέρθηκαν στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα αποκάλυψης αντιγόνων PT Link της Dako και αφού έγινε προθέρμανση του EnVision™

FLEX Target Retrieval Solution στους 65 °C, συνεχίστηκε η θέρμανση στους 97 °C για 30'. Η διαδικασία αποκάλυψης των αντιγονικών επιτόπων διήρκησε συνολικά μιάμιση ώρα, μέχρι να πέσει η θερμοκρασία ξανά στους 65 °C και να ολοκληρωθεί ο κύκλος της αποκάλυψης. Στο σημείο αυτό οι πλάκες με τις τομές μεταφέρθηκαν άμεσα σε ειδικό πλαστικό δοχείο (PT Link Rinse Station) με EnVision™ FLEX Wash Buffer αραιωμένο 1:20 και σε θερμοκρασία δωματίου. Αφέθηκαν να ξεπλυθούν και να κρυώσουν για 30'. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν τρεις φορές διαδοχικά σε διάλυμα PBS, για 5' κάθε φορά.

- Blocking

Προετοιμάζεται το διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί για το Blocking 10% NDS (Normal Donkey Serum) σε PBS. Περιχαρακώνονται οι τομές και καλύπτονται με 300μl για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στο επόμενο βήμα τινάζεται το διάλυμα πάνω από τις τομές, χωρίς να ξεπλυθούν.

- 1^ο αντίσωμα (anti-CD8)

Στη συνέχεια καλύπτονται οι τομές με 300μl από το πρώτο αντίσωμα, το anti-CD8 (mouse monoclonal) της DAKO, με αραιώση 1/100 με κατάλληλο Primary Antibody Diluent της εταιρείας Genemed Biotechnologies, Inc. Οι τομές τοποθετούνται στο ψυγείο (4°C) σε ειδικό πλαστικό δοχείο χρώσεων για 24 ώρες.

2^η ημέρα:

Οι τομές βγαίνουν από το ψυγείο και ξεπλένονται με διάλυμα PBS τρεις φορές, για 10' η κάθε φορά.

Προετοιμάζεται το δευτεροταγές/φθορίζον αντίσωμα, το οποίο επιλέχθηκε να είναι anti-mouse, λόγω του ότι το πρώτο αντίσωμα anti-CD8 ήταν mouse. Επιλέχθηκε πράσινο donkey anti-mouse με αραιώση 1/300 με 2% NDS σε PBS. Καλύπτονται οι τομές με 300 μl και αφέθηκαν να επωαστούν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό περιβάλλον. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS από 10' η κάθε φορά.

- 2^ο αντίσωμα (anti-Fas)

Προετοιμάζεται το διάλυμα με το anti-Fas, το οποίο είναι της εταιρείας Abcam (goat polyclonal) και χρησιμοποιήθηκε με αραιώση 1/133 με 4% NDS σε PBS. Από αυτό το

διάλυμα με 300μl καλύφθηκε κάθε τομή. Στη συνέχεια αφέθηκαν στο ψυγείο (4°C) στο ειδικό πλαστικό δοχείο για 48 ώρες.

3^η ημέρα:

Ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS για 10' η κάθε φορά σε σκοτεινές συνθήκες και προετοιμάστηκε το δεύτερο φθορίζον αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε έναντι του anti-Fas (anti-goat, λόγω του ότι το FasAb ήταν goat) και επιλέχθηκε διαφορετικό χρώμα του πράσινου που ήδη χρησιμοποιήθηκε για το πρώτο αντίσωμα (anti-CD8). Στην προκειμένη περίπτωση επιλέχθηκε κόκκινο donkey anti-goat με αραιώση 1/300 με 2% NDS σε PBS και με αυτό το διάλυμα καλύπτεται με 300μl κάθε τομή. Οι τομές αφέθηκαν στο ειδικό σκοτεινό πλαστικό δοχείο χρώσεων για επώαση 2 ώρες. Στη συνέχεια, οι τομές ξεπλύθηκαν με PBS τρεις φορές διαδοχικά, για 10' η κάθε φορά σε σκοτεινές συνθήκες. Τέλος, οι τομές καλύφθηκαν με γλυκερόλη σε PBS.

- Αποτέλεσμα διπλού ανοσοφθορισμού:

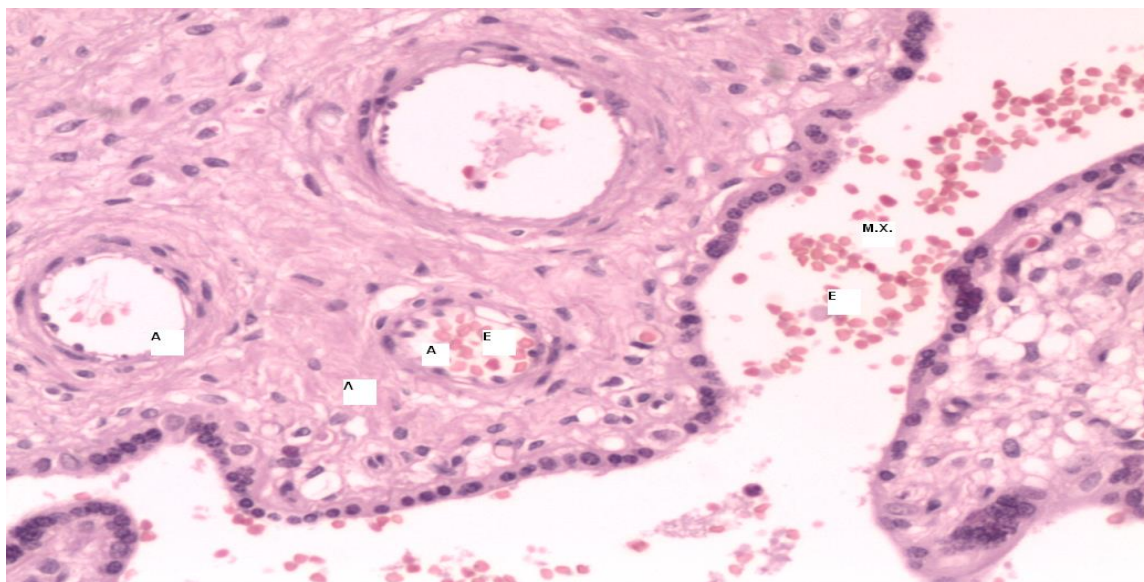
Το αντίσωμα anti-CD8 σημάνθηκε με πράσινο χρώμα, ενώ το αντίσωμα anti-Fas σημάνθηκε με κόκκινο.

ΚΕΦ. 8^ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8.1 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΧΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗΣ-ΗΩΣΙΝΗΣ

Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 5.2, όλα τα δείγματα χρώστηκαν με τη βασική ιστολογική χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης, προκειμένου να παρατηρηθούν μικροσκοπικά οι ιστοί. Η χρώση αιματοξυλίνης έχει πυρηνικό εντοπισμό, ενώ η ηωσίνη παράγει κυτταροπλασματική χρώση. Τα βασεόφιλα στοιχεία των κυττάρων (πυρήνες, γλυκοζαμινογλυκάνες) σημαίνονται με μπλε έως μωβ χρώμα από την αιματοξυλίνη, ενώ τα οξύφιλα κυτταροπλασματικά συστατικά σημαίνονται ρόδινα από την ηωσίνη.

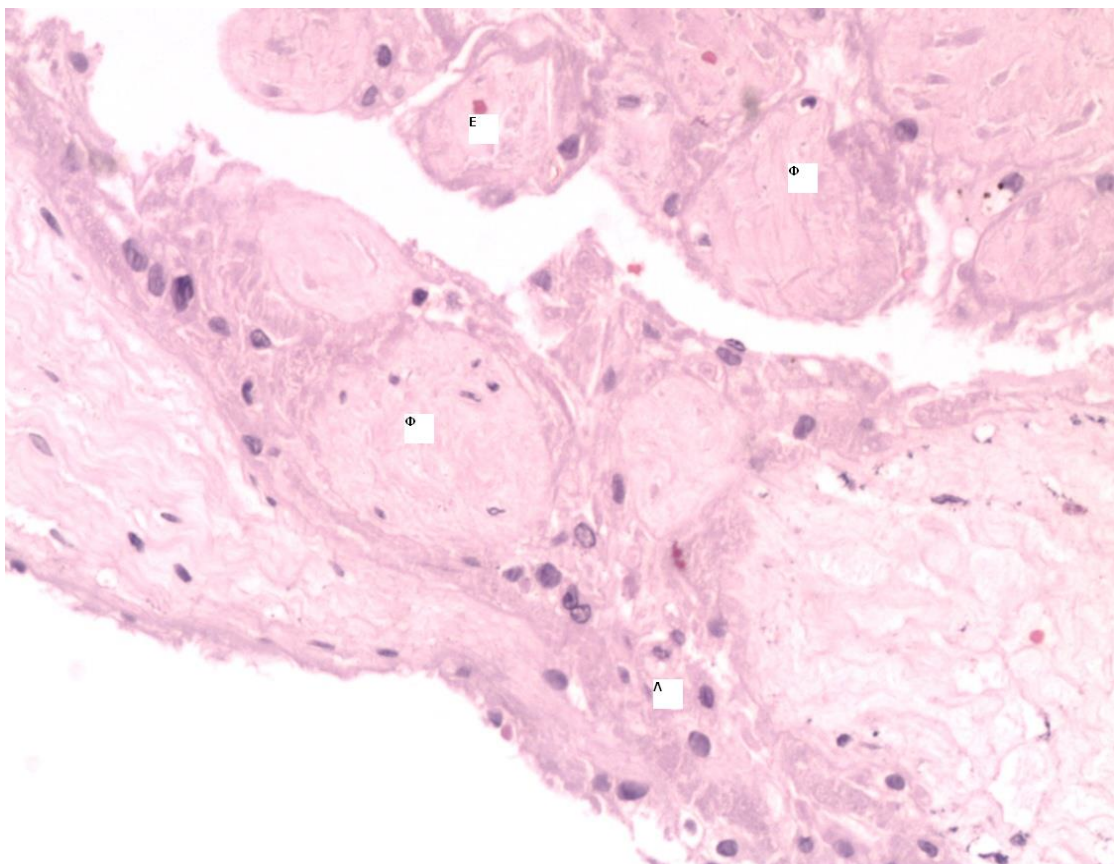
Κατά τη μικροσκόπηση των δειγμάτων αναγνωρίστηκαν τα απαιτούμενα ιστολογικά μέρη του πλακούντα για την πραγματοποίηση αυτής της διατριβής (φθαρτός, χοριακές λάχνες). Επίσης αναγνωρίστηκαν δομικά στοιχεία του πλακούντα (χοριονικό πέταλο, βασικό πέταλο, αγγεία, μεσολάχιος χώρος, κύτταρα τροφοβλάστης).



Εικόνα 11: Δείγμα LVL 39 (40X). Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης. Φυσιολογική απεικόνιση λάχνης (A) και μεσολάχιου χώρου (M.X.) στον τελειόμηνο πλακούντα. Ο μεσολάχιος χώρος περιέχει αίμα από τη μητρική κυκλοφορία. Το εσωτερικό της λάχνης καταλαμβάνεται από αγγεία (A). Διάσπαρτα παντού εμφανίζονται ερυθρά αιμοσφαίρια (E) με ρόδινο χρώμα

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα δείγματα έφεραν μεγάλα κομμάτια από αιματοπήγματα. Για το λόγο αυτό, τα λεμφοκύτταρα περίξ των αιματοπηγμάτων, στο τοίχωμα αγγείων και εκείνα εντός των αγγείων αγνοήθηκαν κατά την καταμέτρηση για αποφυγή καταμέτρησης ψευδώς θετικών κυττάρων (κύτταρα αιματικής κυκλοφορίας).

Τέλος, κατά τη μικροσκόπηση παρατηρήθηκε ότι ο ιστός με αριθμό LVL 49 δεν πληρούσε τις προϋποθέσεις του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου, γιατί δεν τηρούσε σωστή αναλογία φθαρτού/λαχνών, επομένως απορρίφθηκε από περαιτέρω επεξεργασία.



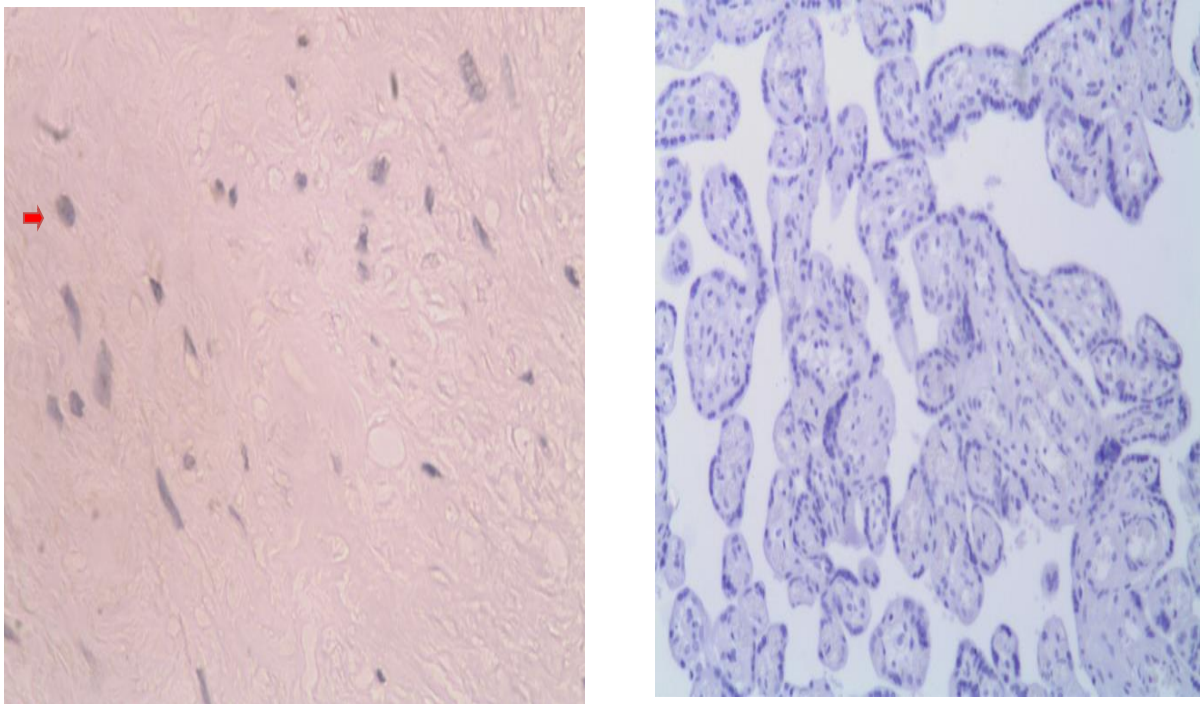
Εικόνα 12: Δείγμα HVL 82 (X40). Χρώση Αιματοζυλίνης-Ηωσίνης. Φυσιολογική απεικόνιση τμήματος φθαρτού (Φ) στον τελειόμηνο πλακούντα. Με το χαρακτηριστικό μπλε/μωβ χρώμα απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων (Λ=λεμφοκύτταρα, Ε=ερυθρά αιμοσφαίρια).

8.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

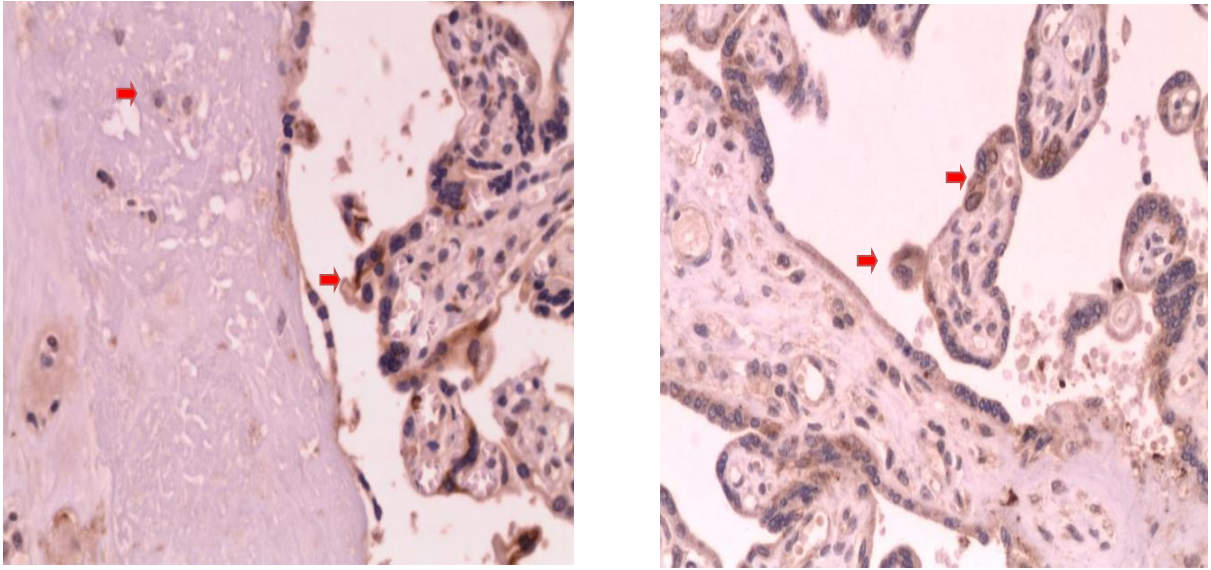
8.2.1 Ανοσοεντοπισμός HBsAg και HBcAg

Όπως προαναφέρθηκε στα κεφάλαια 6.4 και 6.5, η παρουσία του αντιγόνου επιφανείας HBsAg και του πυρηνικού αντιγόνου HBcAg ελέγχθησαν με ανοσοϊστοχημεία.

Κατά τη μικροσκόπηση ανεδείχθησαν θετικά όλα τα πλακίδια που εξετάστηκαν για το HBcAg, με την χρώση να βάφει κυρίως κυτταροπλασματικά, αλλά και στικτά στον πυρήνα σε ορισμένα δείγματα (βλ. Παράρτημα: Πίνακας II), ενώ αντιθέτως σχεδόν όλα τα πλακίδια που εξετάστηκαν για το HBsAg ήταν αρνητικά, με εξαίρεση το δείγμα με αριθμό HVL 59, στο οποίο ανιχνεύθηκε ένα θετικό κύτταρο ανά 10 οπτικά πεδία (1/10 High Power Fields) με φακό 40X (βλ. Παράρτημα: Πίνακας III).



Εικόνα 13: Ανοσοϊστοχημική χρώση HBsAg. Αριστερά αναγνωρίζεται τμήμα του φθαρτού από το δείγμα HVL 59 (20X). Με το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα αναγνωρίζονται τα ανοσοθετικά κύτταρα. Δεξιά αναγνωρίζεται τμήμα λαχνών του ιστού LVL 42 (20X), το οποίο είναι αρνητικό.



Εικόνα 14: Ανοσοϊστοχημική χρώση HBcAg. Αριστερά αναγνωρίζεται τμήμα του φθαρτού και λαχνών από το δείγμα LVL 16 (20X), ενώ δεξιά τμήμα των λαχνών του ιστού HVL 73A (20X). Με το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα αναγνωρίζονται τα ανοσοθετικά κύτταρα.

8.2.2 Ανοσοεντοπισμός CD3, CD4 και CD8

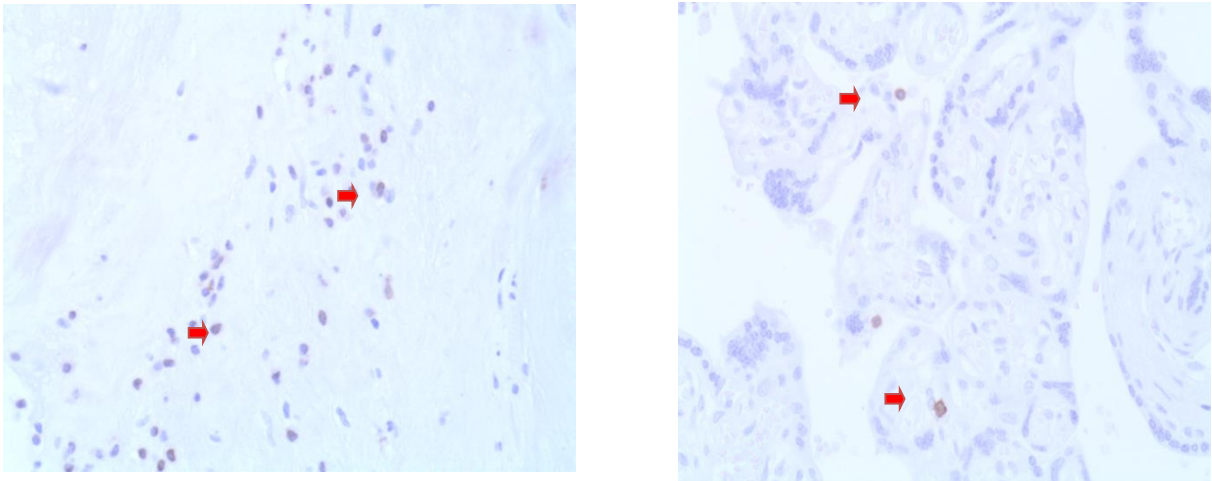
Τα δεδομένα των μετρήσεων διαχωρισμένα ανά ομάδα και ανά αντίσωμα αναλύθηκαν με παραμετρικό test ANOVA. Μετά την απομάκρυνση των ακραίων τιμών (outliers), τα δεδομένα ακολούθησαν κανονική κατανομή. Επίπεδο σημαντικότητας (p value) <0,05 ήταν απαιτούμενο για τη στατιστική σημαντικότητα της παρούσας μελέτης. Στα ιστογράμματα που δημιουργήθηκαν αναδεικνύεται και οπτικά η σύγκριση των ανοσοθετικών κυττάρων μεταξύ LVL και HVL ομάδας στον φθαρτό και τις χοριακές λάχνες για κάθε αντίσωμα. Χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των ανοσοθετικών κυττάρων \pm το τυπικό σφάλμα ανά ομάδα και ανά ιστολογικό πεδίο.

- **Anti-CD3**

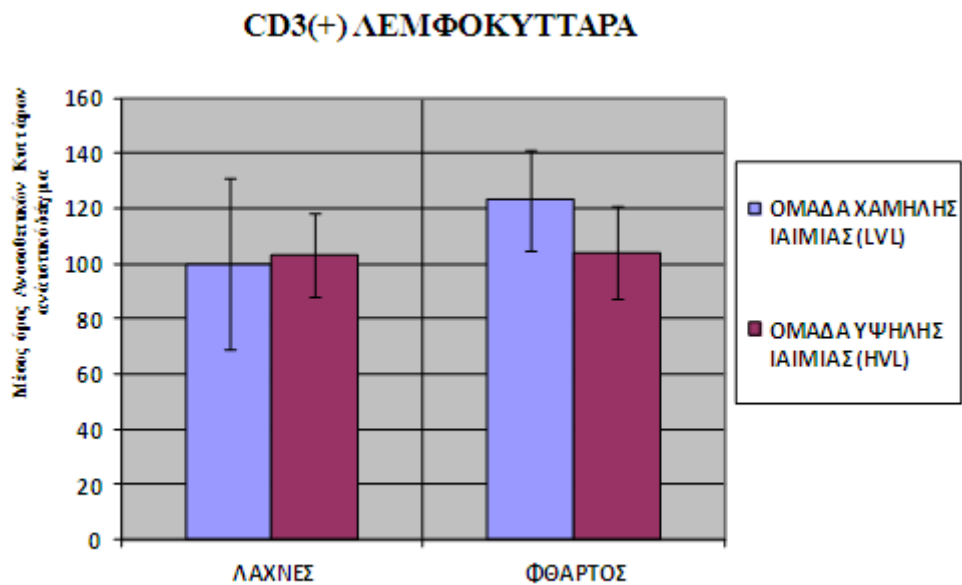
Μετά από επεξεργασία των δεδομένων της ομάδας LVL (χαμηλού ικού φορτίου), ο μέσος όρος των CD3(+) λεμφοκυττάρων στις λάχνες ήταν **100 \pm 32**, ενώ στον φθαρτό ο μέσος όρος των CD3(+) λεμφοκυττάρων ήταν **123 \pm 18**.

Μετά από επεξεργασία των δεδομένων της ομάδας HVL (υψηλού ιικού φορτίου), ο μέσος όρος των CD3(+) λεμφοκυττάρων στις λάχνες ήταν 103 ± 15 , ενώ στον φθαρτό ο μέσος όρος των CD3(+) λεμφοκυττάρων ήταν 104 ± 17 .

Με τη χρήση ANOVA για παραμετρικά δεδομένα δεν αναδείχθηκε διαφορά με στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα στις δύο ομάδες (p value >0,05).



Εικόνα 15: Ανοσοϊστοχημική χρώση anti-CD3. Αριστερά αναγνωρίζεται τμήμα του φθαρτού από το δείγμα LVL 42 (40X), ενώ δεξιά τμήμα των λαχνών του ιστού HVL 69 (40X). Με το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα αναγνωρίζονται τα ανοσοθετικά κύτταρα

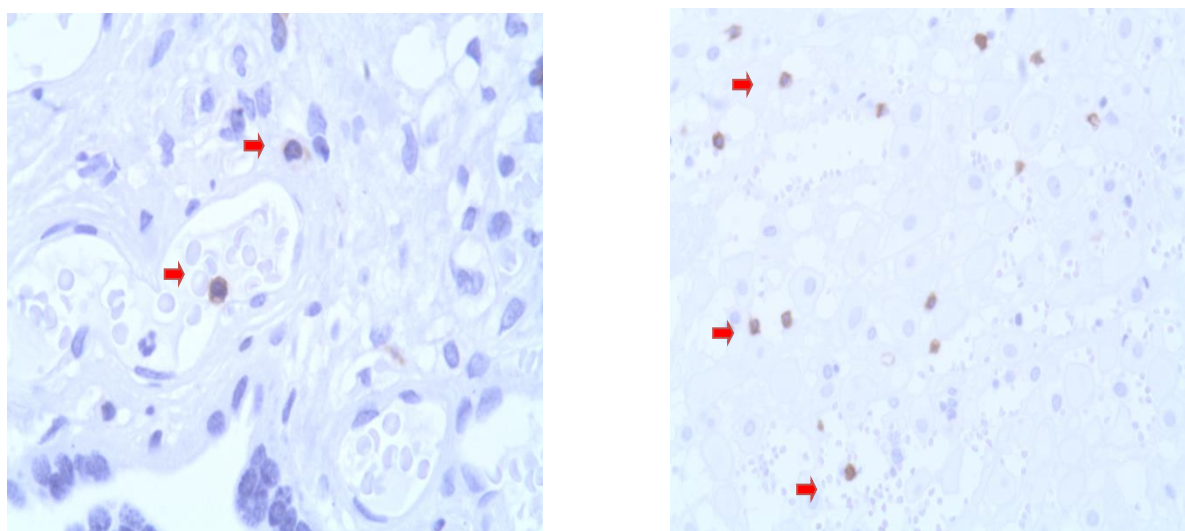


Σχήμα 8.1: Μέσος όρος CD3 ανοσοθετικών κυττάρων ανά περιοχή και ανά ομάδα

- **Anti-CD4**

Μετά από επεξεργασία των δεδομένων της ομάδας LVL (χαμηλού ικού φορτίου), ο μέσος όρος των CD4(+) λεμφοκυττάρων στις λάχνες ήταν 35 ± 3 , ενώ στον φθαρτό ο μέσος όρος των CD4(+) λεμφοκυττάρων ήταν 48 ± 7 .

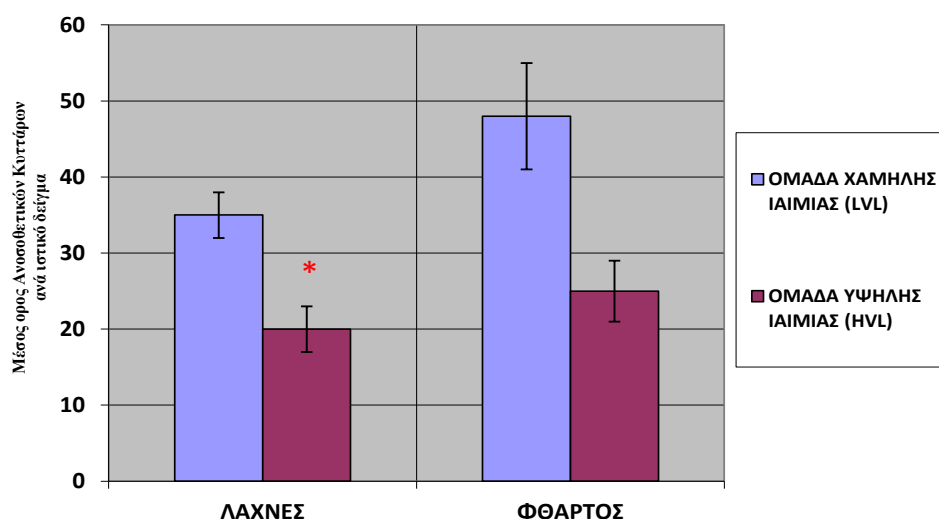
Μετά από επεξεργασία των δεδομένων της ομάδας HVL (υψηλού ικού φορτίου), ο μέσος όρος των CD4(+) λεμφοκυττάρων στις λάχνες ήταν 20 ± 3 , ενώ στον φθαρτό ο μέσος όρος των CD4(+) λεμφοκυττάρων ήταν 25 ± 4 .



***Εικόνα 16:** Ανοσοϊστοχημική χρώση anti-CD4. Αριστερά αναγνωρίζεται τμήμα των λαχνών του ιστού LVL 16 (40X), ενώ δεξιά τμήμα του φθαρτού του ιστού HVL 82 (20X). Με το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα αναγνωρίζονται τα ανοσοθετικά κύτταρα*

Με τη χρήση ANOVA για παραμετρικά δεδομένα αναδεικνύεται διαφορά με στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα στις δύο ομάδες (p value $<0,05$) στις λάχνες, με την ομάδα χαμηλής ιαιμίας LVL να έχει στατιστικά περισσότερα CD4(+) λεμφοκύτταρα από ό,τι η ομάδα υψηλής ιαιμίας HVL ($F_{1,51}=9,387$, $p=0,004$). Στον φθαρτό παρατηρήθηκε μια ισχυρή στατιστική τάση με την ομάδα LVL να εμφανίζει περισσότερα CD4(+) κύτταρα από την ομάδα HVL, αν και η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($F_{1,51}=3,466$, $p=0,069$).

CD4(+) ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ



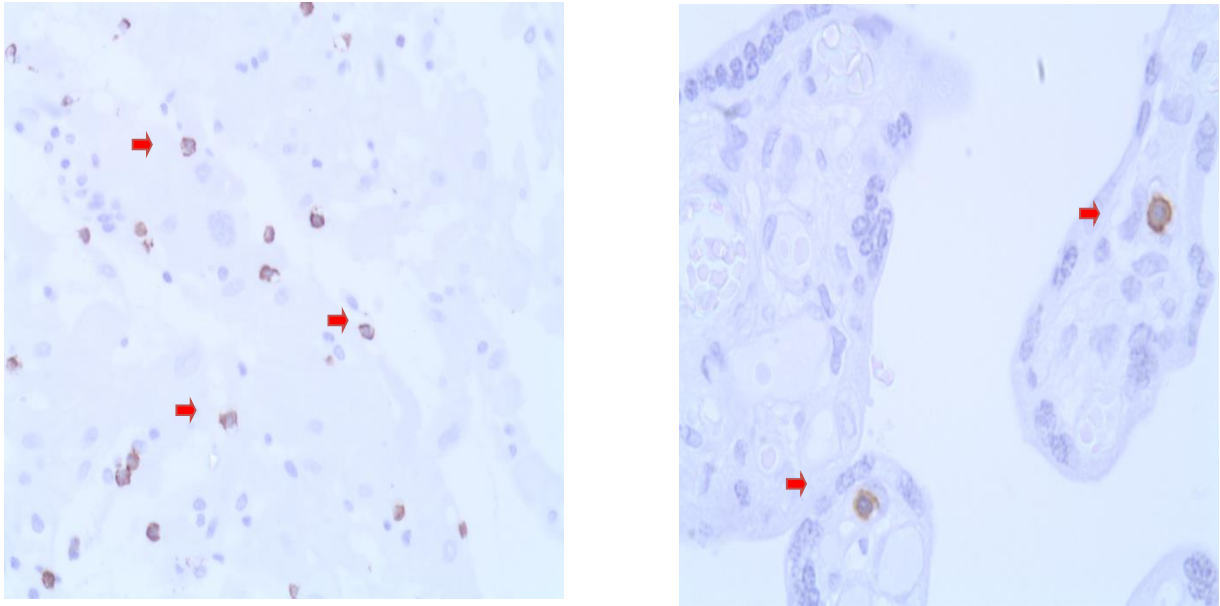
Σχήμα 8.2: Μέσος όρος CD4 ανοσοθετικών κυττάρων ανά περιοχή και ανά ομάδα. * $p < 0.05$.

- **Anti-CD8**

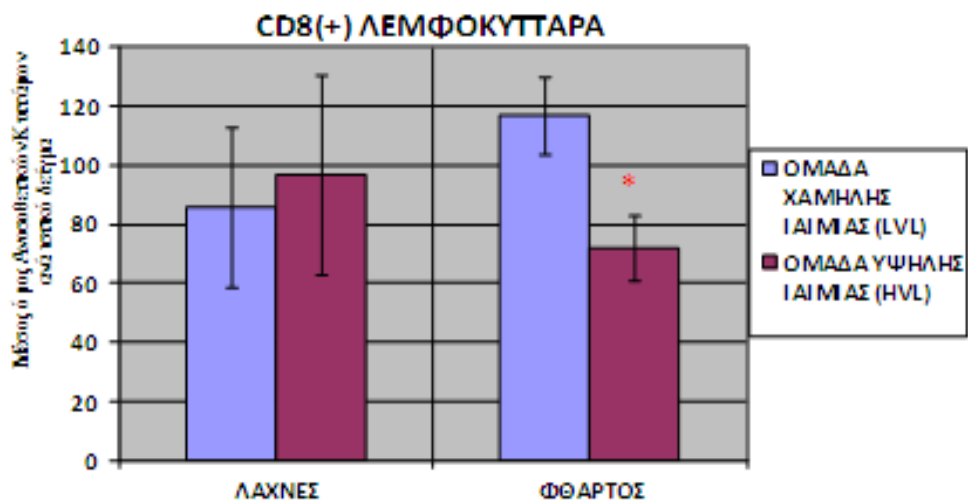
Μετά από επεξεργασία των δεδομένων της ομάδας LVL (χαμηλού ικού φορτίου), ο μέσος όρος των CD8(+) λεμφοκυττάρων στις λάχνες ήταν 86 ± 29 , ενώ στον φθαρτό ο μέσος όρος των CD8(+) λεμφοκυττάρων ήταν 117 ± 12 .

Μετά από επεξεργασία των δεδομένων της ομάδας HVL (υψηλού ικού φορτίου), ο μέσος όρος των CD8(+) λεμφοκυττάρων στις λάχνες ήταν 97 ± 33 , ενώ στον φθαρτό ο μέσος όρος των CD8(+) λεμφοκυττάρων ήταν 72 ± 10 .

Με τη χρήση ANOVA για παραμετρικά δεδομένα, δεν αναδείχθηκε διαφορά με στατιστική σημαντικότητα στις λάχνες ανάμεσα στις δύο ομάδες (p value $> 0,05$). Ωστόσο, αναδεικνύεται διαφορά με στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα στις δύο ομάδες στον φθαρτό, με την ομάδα χαμηλής ιαιμίας LVL να έχει στατιστικά περισσότερα CD8(+) λεμφοκύτταρα από ό,τι η ομάδα υψηλής ιαιμίας HVL ($p=0,044$).



Εικόνα 17: Ανοσοϊστοχημική χρώση anti-CD8. Αριστερά αναγνωρίζεται τμήμα φθαρτού του ιστού HVL 69 (20X), ενώ δεξιά τμήμα των λαχνών του ιστού LVL 39 (40X). Με το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα αναγνωρίζονται τα ανοσοθετικά κύτταρα



Σχήμα 8.3: Μέσος όρος CD8 ανοσοθετικών κυττάρων ανά περιοχή και ανά ομάδα. * $p < 0.05$.

Παρατηρώντας τα Σχήματα 8.2 και 8.3, είναι εμφανές πως τα CD8(+) ανοσοκύτταρα υπερτερούν των CD4(+), τόσο στην ομάδα υψηλού ικού φορτίου, όσο και στην ομάδα χαμηλού ικού φορτίου. Αριθμητικά δε, φαίνεται πως τα CD8(+) είναι περίπου διπλάσια των CD4(+) ανοσοκυττάρων.

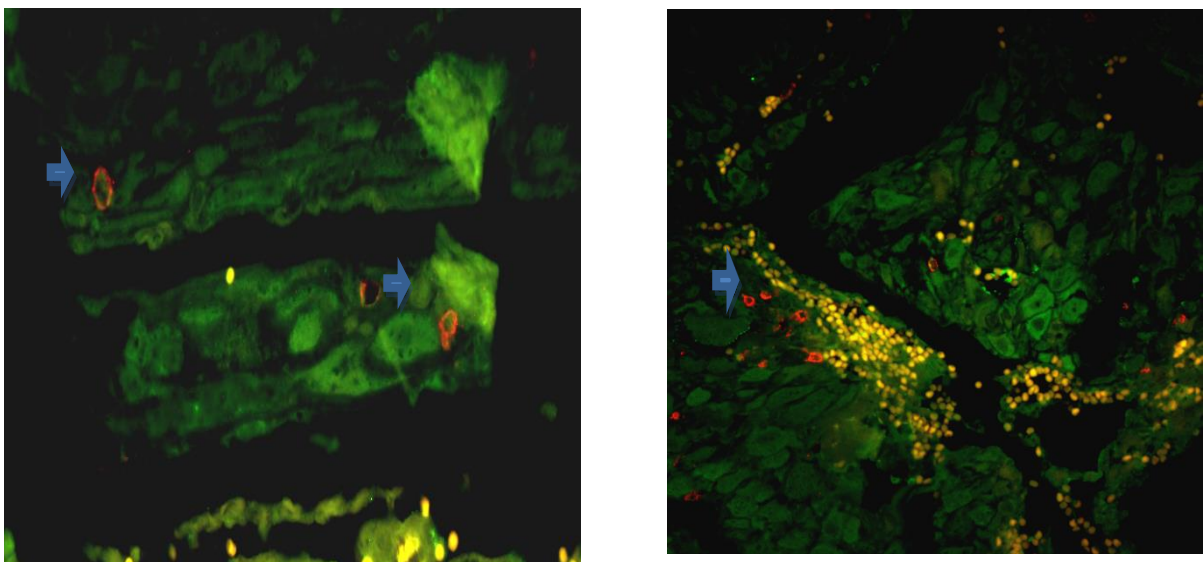
8.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΙΠΛΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Οι μετρήσεις των διπλά ανοσοθετικών κυττάρων έγιναν μόνο στον φθαρτό, όπου εμφανίστηκε η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (HVL και LVL), με βάση τα δεδομένα που αναλύθηκαν μετά την ανοσοϊστοχημεία (Κεφ. 8.2). Τα δεδομένα των μετρήσεων διαχωρισμένα ανά ομάδα, αναλύθηκαν με παραμετρικό test ANOVA και ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των ανοσοθετικών κυττάρων \pm το τυπικό σφάλμα ανά ομάδα και ανά ιστολογικό πεδίο. Επίπεδο σημαντικότητας (p value) $<0,05$ ήταν απαιτούμενο για τη στατιστική σημαντικότητα της παρούσας μελέτης.

- **Anti-CD8 & anti-CD28**

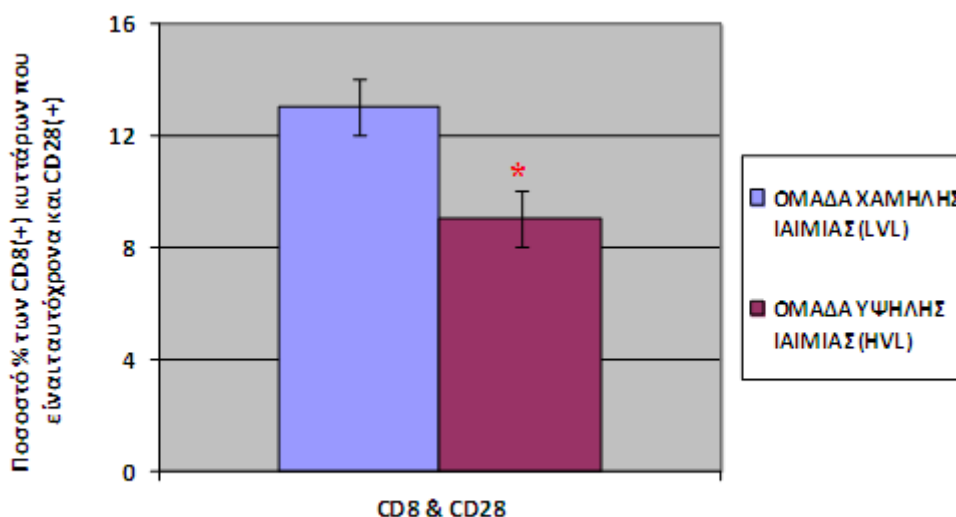
Μετά από επεξεργασία των δεδομένων της ομάδας LVL (χαμηλού ικού φορτίου), το ποσοστό των CD8 θετικών κυττάρων που ήταν ταυτόχρονα και CD28 θετικά, ήταν κατά μέσο όρο **13% \pm 1**.

Μετά από επεξεργασία των δεδομένων της ομάδας HVL (υψηλού ικού φορτίου), το ποσοστό των CD8 θετικών κυττάρων που ήταν ταυτόχρονα και CD28 θετικά, ήταν κατά μέσο όρο **9% \pm 1**.



Εικόνα 18: Στις δύο εικόνες αναγνωρίζονται τα διπλά θετικά CD8/CD28 κύτταρα (40X). Αριστερά η λήψη έγινε από τον ιστό LVL 16 και δεξιά από τον ιστό HVL 82. Σημειώνεται ότι το anti-CD8 είναι χρώματος κόκκινου, ενώ πράσινο είναι το anti-CD28

Με τη χρήση ANOVA για παραμετρικά δεδομένα αναδείχθηκε διαφορά με στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα στις δύο ομάδες ($F_{1,9}=7.430$, $p=0,026$). Η διαφορά αυτή είναι και οπτικά εμφανής στο παρακάτω ιστόγραμμα, όπου αναδεικνύεται ότι η ομάδα χαμηλής ιαιμίας (LVL) εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό CD8 και CD28 θετικών λεμφοκυττάρων από ό,τι η ομάδα υψηλής ιαιμίας (HVL).



Σχήμα 8.4: Ποσοστό των CD8(+) ανοσοκυττάρων που είναι ταυτόχρονα και CD28(+). * $p<0.05$.

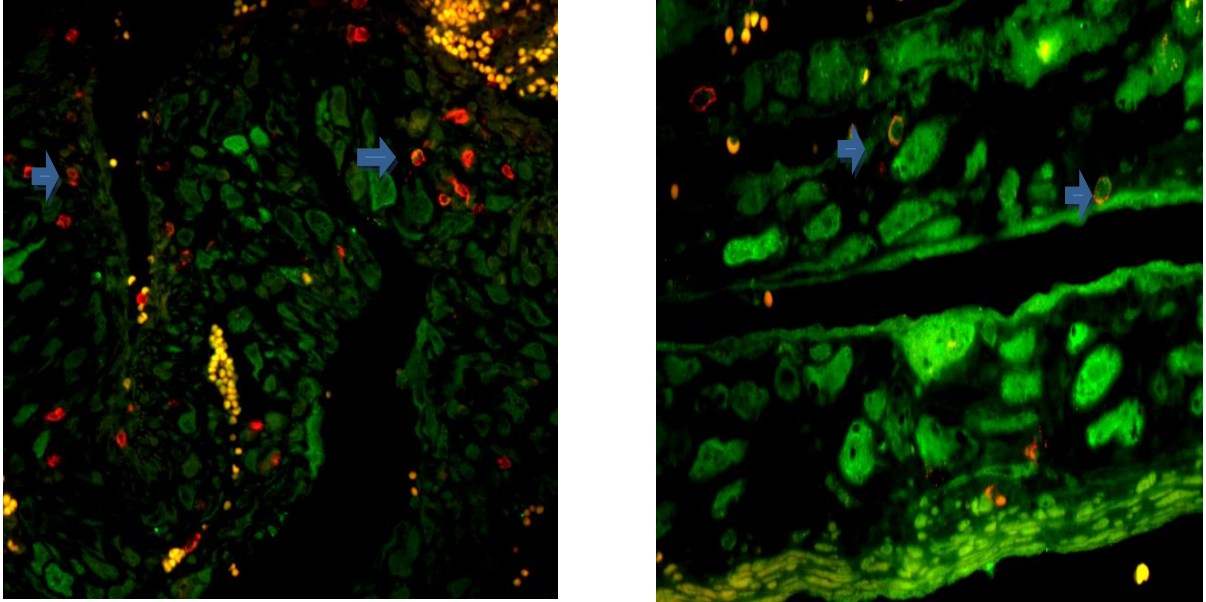
- **Anti-CD8 & anti-Fas Ligand**

Μετά από επεξεργασία των δεδομένων της ομάδας LVL (χαμηλού ικού φορτίου), το ποσοστό των CD8 θετικών κυττάρων που ήταν ταυτόχρονα και Fas Ligand θετικά, ήταν κατά μέσο όρο **51%±1**.

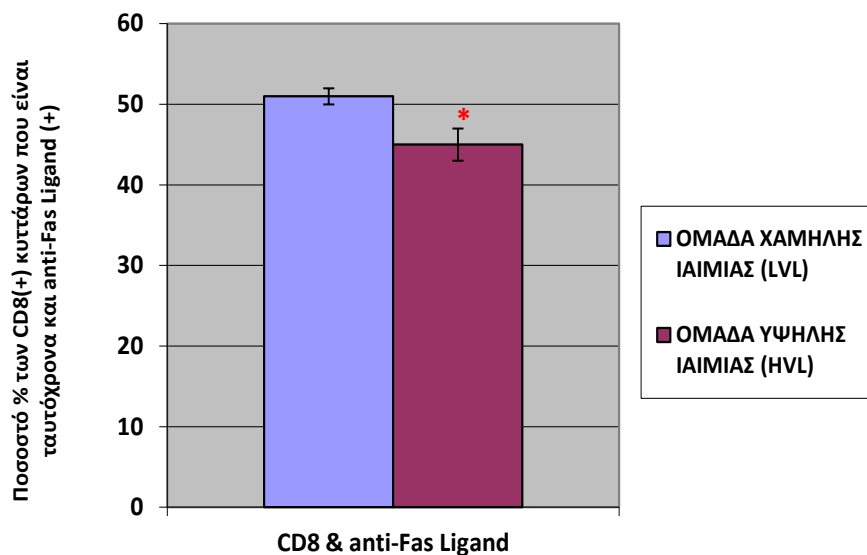
Μετά από επεξεργασία των δεδομένων της ομάδας HVL (υψηλού ικού φορτίου), το ποσοστό των CD8 θετικών κυττάρων που ήταν ταυτόχρονα και anti-Fas Ligand θετικά, ήταν κατά μέσο όρο **45%±1**.

Με τη χρήση ANOVA για παραμετρικά δεδομένα αναδείχθηκε διαφορά με στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα στις δύο ομάδες ($F_{1,9}=14,108$, $p=0,006$). Η διαφορά αυτή είναι και οπτικά εμφανής στο παρακάτω ιστόγραμμα, όπου αναδεικνύεται ότι η ομάδα χαμηλής

ιαιμίας (LVL) εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό CD8 και anti-Fas Ligand θετικών λεμφοκυττάρων από ό,τι η ομάδα υψηλής ιαιμίας (HVL).



Εικόνα 19: Στις δύο εικόνες αναγνωρίζονται τα διπλά θετικά CD8/anti-Fas Ligand κύτταρα. Αριστερά η λήψη έγινε από τον ιστό LVL 24 (20X) και δεξιά από τον ιστό HVL 61(40X). Η έκφραση Fas Ligand από τα κύτταρα της τροφοβλάστης είναι εμφανής και στις δύο εικόνες. Σημειώνεται ότι το anti-CD8 είναι χρώματος κόκκινου, ενώ πράσινο είναι το anti-Fas Ligand



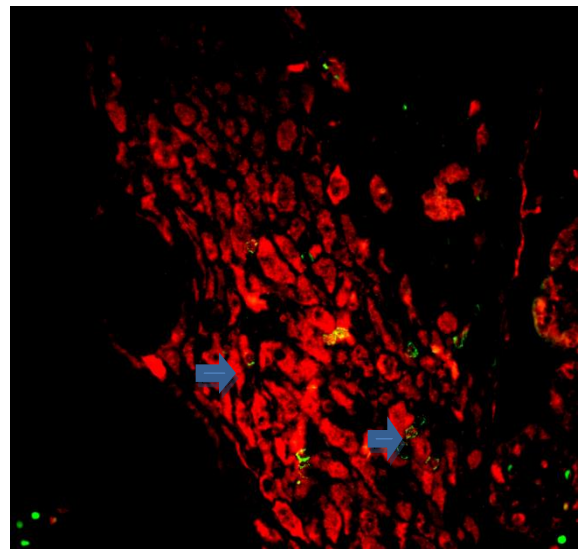
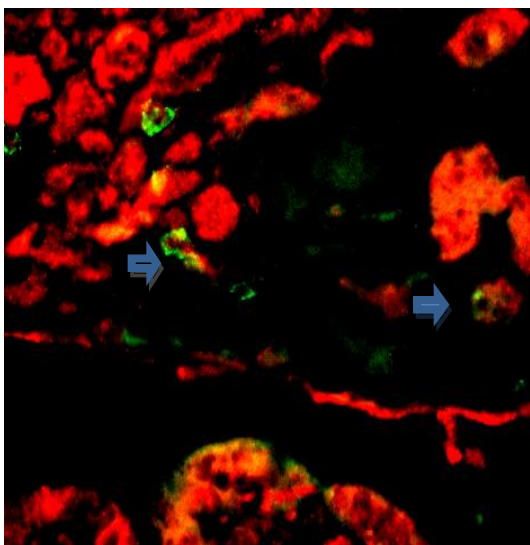
Σχήμα 8.5: Ποσοστό των CD8(+) ανοσοκυττάρων που είναι ταυτόχρονα και anti-Fas Ligand (+). * $p < 0.05$.

- **Anti-CD8 & anti-Fas**

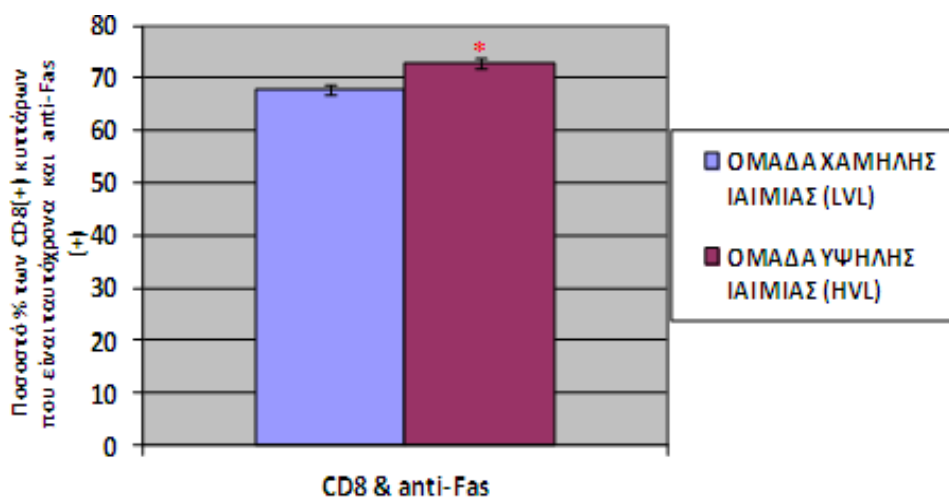
Μετά από επεξεργασία των δεδομένων της ομάδας LVL (χαμηλού ιικού φορτίου), το ποσοστό των CD8 θετικών κυττάρων που ήταν ταυτόχρονα και anti-Fas θετικά, ήταν κατά μέσο όρο **68%±1**.

Μετά από επεξεργασία των δεδομένων της ομάδας HVL (υψηλού ιικού φορτίου), το ποσοστό των CD8 θετικών κυττάρων που ήταν ταυτόχρονα και anti-Fas θετικά, ήταν κατά μέσο όρο **73%±2**.

Με τη χρήση ANOVA για παραμετρικά δεδομένα αναδείχθηκε διαφορά με στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα στις δύο ομάδες ($F_{1,9}=6,398$, $p=0,035$). Η διαφορά αυτή είναι και οπτικά εμφανής στο παρακάτω ιστόγραμμα, όπου αναδεικνύεται ότι η ομάδα υψηλής ιαιμίας (HVL) εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό CD8 και anti-Fas θετικών λεμφοκυττάρων από ό,τι η ομάδα χαμηλής ιαιμίας (LVL).



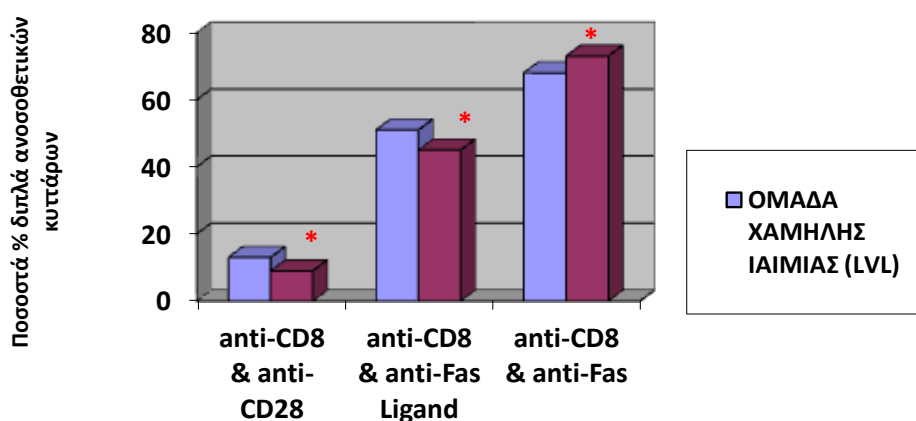
Εικόνα 20: Στις δύο εικόνες αναγνωρίζονται τα διπλά θετικά CD8/anti-Fas κύτταρα. Αριστερά η λήψη είναι από τον ιστό LVL 16(40X) και δεξιά από τον ιστό HVL 73A (20X). Η έκφραση Fas από τα κύτταρα της τροφοβλάστης είναι εμφανής στον φθαρτό. Σημειώνεται ότι το anti-CD8 είναι χρώματος πράσινου, ενώ με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται το anti-Fas



Σχήμα 8.6: Ποσοστό των CD8(+) ανοσοκυττάρων που είναι ταυτόχρονα και anti-Fas(+). * $p < 0.05$.

Στο τελικό ιστόγραμμα (σχήμα 8.7) που δημιουργήθηκε με την επεξεργασία των δεδομένων και των τριών διπλών ανοσοφθορισμών, αναδεικνύεται και οπτικά η σχέση των διπλά φθορίζοντων κυττάρων μεταξύ LVL και HVL ομάδας για κάθε διπλή ανοσοεντόπιση. Χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των ποσοστών των ανοσοθετικών κυττάρων.

Ποσοστά διπλά ανοσοθετικών κυττάρων



Σχήμα 8.7: Ποσοστά των CD8(+) κυττάρων που είναι ταυτόχρονα CD28(+) ή anti-Fas Ligand(+) ή anti-Fas(+). * $p < 0.05$.

Όπως αναδεικνύεται και οπτικά στο Σχήμα 8.7, υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών των T-λεμφοκυττάρων που εμφανίζονται διπλά θετικά στο αντίσωμα anti-CD8 και στο αντίσωμα anti-CD28 σε σχέση με τα ποσοστά των CD8(+) T-λεμφοκυττάρων που εμφανίζονται διπλά θετικά στα αντισώματα anti-CD8 και anti-Fas ή anti-CD8 και anti-Fas Ligand. Όπως αναφέρθηκε και στο Γενικό Μέρος, το CD28 είναι ένα μόριο που προάγει την επιβίωση των λεμφοκυττάρων. Αντιθέτως, τα μόρια Fas και Fas Ligand είναι επαγωγείς της απόπτωσης. Με γνώμονα αυτά τα δεδομένα, είναι προφανές ότι στον πλακούντα προάγεται σημαντικά η απόπτωση έναντι της επιβίωσης των CD8 (+) κυττάρων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

➤ **Μέρος Πρώτο**

Στην παρούσα διατριβή καταγράφεται και αναλύεται η σχετική αφθονία των υποπληθυσμών των T-λεμφοκυττάρων που ευρίσκονται σε έναν τελειόμηνο πλακούντα νοσούσας μητέρας με Ηπατίτιδα Β, καθώς και ο βαθμός ενεργοποίησης του αποπτωτικού μηχανισμού σε αυτά. Επιπλέον, συγκρίνονται τα επίπεδα και τα χαρακτηριστικά των T-λεμφοκυττάρων μεταξύ δύο ομάδων: της ομάδας των εγκύων με χαμηλό ιικό φορτίο HBV-DNA (LVL, Low Viral Load) και της ομάδας των εγκύων με υψηλό ιικό φορτίο HBV-DNA (HVL, High Viral Load). Βασική προϋπόθεση για τη συμμετοχή της μητέρας στο εν λόγω πείραμα ήταν η επιβεβαιωμένη ύπαρξη HBV-DNA στο αίμα του ομφάλιου λώρου, ενώ ταυτόχρονα το/τα νεογνό/-ά να γεννηθεί/-ούν απαλλαγμένα από τη νόσο.

Στην εργασία αυτή επιχειρείται η μελέτη της απόπτωσης που επάγεται από τους υπό εξέταση λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς του πλακούντα με στόχο την προστασία του εμβρύου. Κύρια υπόθεση της παρούσας διατριβής είναι πως τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα έχουν διττό ρόλο στην προφύλαξη του εμβρύου, κατά τη διάρκεια μιας κύησης όπου η μητέρα είναι φορέας της ηπατίτιδας Β. Σκοπός μας είναι να αποδείξουμε πως τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα προφυλάσσουν το κύημα, τόσο από διαπλακουντιακή μόλυνση με τον ιό HBV, όσο και από την δική τους κυτταροτοξικότητα, ενεργοποιώντας τον αποπτωτικό μηχανισμό. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η έκφραση συγκεκριμένων αντιγονικών επιτόπων, μορίων συμμετεχόντων στην αποπτωτική διαδικασία, για τον διαχωρισμό και την ομαδοποίηση των κυτταρικών πληθυσμών.

Για την διερεύνηση της αρχικής υπόθεσης χρησιμοποιήθηκαν 53 δείγματα πλακουντιακού ιστού και εφαρμόστηκαν τρεις μέθοδοι για τον έλεγχο και την ανάλυσή τους: **ιστοχημική χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης**, **ανοσοϊστοχημεία** (HBsAg HBcAg, anti-CD3, anti-CD4 και anti-CD8,) και **διπλός ανοσοφθορισμός** (CD8 & CD28, CD8 & anti-Fas, CD8 & anti-Fas Ligand) με τη βοήθεια ειδικών μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων, με στόχο την κατηγοριοποίηση των υποπληθυσμών των T-λεμφοκυττάρων που ευρίσκονται στην περιοχή του φθαρτού και των χοριακών λαχνών, καθώς και τη διερεύνηση της ύπαρξης αποπτωτικής διαδικασίας. Ο λόγος που αποφασίστηκε ο διαχωρισμός των πεδίων σε φθαρτό και χοριακές λάχνες είναι για να μελετηθεί το κατά

πόσο η έκφραση και η συμπεριφορά των λεμφοκυττάρων είναι ίδια ή διαφορετική στη μητρική (φθαρτός) και στην εμβρυϊκή επιφάνεια (λάχνες).

➤ **Μέρος Δεύτερο**

Όπως έχει αναφερθεί στο Γενικό Μέρος, ο ιός της ηπατίτιδας Β αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία, καθώς έχει μεγάλη θνησιμότητα και νοσηρότητα. Μπορεί να εμφανιστεί ως οξεία ή χρόνια λοίμωξη, με την χρόνια να αποτελεί την κυριότερη αιτία κίρρωσης του ήπατος, ενώ σχετίζεται σημαντικά με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε έδαφος κίρρωσης. Λόγω της χρόνιας φορείας, οι νοσούντες αποτελούν μόνιμη δεξαμενή δυνητικής μετάδοσης του ιού, ενώ και ο κίνδυνος της περιγεννητικής μετάδοσης είναι ιδιαίτερα αυξημένος. Στατιστικά αποδεικνύεται ότι τα νεογνά που μολύνονται εμφανίζουν κατά 90% μετάπτωση της νόσου σε χρόνια νόσηση. Βιβλιογραφικά αναφέρεται η άμεση σύνδεση του ιικού φορτίου της μητέρας με την αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης νεογνικής λοίμωξης.

Περιγεννητικά υπάρχουν τρεις πιθανοί τρόποι μετάδοσης του ιού: διαπλακουντιακά (αιματογενής ή κυτταρική μεταφορά), κατά τη διάρκεια του τοκετού και κατά τη διάρκεια του θηλασμού. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η διαπλακουντιακή μετάδοση, δηλαδή κάθετα από τη μητέρα στο κύημα. Στατιστικά φαίνεται πως μόλις 5% των περιπτώσεων μόλυνσης οφείλεται σε διαπλακουντιακή μετάδοση, ενώ κατά τον τοκετό η κάθετη μετάδοση αγγίζει το 95% [47]. Αυτή η μεγάλη στατιστική διαφορά μας οδηγεί να παραδεχτούμε ότι ο πλακούντας προστατεύει σε μεγάλο βαθμό το κύημα από τη μόλυνση με τον ιό, με μηχανισμό που δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός και ενώ ανοσολογικά είναι ευρέως γνωστή η απόκριση του οργανισμού στην ιική εισβολή, τα μυστικά της πλακουντιακής άμυνας παραμένουν καλά κρυμμένα.

Στο Γενικό Μέρος της παρούσας διατριβής σημειώθηκε ότι ο πλακούντας συγκαταλέγεται βιβλιογραφικά στους ανοσολογικά προνομιούχους ιστούς. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης συμβαίνει ένα ανοσολογικό παράδοξο: ενώ το έμβρυο φέρει κατά το ήμισυ ξένο/πατρικό DNA, καταφέρνει να επιβιώσει από το εχθρικό ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας. Η επιβίωση του κατά το ήμισυ αλλογενικού εμβρύου έναντι του ανοσοποιητικού συστήματος της μητέρας είναι η απόδειξη της ιδιαιτερότητας του πλακουντιακού ιστού και έχει απασχολήσει αρκετά την επιστημονική κοινότητα.

Κατά καιρούς (με απαρχή τη δεκαετία του '90) έχουν προταθεί και συζητηθεί αρκετοί μηχανισμοί, στους οποίους οι επιστήμονες αποδίδουν την ανοσολογική ιδιαιτερότητα του πλακούντα: ο ρόλος των μεμβρανών και ο μερικός διαχωρισμός του εμβρύου από τη μητέρα, τα μειωμένα επίπεδα του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (Simpson, 1996), η παραγωγή αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών από τον πλακούντα (Moulton, 1993 και Chaouat et al. 1995), η μειωμένη δράση της κυτταρικής απόκρισης με ταυτόχρονη ενδυνάμωση της χυμικής ανοσολογικής απόκρισης (Wegmann et al., 1993) και η ένταξη της μήτρας στους ανοσολογικά προνομιούχους ιστούς (Wilbanks και Streilein, 1992) [75].

Αργότερα, το 2006 δημοσιεύθηκε μια μελέτη (Tilburgs et al., 2006) αναφορικά με το ανοσολογικό προνόμιο του πλακούντα. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, εκφράζονται διαφορετικά HLA αντιγόνα (Human Leukocyte Antigens) από την τροφοβλάστη και διαφορετικά από το χόριο, ενώ και η παραγωγή συγκεκριμένων προσταγλανδινών διαφέρει μεταξύ των κυττάρων της τροφοβλάστης και του χορίου του πλακούντα. Αυτές οι δύο διαφορές μπορεί να οδηγούν σε διαφορές και στην διαφοροποίηση ή/και στην ωρίμανση συγκεκριμένων λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών στον πλακούντα [76].

Η ίδια ομάδα, το 2009, ανήρτησε δημοσίευση στο περιοδικό Human Immunology, η οποία ανέφερε ότι τα μητρικά λεμφοκύτταρα και η εμβρυϊκή τροφοβλάστη παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοχή του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK cells) του φθαρτού έχουν επιδείξει ρυθμιστική συμπεριφορά των εκφραζόμενων HLA κατά την «εισβολή» της εμβρυϊκής τροφοβλάστης στον φθαρτό. Επιπλέον αναφέρεται ότι τα λεμφοκύτταρα με φαινότυπο CD4(+)CD25FOXP3(+)Treg έχουν την τάση να συγκεντρώνονται στον φθαρτό και να καταστέλλουν την ανοσο-αντίδραση (ειδική και μη ειδική) ταυτόχρονα. Στην ίδια δημοσίευση μελετάται ενδελεχώς η συμμετοχή των CD8(+)CD28(-) κατασταλτικών T-λεμφοκυττάρων. Έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα αυτά ρυθμίζουν τη λειτουργία των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων εκφράζοντας ανασταλτικούς υποδοχείς και αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των T-CD4(+) κυττάρων. Σημειώνεται πως ο ίδιος κυτταρικός πληθυσμός έχει ανιχνευθεί σε ιστούς μολυσμένους από παθογόνα. Τέλος, αναφέρεται ότι κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κύησης υπάρχει σημαντικά υψηλότερο ποσοστό CD8(+)CD28(-) λεμφοκυττάρων στον φθαρτό από ό,τι στο περιφερικό αίμα της μητέρας [77].

Οι Tilburgs et al. δεν σταμάτησαν την έρευνά τους εκεί και το 2010, προσπαθώντας να κατανοήσουν την ανοσολογία του πλακούντα, προχώρησαν ένα βήμα παραπέρα μελετώντας επισταμένως τα CD8(+) T-κύτταρα. Η δράση των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων στα υγιή άτομα είναι ευρέως γνωστή. Η δράση τους όμως στον πλακούντα παρέμενε και παραμένει με ερωτηματικά. Έτσι, με τη βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων και χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής, ανοσοϊστοχημεία και qPCR, κατάφεραν να κατηγοριοποιήσουν τα CD8(+) κύτταρα του φθαρτού και να μελετήσουν την κυτταροτοξική τους δράση. Η ομάδα αυτή απέδειξε ότι σε τελειόμηνους φυσιολογικούς πλακούντες τα CD8(+) κύτταρα του φθαρτού ήταν πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα μνήμης, τα οποία παρουσίαζαν μειωμένη έκφραση κυτταροτοξικών πρωτεϊνών (Perforin και Granzyme B) σε σχέση με το περιφερικό αίμα της μητέρας. Η υπόθεση που γεννήθηκε ήταν μήπως τα CD8(+) T-κύτταρα χρησιμοποιούν ένα διαφορετικό κυτταροτοξικό μονοπάτι στον πλακούντα, ώστε να προστατευθεί το έμβρυο. Ταυτόχρονα, τα δεδομένα έδειξαν αυξημένη έκφραση του προσδέτη Fas Ligand [78].

Η συμμετοχή του μηχανισμού απόπτωσης Fas-Fas Ligand είχε ήδη αρχίσει να συζητιέται στους επιστημονικούς κύκλους από το 1997, όταν προτάθηκε από τους Uckan et al., ως το αίτιο διατήρησης των ανοσολογικών προνομίων του πλακούντα [75]. Βάσει αυτής της μελέτης, τα κύτταρα της τροφοβλάστης εκφράζουν σε αφθονία Fas Ligand σε τελειόμηνους φυσιολογικούς πλακούντες, ενώ παράλληλα ανιχνεύθηκαν αποπτωτικά μόρια στα εξεταζόμενα δείγματα. Επιπλέον, σε μελέτη της ομάδας του S. Aschkenazi το 2002 [79], σημειώνεται πως τα κύτταρα της τροφοβλάστης φυσιολογικών τελειόμηνων πλακουντιακών ιστών εκφράζουν φυσιολογικά Fas Ligand, αλλά χαμηλά επίπεδα Fas και είναι ανθεκτικά στην απόπτωση που προκαλείται από τον υποδοχέα Fas. Στη μελέτη αυτή αποδεικνύεται ότι οι κυτταροκίνες Th-2 αυξάνουν την αντίσταση των τροφοβλαστικών κυττάρων στην απόπτωση (αναστολή έκφρασης Fas), με σκοπό τη ρύθμιση της βιωσιμότητας της τροφοβλάστης και την επιτυχία ή αποτυχία της κύησης.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα ανωτέρω δεδομένα, η επιστημονική ομάδα υπέθεσε ότι ο πλακούντας διατηρεί τα ανοσολογικά του προνόμια, διότι επάγεται η απόπτωση από τα κύτταρα της τροφοβλάστης που υπερεκφράζει τον προσδέτη Fas Ligand, όταν αυτά έρχονται σε επαφή με λεμφοκύτταρα μητρικής προέλευσης που εκφράζουν τον υποδοχέα

Fas [75,79]. Με αυτά τα δεδομένα, εγείρεται ένα ερώτημα: εφόσον ο πλακούντας χρησιμοποιεί αυτόν τον μηχανισμό για την προστασία του εμβρύου από τα μητρικά αντιγόνα, γιατί να μην χρησιμοποιεί τον ίδιο μηχανισμό για την προστασία του και από αντιγόνα εν γένει; Θα μπορούσαμε, δηλαδή, να υποθέσουμε ότι τα προσβεβλημένα τροφοβλαστικά κύτταρα εκφράζουν τον προσδέτη Fas Ligand, ώστε να αναγνωρίζονται από τα CD8(+) λεμφοκύτταρα, τα οποία υπερεκφράζουν τον υποδοχέα Fas. Επιπλέον, στη δική μας μελέτη ανιχνεύτηκε ταυτόχρονη έκφραση και του προσδέτη Fas Ligand στα CD8(+) λεμφοκύτταρα.

➤ **Μέρος Τρίτο**

Τα T-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται όταν οι υποδοχείς τους έρθουν σε επαφή με ξένο επίτοπο, τον οποίο αναγνωρίζουν ως αντιγόνο. Αυτή η ενεργοποίηση επάγει την έκφραση του υποδοχέα Fas, ο οποίος όταν έρθει σε επαφή με τον προσδέτη του (Fas Ligand), μεταδίδει αποπτωτικό σήμα στο κύτταρο (Scott et al.1996).

Μελέτες έχουν αποδείξει τη συμμετοχή αυτού του μηχανισμού σε ανοσολογικά προνομιούχους ιστούς (όρχις: Bellgrau et al., 1995, μάτι: Griffith et al., 1995, πλακούντας: Uckan et al., 1997). Ωστόσο, υπάρχει έλλειμμα δεδομένων όσον αφορά σε πλακούντες γυναικών νοσούντων με ηπατίτιδα B, καθώς οι βιβλιογραφικές αναφορές για το μηχανισμό Fas - Fas Ligand κατά βάση αναφέρονται σε φυσιολογικές τελειόμηνες κυήσεις ή σε προβληματικές κυήσεις με πρόωρο τοκετό, ίσως γιατί η συλλογή των δειγμάτων πλακούντα με ηπατίτιδα B είναι αρκετά δυσχερής, ή ακόμη γιατί συνήθως οι έρευνες για τον HBV συνήθως προσανατολίζονται σε ιστούς από το ηπατικό παρέγχυμα. Επιπλέον, δεν υπάρχει μελέτη που να εκτίμησε αν τα λεμφοκύτταρα του πλακουντιακού ιστού έχουν διαφορετική έκφραση, ανάλογα με το ιικό φορτίο (HBV-DNA) της νοσούσας μητέρας. Τα ερωτήματα αυτά, για τα οποία η βιβλιογραφία είναι ελλιπής, επιχειρήθηκαν να απαντηθούν με την παρούσα μελέτη. Ωστόσο, οφείλουμε να αναγνωρίσουμε πως παρά την καταβληθείσα προσπάθεια, υπάρχουν ακόμη αρκετά ερωτήματα τα οποία δεν δύναται να απαντηθούν από την παρούσα εργασία και χρήζουν περαιτέρω έρευνας.

Στην παρούσα διατριβή αρχικά θελήσαμε να εκτιμήσουμε την έκφραση του αντιγονικού επιτόπου της πυρηνικής πρωτεΐνης (core) του ιού της Ηπατίτιδας B (HBcAg) και την έκφραση του αντιγονικού επιτόπου της επιφανειακής πρωτεΐνης (HBsAg) στις δύο

εξεταζόμενες κατηγορίες πλακουντιακών ιστών (μητέρες με υψηλό ιικό φορτίο και μητέρες με χαμηλό ιικό φορτίο). Με βάση τα δεδομένα που αναλύθηκαν στο Κεφάλαιο 8, η παρουσία ανοσοθετικών κυττάρων στα πλακίδια για HBsAg και HBcAg ελέγχθηκε με ανοσοϊστοχημεία. Κατά τη μικροσκόπηση των δειγμάτων ανεδείχθησαν αρνητικά σχεδόν όλα τα πλακίδια που εξετάστηκαν για το HBsAg, με εξαίρεση το δείγμα με αριθμό HVL 59, ενώ αντιθέτως όλα τα πλακίδια που εξετάστηκαν για το HBcAg ήταν θετικά, με την χρώση να βάφει κυτταροπλασματικά και στικτά στον πυρήνα των τροφοβλαστικών κυττάρων. Βάσει αυτού του αποτελέσματος αποδεικνύεται η παρουσία του ιού της ηπατίτιδας Β στον πλακούντα και πιο συγκεκριμένα στα κύτταρα της τροφοβλάστης.

Ανατρέχοντας στη σχετική βιβλιογραφία [44-46], η έλλειψη του αντιγόνου επιφανείας επεξηγεί την χρόνια φορεία των μολυσμένων γυναικών, ενώ με την παρουσία του πυρηνικού αντιγόνου αντιλαμβανόμαστε την ενεργότητα της νόσου, δεδομένου ότι το πυρηνικό αντιγόνο είναι δείκτης ενεργού πολλαπλασιασμού, ειδικά όταν εμφανίζεται πυρηνικά και κυτταροπλασματικά. Ο συνδυασμός αυτών των δεδομένων συνηγορεί σε χρόνια ηπατίτιδα Β και αποκλείει την οξεία, διατηρώντας επιφύλαξη για το δείγμα με κωδικό HVL 59, στο οποίο ανιχνεύθηκαν σποραδικά ανοσοκύτταρα θετικά για HBsAg. Τα αποτελέσματα δεν διέφεραν μεταξύ των δύο ομάδων (HVL και LVL).

Στο δεύτερο στάδιο της μελέτης μας θελήσαμε να αναγνωρίσουμε τους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων στις λάχνες και στον φθαρτό των πλακουντιακών ιστών και στη συνέχεια να εκτιμήσουμε αν υπάρχει ή όχι διαφορετική έκφραση αυτών στις δύο εξεταζόμενες κατηγορίες (μητέρες με υψηλό ιικό φορτίο και μητέρες με χαμηλό ιικό φορτίο). Η μέτρηση των anti-CD3, anti-CD4 και anti-CD8 ανοσοθετικών κυττάρων στα πλακίδια έγινε με ανοσοϊστοχημεία.

Όσον αφορά στο anti-CD3, με τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων όπως αναλύθηκε στο Κεφάλαιο 8, δεν αναδείχθηκε διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες ούτε στις λάχνες, ούτε στον φθαρτό των εξεταζόμενων δειγμάτων.

Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων που αφορούσαν στο anti-CD4, τα δείγματα των δύο ομάδων παρουσίασαν διαφορά στην περιοχή των λαχνών, με την ομάδα χαμηλής αιμίας LVL να έχει στατιστικά περισσότερα CD4(+) λεμφοκύτταρα από ό,τι η ομάδα υψηλής αιμίας HVL, ενώ στο φθαρτό παρατηρήθηκε μια στατιστική τάση με την ομάδα LVL να εμφανίζει περισσότερα CD4(+) κύτταρα από την ομάδα HVL, αν και η διαφορά

δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι στον φθαρτό ανιχνεύονται περισσότερα CD4(+) λεμφοκύτταρα από ό,τι στις λάχνες και των δύο ομάδων. Η παρατήρηση αυτή συνάδει με τη μελέτη των Tilburgs et al. (2009), η οποία εκφράζει την πεποίθηση ότι λεμφοκύτταρα με φαινότυπο CD4(+)CD25FOXP3(+)Treg έχουν την τάση να συγκεντρώνονται στον φθαρτό.

Αντίθετη τάση εμφάνιζαν τα δεδομένα που αναλύθηκαν για το anti-CD8, με τα δείγματα να μην εμφανίζουν διαφορά με στατιστική σημαντικότητα στις λάχνες, αλλά με την ανάδειξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς στην περιοχή του φθαρτού, όπου η ομάδα χαμηλής αιμίας (LVL) είχε στατιστικά περισσότερα CD8(+) λεμφοκύτταρα από ό,τι η ομάδα υψηλής αιμίας (HVL). Η παρατήρηση αυτή ενίσχυσε την αρχική μας υπόθεση για διαφορά στην συμπεριφορά των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων μεταξύ της μητρικής και της εμβρυϊκής επιφάνειας και μας έδωσε την ώθηση για την περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού που χρησιμοποιούν τα CD8(+) λεμφοκύτταρα.

Ένα ακόμη δεδομένο που προέκυψε από τις μετρήσεις και είναι άξιο αναφοράς, αφορά στη μέτρηση των ανοσοθετικών κυττάρων CD4 και CD8, όπου συγκριτικά τα CD8(+) κύτταρα είχαν μεγαλύτερα ποσοστά και στις δύο ομάδες αιμίας. Τα ευρήματα που προέκυψαν συνάδουν με τη μελέτη των Labarrere et al. (1990), όπου παρατηρήθηκε η τάση $CD8 > CD4$ σε φυσιολογικούς τελειόμηνους πλακούντες. Την ίδια τάση περιέγραψαν και οι Redline et al. (2007) σε δείγματα πλακούντα με χρόνια λαχνίτιδα αγνώστου αιτιολογίας. Επομένως θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι ο ιός της ηπατίτιδας Β δεν διαταράσσει την αναλογία κυτταροτοξικών/βοηθητικών λεμφοκυττάρων στον πλακούντα. Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση, η αναλογία των ειδικών λεμφοκυτταρικών πληθυσμών δεν είναι ικανή ή αρκετή για την κατανόηση υποκείμενης λοίμωξης.

➤ **Μέρος Τέταρτο**

Έχοντας κατά νου την αρχική μας υπόθεση, δηλαδή την συμμετοχή των T-κυτταροτοξικών και της απόπτωσης στην προφύλαξη του κήματος, τόσο από διαπλακουντιακή μόλυνση με τον ιό HBV, όσο και από την κυτταροτοξικότητα των T-κυττάρων, η έρευνά μας προχώρησε με τη χρήση τριών διπλών έμμεσων ανοσοφθορισμών (anti-CD8 με anti-CD28, anti-CD8 με anti-Fas και anti-CD8 με anti-Fas Ligand).

Στην τεχνική αυτή έγινε ταυτόχρονη χρήση δύο αντιορρών σημασμένων με διαφορετικά φθοριοχρώματα για την παράλληλη ανίχνευση δύο διαφορετικών αντιγόνων στο ίδιο ιστικό υπόστρωμα. Σε κάθε διπλό ανοσοφθορισμό απαραίτητως ο ένας εκ των δύο αντιορρών ήταν anti-CD8 και τα δείγματα εξετάσθηκαν μόνο στον φθαρτό, όπου εμφανίστηκε και η σημαντικά στατιστική διαφορά των CD8(+) μετά την ανοσοϊστοχημεία.

- 1^ο αποτέλεσμα: η σχετική αναλογία CD28(+) ανοσοκυττάρων σε σχέση με Fas(+) και Fas Ligand(+)

Με μια πρώτη ανάγνωση στα δεδομένα που προέκυψαν από τους διπλούς ανοσοφθορισμούς, όπως αυτά παρατέθηκαν στο Κεφάλαιο 8, είναι εμφανής η διαφορά ανάμεσα στα CD8(+) ανοσοκύτταρα που εκφράζουν ταυτόχρονα τα προαποπτωτικά μόρια Fas και Fas Ligand, σε αντίθεση με εκείνα που εκφράζουν ταυτόχρονα το μόριο CD28. Είναι προφανές ότι η απόπτωση των CD8(+) κυττάρων υπερτερεί της επιβίωσης αυτών.

Όπως έχει προαναφερθεί, η χρησιμότητα του αποπτωτικού μηχανισμού Fas - Fas Ligand στους ανοσολογικά προνομιούχους ιστούς είναι αποδεδειγμένη βιβλιογραφικά. Οι ιστοί αυτοί φαίνεται να επιλέγουν το συγκεκριμένο αποπτωτικό μονοπάτι για να εκμηδενίζουν τις πιθανότητες επέκτασης της φλεγμονής ή ακόμη και την καταστροφική αντίδραση υπερδιεγερμένων T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων.

Ήδη από το 1997, οι Uckan et al. δημοσίευσαν μελέτη σύμφωνα με την οποία αποδεικνύεται η στοχευμένη και συστηματική έκφραση της πρωτεΐνης Fas Ligand από την συγκυτιοτροφοβλάστη, δηλαδή την επιθηλιακή επικάλυψη του χοριακού τροφοβλαστικού μανδύα, καθώς και από την εξωλάχνια τροφοβλάστη. Επίσης, στην ίδια μελέτη αναδεικνύεται η έκφραση της πρωτεΐνης Fas από την συγκυτιοτροφοβλάστη, ενώ στα κύτταρα του φθαρτού η έκφραση και των δύο πρωτεϊνών ήταν ασθενής κατά την ανοσοϊστοχημεία. Ακόμη στη μελέτη των Uckan et al. (1997) αποδεικνύεται η προστασία του κνήματος μέσω αυτού του μηχανισμού από την επίθεση των μητρικών λεμφοκυττάρων. Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης έδειξαν ότι το Fas Ligand εκφράζεται εκτεταμένα από τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης του πλακούντα, στα σημεία που οι χοριονικές λάχνες είναι αιμορραγικά διηθημένες από μητρικό αίμα. Εάν ενεργοποιηθούν τα μητρικά λεμφοκύτταρα εναντίον των εμβρυϊκών αντιγόνων, τα λεμφοκύτταρα αναμένονται να εκφράζουν υποδοχείς Fas. Η αλληλεπίδραση τέτοιων

ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων Fas(+) με τα Fas Ligand(+) κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης αναμένεται να οδηγήσει σε απόπτωση των μητρικών λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα την προστασία του εμβρύου από φλεγμονώδη αντίδραση. Μια ακόμη παρατήρηση είναι ότι το ποσοστό των διπλά θετικών κυττάρων CD8(+)CD28(+) ήταν χαμηλό και στις δύο εξεταζόμενες ομάδες. Όπως έχει αναφερθεί και στο Γενικό Μέρος, το CD28 είναι συνυποδοχέας ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων, επομένως θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η χαμηλή έκφραση του CD28 στα CD8(+) κύτταρα του φθαρτού θα μπορούσε να μειώνει την αποτελεσματικότητα του συνδιεγερτικού μονοπατιού που ενεργοποιείται από τη σύνδεση CD28-B7, με πιθανό στόχο την προστασία του κυήματος από επιζήμιες κυτταροτοξικές αντιδράσεις των CD8(+) λεμφοκυττάρων. Ίσως θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τα κύτταρα με τον φαινότυπο CD8(+)CD28(-) έχουν ουσιαστικά ρόλο T-κατασταλτικών λεμφοκυττάρων.

Βάσει της μελέτης των Tilburgs et al.(2006), τα CD8(+)CD28(-) κύτταρα του φθαρτού δεν εκφράζουν το κυτταροτοξικό μόριο περφορίνη. Η επιστημονική ομάδα εικάζει πως η έλλειψη αυτής της έκφρασης ίσως επηρεάζει την λειτουργική ικανότητα των λεμφοκυττάρων στο να προκαλέσουν κυτταροτοξική αντίδραση εναντίον κάποιου παθογόνου, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε παθολογικές παθήσεις του πλακούντα με συνοδό ελαττωματική ανάπτυξη του εμβρύου, καταλήγοντας ωστόσο ότι κάτι τέτοιο δεν αποδεικνύεται και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση [77]. Στη δική μας μελέτη, κανένα έμβρυο δεν παρουσίασε ελαττωματική ανάπτυξη και η κύηση εξελίχθηκε φυσιολογικά. Επομένως εικάζουμε ότι θα μπορούσαν να υπάρχουν πολλαπλοί μηχανισμοί προστασίας του εμβρύου από τα παθογόνα, πέραν της δράσης της περφορίνης.

Με αυτό το σκεπτικό, η ίδια ομάδα το 2010 κατέληξε μετά από περαιτέρω έρευνα ότι ίσως τα CD8(+) T-κύτταρα χρησιμοποιούν ένα διαφορετικό κυτταροτοξικό μονοπάτι στον πλακούντα, ώστε να προστατευθεί το έμβρυο. Μήπως, δηλαδή, να μπορούν να ρυθμίζουν την κυτταροτοξική τους δράση αναλόγως με το αντιγονικό ερέθισμα. Υποθετικά, ένα τέτοιο αντιγονικό ερέθισμα θα μπορούσε να είναι η ύπαρξη του ιικού DNA στα κύτταρα της τροφοβλάστης και ίσως ο μηχανισμός εξόντωσης που χρησιμοποιούν τα CD8(+) να είναι αυτός της απόπτωσης, δεδομένου πως τα T-λεμφοκύτταρα έχουν διττό ρόλο (την προστασία του εμβρύου από τον ιό και ταυτόχρονα, την προστασία του από την κυτταροτοξικότητά τους).

- 2^ο αποτέλεσμα: η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων

Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι όλες οι ανωτέρω αναφορές αφορούν σε φυσιολογικές κύησεις. Στη δική μας μελέτη εξετάζουμε προσβεβλημένους πλακούντες (γεγονός που αποδεικνύεται από την ανίχνευση HBV-DNA στον ομφάλιο λώρο και την ανίχνευση HBcAg στα κύτταρα της τροφοβλάστης), έχοντας ως δεδομένο την φυσιολογική πορεία της κύησης και την γέννηση υγιών τέκνων. Η δική μας υπόθεση είναι ότι για να γεννιούνται τα παιδιά απαλλαγμένα από τη νόσο, ενεργοποιείται το αποπτωτικό μονοπάτι Fas - Fas Ligand, μέσω του οποίου εξασφαλίζεται η καταστολή της επίθεσης των μητρικών λεμφοκυττάρων στα εμβρυικά κύτταρα και η προστασία από διαπλακουντιακή μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας Β.

Βάσει των αποτελεσμάτων που παρατέθηκαν αναλυτικά στο κεφάλαιο 8 του Πειραματικού Μέρους και αφορούσαν στους διπλούς ανοσοφθορισμούς, μεταξύ των δύο ομάδων αναγνωρίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον φθαρτό. Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε πως τα κύτταρα της μητρικής επιφάνειας είναι εκείνα που έχουν αναλάβει το μεγαλύτερο βάρος στην «εξολόθρευση» του ιού.

Πιο αναλυτικά, στον πρώτο διπλό ανοσοφθορισμό (anti-CD8 με anti-CD28), η ομάδα χαμηλής αιμίας (LVL) εμφάνιζε μεγαλύτερο ποσοστό CD8 και CD28 θετικών λεμφοκυττάρων από ό,τι η ομάδα υψηλής αιμίας (HVL).

Κατά τον δεύτερο διπλό ανοσοφθορισμό (anti-CD8 με anti-Fas Ligand), η ομάδα χαμηλής αιμίας (LVL) εμφάνιζε μεγαλύτερο ποσοστό CD8 και anti-Fas Ligand θετικών λεμφοκυττάρων από ό,τι η ομάδα υψηλής αιμίας (HVL).

Ο τρίτος έμμεσος διπλός ανοσοφθορισμός (anti-CD8 με anti-Fas), ανέδειξε διαφορά με στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα στις δύο ομάδες, με την ομάδα υψηλής αιμίας (HVL) να εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό CD8 και anti-Fas θετικών λεμφοκυττάρων από ό,τι η ομάδα χαμηλής αιμίας (LVL).

Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε και στο Τρίτο Μέρος της Συζήτησης, τα δεδομένα που αφορούσαν στα anti-CD8(+) λεμφοκύτταρα, όπως αυτά καταμετρήθηκαν μετά την ανοσοϊστοχημεία, εμφάνιζαν διαφορά με στατιστική σημαντικότητα στον φθαρτό και όχι στις λάχνες. Δηλαδή στη μητρική επιφάνεια του πλακούντα η ομάδα χαμηλού ικού

φορτίου είχε στατιστικά περισσότερα CD8(+) κύτταρα από ό,τι η ομάδα υψηλού ιικού φορτίου.

Απορίας άξιο είναι ότι όλα τα παιδιά γεννήθηκαν αρνητικά στον ιό της ηπατίτιδας Β, είτε η μητέρα είχε υψηλή ιαιμία, είτε χαμηλή. Δεδομένου ότι οι μητέρες με υψηλή ιαιμία είχαν πολύ αυξημένο ιικό φορτίο (HBV-DNA) στον ομφάλιο λώρο και γνωρίζοντας ότι το HBV-DNA διαπερνά τον αιματοπλακουντιακό φραγμό (γεγονός το οποίο πιστοποιείται με την ανίχνευση του πυρηνικού αντιγόνου HBcAg, στα κύτταρα του πλακούντα), είναι άξιον συζήτησης το ότι όλα τα παιδιά γεννήθηκαν απαλλαγμένα από τη νόσο.

➤ **Μέρος Πέμπτο**

- Συμπέρασμα 1^ο: στην ομάδα HVL ενισχύεται λίγο περισσότερο η απόπτωση από ό,τι στην ομάδα LVL

Συμπερασματικά και λαμβάνοντας υπ' όψιν όλα τα ανωτέρω αποτελέσματα, φαίνεται πως τα δεδομένα συνηγορούν στην ύπαρξη κάποιου μηχανισμού, ο οποίος σταματάει τη μετάδοση της νόσου, λειτουργώντας ανεξάρτητα από το ιικό φορτίο της μητέρας. Η τάση των CD8(+) στον φθαρτό να είναι λιγότερα στις μητέρες με υψηλό ιικό φορτίο, σε συνδυασμό με την υπερίσχυση των CD8(+)anti-Fas(+) στην ομάδα υψηλής ιαιμίας (HVL) έναντι της ομάδας χαμηλής ιαιμίας (LVL), η οποία παρουσιάζει τα αντίστροφα αποτελέσματα, θα μπορούσε να οδηγήσει στο συμπέρασμα πως η απόπτωση ενισχύεται λίγο περισσότερο στην ομάδα με αυξημένο ιικό φορτίο.

Ωστόσο, λόγω του μικρού αριθμού εξεταζόμενων δειγμάτων, δεν θα μπορούσαμε να καταλήξουμε σε ασφαλές συμπέρασμα, παρά μόνο να εκφράσουμε υποψία. Η περαιτέρω διερεύνηση μελλοντικά σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων κρίνεται απαραίτητη.

- Συμπέρασμα 2^ο: ενισχύεται η απόπτωση μεταξύ των T-λεμφοκυττάρων

Με βάση τα αποτελέσματα των διπλών ανοσοφθορισμών, όπως παρατέθηκαν στο κεφάλαιο 8, είναι εμφανώς αυξημένα (τουλάχιστον πενταπλάσια) τα ποσοστά που δηλώνουν την έκφραση τόσο του υποδοχέα Fas, όσο και του προσδέτη Fas Ligand στην επιφάνεια των CD8(+) κυττάρων, σε σχέση με το ποσοστό που δηλώνει την έκφραση του CD28 στην επιφάνειά τους. Επομένως, υποθέτουμε πως τα T-κυτταροτοξικά

ενεργοποιούν την απόπτωση και μεταξύ τους (πλέον της απόπτωσης των τροφοβλαστικών κυττάρων), για να προφυλάξουν το κύημα από την αυξημένη ενεργοποίησή τους και πιθανή κυτταροτοξικότητα που θα μπορούσε να βλάψει την κύηση.

Γνωρίζοντας ότι η επαγωγή της απόπτωσης μέσω Fas εξαρτάται από το στάδιο ωρίμανσης των T-λεμφοκυττάρων, αντιλαμβανόμαστε την δυναμική τους, αν δεχθούμε τα αποτελέσματα της μελέτης των Tilburgs et al. (2010), σύμφωνα με τα οποία τα T-λεμφοκύτταρα στον πλακούντα είναι πλήρως διαφοροποιημένα [78]. Ωστόσο, μόνο η έκφραση Fas στην κυτταρική μεμβράνη δεν επαρκεί για να καταστήσει ευαίσθητα τα T-λεμφοκύτταρα στην απόπτωση, υποδηλώνοντας ότι κάποιο άλλο σήμα εμπλέκεται στην όλη διαδικασία, ώστε να επέλθει ο κυτταρικός θάνατος. Αυτό το σήμα θα μπορούσε να είναι η ελλιπής έκφραση του μορίου CD28; Αξίζει να αναφερθεί πως σε αντίστοιχη μελέτη των μηχανισμών απόπτωσης στον αμφιβληστροειδή που, όπως έχει αναφερθεί, υπάγεται στους προνομιούχους ιστούς, το ενδοκυττάριο σήμα που οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση είναι η ένωση του FAS με το FAS Ligand, παράλληλα με ελλιπή έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 (αναστολέας της απόπτωσης) και με ταυτόχρονη αύξηση έκφρασης της πρωτεΐνης Bax (επαγωγέας της απόπτωσης) [80]. Στη δική μας περίπτωση, ίσως το σήμα που εμπλέκεται στο να επέλθει ο κυτταρικός θάνατος να είναι η ελλιπής έκφραση του μορίου CD28 με ταυτόχρονη αύξηση στην έκφραση FAS και Fas Ligand. Αυτό το ερώτημα μένει να απαντηθεί με περαιτέρω έρευνα, πριν καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα.

➤ Μέρος Έκτο

Για την έρευνα της αρχικής μας υπόθεσης υπήρχαν ορισμένοι περιορισμοί, εξαιτίας των οποίων η μελέτη μας για τη διαφορά στην έκφραση των δύο ομάδων χρήζει περαιτέρω ελέγχου. Τέτοιοι περιορισμοί ήταν:

- Η εξέταση δειγμάτων πλακούντα εκ των προτέρων εγκλεισμένων σε παραφίνη, χωρίς δική μας παρέμβαση στη λήψη, τη μονιμοποίηση, τον τεμαχισμό ή την σκλήνωση του πλακούντα.

- Ο σχετικά μικρός αριθμός δειγμάτων, γεγονός που επιβεβαιώνει τη δυσκολία συλλογής κατάλληλων πλακουντιακών ιστών, λόγω των περιορισμένων κριτηρίων καταλληλότητας.
- Μικρός αριθμός κεχρωσμένων δειγμάτων στους διπλούς ανοσοφθορισμούς, λόγω ελλείψεως πόρων που θα καθιστούσαν δυνατή την χρώση όλων των δειγμάτων.

Εν κατακλείδι, με την παρούσα μελέτη επισημαίνουμε τη σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών των T-λεμφοκυττάρων που εμφανίζονται διπλά θετικά στο αντίσωμα anti-CD8 και στο αντίσωμα anti-CD28, σε σχέση με τα ποσοστά των CD8(+) T-λεμφοκυττάρων που εμφανίζονται διπλά θετικά στα αντισώματα anti-CD8 και anti-Fas ή anti-CD8 και anti-Fas Ligand. Όπως προαναφέρθηκε, το CD28 είναι ένα μόριο που προάγει την επιβίωση των λεμφοκυττάρων. Αντιθέτως, τα μόρια Fas και Fas Ligand είναι επαγωγείς της απόπτωσης. Με γνώμονα αυτά τα δεδομένα, μπορούμε να καταλήξουμε σε βέβαιο συμπέρασμα ότι στον πλακούντα προάγεται σημαντικά η απόπτωση έναντι της επιβίωσης των CD8(+) κυττάρων και ότι τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα επάγουν την απόπτωση για την προφύλαξη του κήματος, τόσο από μόλυνση με ηπατίτιδα Β, μέσω κάθετης μετάδοσης από τη μητέρα, όσο και από την ίδια τους την ενεργοποίηση.



Εικόνα 21: Κήμα 9 μηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η περιγεννητική μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας Β έχει απασχολήσει αρκετά την επιστημονική κοινότητα, λόγω των αυξημένων ποσοστών κάθετης μετάδοσης παγκοσμίως, ενώ αντίστοιχα προδιαθέτει το νεογνό να αναπτύξει χρονιότητα και να παρουσιάζει μικρή ανταπόκριση στις αντι-ικές θεραπείες. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν δείγματα πλακουντιακού ιστού από μητέρες φορείς της ηπατίτιδας Β, οι οποίες όμως γέννησαν υγιή παιδιά. Η υπόθεση που διερευνήθηκε ήταν ότι ο πλακούντας χρησιμοποιεί κάποιον μηχανισμό εξουδετέρωσης του ιού, ανεξάρτητο από το ιικό φορτίο που φέρει η μητέρα.

Σκοπός: Κύρια υπόθεση της παρούσας διατριβής είναι ότι τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα έχουν διττό ρόλο στην προφύλαξη του εμβρύου κατά τη διάρκεια μιας κύησης, όπου η μητέρα είναι φορέας της ηπατίτιδας Β. Σκοπός μας ήταν να ελέγξουμε αν τα CD8(+) κύτταρα προφυλάσσουν το κύημα, τόσο από διαπλακουντιακή μόλυνση με τον ιό HBV, όσο και από την δική τους κυτταροτοξικότητα. Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκαν τα χαρακτηριστικά των υποπληθυσμών των T-λεμφοκυττάρων μεταξύ δύο ομάδων: της ομάδας των εγκύων με χαμηλό ιικό φορτίο (LVL, Low Viral Load) και της ομάδας των εγκύων με υψηλό ιικό φορτίο (HVL, High Viral Load).

Υλικά και Μέθοδοι: Για την υλοποίηση της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 53 δείγματα πλακουντιακού ιστού και εφαρμόστηκαν τρεις μέθοδοι για την ανάλυσή τους: ιστοχημική χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης, ανοσοϊστοχημεία (HBsAg HBcAg, anti-CD3, anti-CD4 και anti-CD8,) και διπλός ανοσοφθορισμός (CD8 & CD28, CD8 & anti-Fas, CD8 & anti-Fas Ligand) με τη βοήθεια ειδικών μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων, με στόχο την κατηγοριοποίηση των υποπληθυσμών των T-λεμφοκυττάρων που ευρίσκονται στην περιοχή του φθαρτού και των χοριακών λαχνών, καθώς και τη διερεύνηση της ύπαρξης αποπτωτικής διαδικασίας.

Αποτελέσματα: Από τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας πιστοποιήθηκε η ύπαρξη του ιού HBV στα κύτταρα της τροφοβλάστης του πλακούντα. Όσον αφορά στους T-κυτταρικούς υποπληθυσμούς, ανεδείχθη διαφορά με στατιστική σημαντικότητα στην έκφραση των CD4(+) κυττάρων στην περιοχή των λαχνών, αλλά και στατιστική τάση στην περιοχή του φθαρτού. Και στις δύο ιστολογικές περιοχές του πλακούντα, η ομάδα LVL είχε περισσότερα CD4(+) λεμφοκύτταρα από ό,τι η ομάδα HVL.

Όσον αφορά στα CD8(+) κύτταρα, τα αποτελέσματα ανέδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην περιοχή του φθαρτού, όπου η ομάδα LVL είχε περισσότερα CD8(+) λεμφοκύτταρα από ό,τι η ομάδα HVL.

Από την επισκόπηση των αποτελέσματα των διπλών ανοσοφθορισμών προέκυψε εμφανής διαφορά ανάμεσα στο ποσοστό των CD8(+) κυττάρων που ήταν CD8(+)Fas(+), καθώς και αυτών που ήταν CD8(+)Fas Ligand(+), σε σχέση με το ποσοστό των CD8(+)CD28(+) κυττάρων, όπου τα CD8(+) κύτταρα που εξέφραζαν τα προαποπτωτικά μόρια Fas και Fas Ligand ήταν τουλάχιστον πενταπλάσια εκείνων που εξέφραζαν το συνδιεγερτικό μόριο επιβίωσης CD28. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό των διπλά θετικών κυττάρων CD8(+)CD28(+) ήταν χαμηλό και στις δύο εξεταζόμενες ομάδες.

Αναφορικά με τη σύγκριση των δύο ομάδων, στατιστικά σημαντικές διαφορές αναγνωρίστηκαν στην περιοχή του φθαρτού. Αναλυτικά, η ομάδα LVL εμφάνιζε μεγαλύτερο ποσοστό λεμφοκυττάρων με φαινότυπο CD8(+)CD28(+) και μεγαλύτερο ποσοστό λεμφοκυττάρων με φαινότυπο CD8(+)Fas Ligand(+) από ό,τι η ομάδα HVL, ενώ η ομάδα HVL εμφάνιζε μεγαλύτερο ποσοστό CD8(+)Fas(+) λεμφοκυττάρων από ό,τι η ομάδα LVL.

Συμπέρασμα 1^ο: Η τάση των CD8(+) στον φθαρτό να είναι λιγότερα στις μητέρες με υψηλό ιικό φορτίο, σε συνδυασμό με την υπερίσχυση των CD8(+)Fas(+) στην ομάδα αυτή, θα μπορούσε να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η απόπτωση ενισχύεται λίγο περισσότερο στην ομάδα με αυξημένο ιικό φορτίο.

Συμπέρασμα 2^ο: Τα CD8(+) κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερη έκφραση Fas Ligand (προαποπτωτικό μόριο) σε σχέση με την έκφραση CD28 (μόριο επιβίωσης). Επομένως, υποθέτουμε ότι τα T-κυτταροτοξικά ενεργοποιούν την απόπτωση τόσο των μολυσμένων τροφοβλαστικών κυττάρων, όσο και μεταξύ τους για να προφυλάξουν το κύημα από την αυξημένη ενεργοποίησή τους και πιθανή κυτταροτοξικότητα που θα μπορούσε να βλάψει την κύηση.

Εν κατακλείδι, στον πλακούντα προάγεται σημαντικά η απόπτωση έναντι της επιβίωσης των CD8(+) κυττάρων και τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα επάγουν την απόπτωση για την προφύλαξη του κυήματος, τόσο από μόλυνση με ηπατίτιδα Β, μέσω κάθετης μετάδοσης από τη μητέρα, όσο και από την ίδια τους την ενεργοποίηση.

ABSTRACT

Perinatal transmission of hepatitis B virus has been a serious concern to the scientific community worldwide, due to the increased rates of vertical transmission from the mother to her child, while it predisposes the infant to develop chronicity and to have poor response to antiviral therapies. In this study, placental tissue samples from mothers HBV-carriers were examined, who nevertheless gave birth to healthy children. The conjecture which arose was that the placenta uses a virus-neutralizing mechanism, independent of the viral load which the mother carries.

Aim of thesis: The main hypothesis of this thesis is that T-cytotoxic lymphocytes play a dual role in prophylaxis of the fetus during a pregnancy, where the mother is a hepatitis B-carrier. Our goal was to demonstrate that CD8(+) cells preserve the fetus from both tranplacental HBV infection and their own cytotoxicity. For this purpose, the characteristics of the T-cell subpopulations were examined between two groups: pregnant women with low viral load (LVL) and pregnant women with high viral load (HVL).

Materials and Methods: Fifty-three placenta tissue samples and three methods were used to perform this study: Hematoxylin-Eosin histochemical staining, Immunohistochemistry (HBsAg HBcAg, anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD8) and dual immunofluorescence (CD8 & CD28, CD8 & anti-Fas, CD8 & anti-Fas ligand), by using specific monoclonal and polyclonal antibodies in order to categorize the T-cell subpopulations located in the decidua and the chorionic villi, as well as to investigate the existence of an apoptotic process.

Results: Immunohistochemistry results revealed the presence of HBV in the trophoblast cells of the placenta. As far as for T-cell subpopulations, a statistical difference in the expression of CD4(+) cells was shown in the villi, while a statistical tendency was shown in the decidua. In both histological sites of the placenta, the LVL group had statistically more CD4(+) lymphocytes than the HVL group.

Regarding CD8(+) cells, the results revealed a statistically significant difference in the deciduas, where the LVL group had more CD8(+) lymphocytes than the HVL group.

The results of the double immunofluorescence, showed a difference between the percentage of CD8(+) cells which were CD8(+)Fas(+), as well as those which were

CD8(+)Fas Ligand(+), compared to the percentage of CD8(+)CD28(+) cells. CD8(+) cells expressing Fas and Fas Ligand pro-apoptotic molecules were at least five times more than those expressing the CD28 survival molecule. Furthermore, the percentage of CD8(+)CD28(+) double positive cells was observed to be low in both experimental groups.

Regarding the comparison of the two groups, statistically significant differences were found in the decidua. Analytically, the LVL group exhibited a higher percentage of lymphocytes expressing CD8(+)CD28(+) and a higher percentage of lymphocytes expressing CD8(+)Fas Ligand(+) than the HVL group, whereas the HVL group exhibited a greater proportion of CD8(+)Fas(+) simultaneous expression in lymphocytes than the LVL group.

1st Conclusion: The tendency of CD8(+) lymphocytes in the decidua to be less in mothers with high viral load, combined with the predominance of CD8(+)Fas(+) in that group, could lead to the conclusion that apoptosis is amplified slightly more in the high viraemia group.

2nd Conclusion: CD8(+) cells exhibit greater Fas Ligand expression (pre-apoptotic molecule), than CD28 expression (survival molecule). Therefore, we assume that T-cytotoxic cells activate the apoptosis of both trophoblastic cells and amongst them, in order to protect the fetus from increased activation and possible cytotoxicity that could harm pregnancy.

To sum up, the apoptosis of the CD8(+) cells is significantly promoted in the placenta and T-cytotoxic lymphocytes induce apoptosis for the prophylaxis of the fetus from hepatitis B infection by vertical transmission from the mother, as well as from their own activation.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας I:

HVL	LVL
12, 54, 56, 59, 61, 69, 71, 73A, 73B, 75, 76, 81, 82	11, 13, 16, 18, 24, 28, 29, 34, 36, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48A, 48B, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 57, 58, 60, 62A, 62B, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 74, 79A, 79B, 80

Πίνακας I: οι δύο κατηγορίες στις οποίες χωρίστηκαν οι κύβοι παραφίνης με βάση το υψηλό (HVL) ή το χαμηλό (LVL) ικό φορτίο (τα A και B αφορούν σε δίδυμες κήσεις)

Πίνακας II:

LVL			HVL		
13	(+)	Στον φθαρτό	12	(+)	Στις λάχνες & στον φθαρτό
16	(+)	Στον φθαρτό	61	(+)	Στις λάχνες & στον φθαρτό
24	(+)	Στις λάχνες & στον φθαρτό	69	(+)	Στις λάχνες & στον φθαρτό
39	(+)	Στον φθαρτό	73A	(+)	Στις λάχνες & στον φθαρτό
42	(+)	Στις λάχνες & στον φθαρτό	73B	(+)	Στις λάχνες & στον φθαρτό
43	(+)	Στις λάχνες & στον φθαρτό	82	(+)	Στις λάχνες & στον φθαρτό

Πίνακας II: Αποτελέσματα του πυρηνικού αντιγόνου (HBcAg) μετά την ανοσοϊστοχημεία

Πίνακας III:

LVL		51	(-)
11	(-)	52	(-)
13	(-)	53	(-)
16	(-)	55	(-)
18	(-)	57	(-)
24	(-)	58	(-)
28	(-)	60	(-)
29	(-)	62A	(-)
34	(-)	62B	(-)
36	(-)	64	(-)
39	(-)	65	(-)
41	(-)	66	(-)
42	(-)	67	(-)
43	(-)	68	(-)
44	(-)	70	(-)
45	(-)	72	(-)
46	(-)	74	(-)
48A	(-)	79A	(-)
48B	(-)	79B	(-)
50	(-)	80	(-)

HVL			
12	(-)	73A	(-)
54	(-)	73B	(-)
56	(-)	75	(-)
59	(+) 1/10 HPF	76	(-)
61	(-)	81	(-)
69	(-)	82	(-)

Πίνακας III: Αποτελέσματα του αντιγόνου επιφανείας (HBsAg) μετά την ανοσοϊστοχημεία

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. Placental types. In: Pathology of the Human Placenta, 5th edition. New York: Springer-Verlog, 2006: 30-42.
2. <http://histologylab.ccnmtl.columbia.edu/lab15/placenta.html>
3. <http://www.smgebooks.com/histopathology/chapters/HISPATH-16-04.pdf>
4. Cynthia G. Kaplan. Basic Placental Anatomy and Development. In: Color Atlas of Gross Placental Pathology, 2nd ed., New York: Springer, 2007: 12-24.
5. William J. Larsen, Εμβρυολογία του ανθρώπου, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου ΑΕ, Αθήνα 1996, κεφ.2, «Η δεύτερη εβδομάδα της ανάπτυξης», σελ. 32-49, μετ. Γ.Ν.Αντωνακόπουλος.
6. Avagliano L, Marconi AM, Candiani M, Barbera A, Bulfamante G. Thrombosis of the Umbilical Vessels revisited. An observational study of 317 consecutive autopsies at a single institution. Human Pathology. 2010; 41: 971-979.
7. Huppertz B. The Anatomy of the Normal Placenta. J Clin Pathol. 2006; 61: 1296-1302.
8. Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. Pathology of the Human Placenta. In: Macroscopic features of the delivered placenta. 5th edition. New York: Springer-Verlag, 2006: 13-16.
9. Kaufmann P. Basic morphology of the fetal and maternal circuits in the human placenta. Contrib Gynecol Obstet. 1985; 13: 5-17.
10. Ballantyne JW. Diseases and deformities of the fetus. Oliver and Boyd. Edinburgh. UK
11. Fadeel B, Orrenius S. J Intern Med. 2005. Dec; 258(6):479-517
12. Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνα Β, Παναγιώτου ΓΚ. In: Ιατρική Μικροβιολογία και Ιολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη 2002: 285-303.
13. Bourne EJ, Dienstag JL, Lopez VA, Sander TJ, Longlet JM, Hall JG, Kwiatkowski RW, Wright T, Lai CL, Condreay LD. Quantitative analysis of HBV cccDNA from clinical specimens: correlation with clinical and virological response during antiviral therapy. J Viral Hepat. 2007 Jan; 14(1): 55-63.
14. Miyakawas Y, Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. Intervirology 2003; 46: 329-338.
15. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. J Gen Virol 1988; 69:2575-2583.
16. Kramvis A, Kew M, Francois G. Hepatitis B virus genotypes. Vaccine 2005; 23:2409-2423.
17. Ashton-Rickhardt RG, Murrau K. Mutations that change the immunological subtype of hepatitis B virus surface antigen and distinguish between antigenic and immunogenic determination. J Med Virol 1989; 29:204-219
18. Okamoto H, Imal M, Tsuda F. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for ad/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adry or adwr. J Virol 1987; 61:3030-3034.
19. El Khouri M, dos Santos VA. Hepatitis B: epidemiological, immunological and serological considerations emphasizing mutation. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo. 2004 Aug; 59(4):216-224.
20. Chu CJ, Lok AS. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. Hepatology. 2002 May; 35(5):1274-1276.

21. Ou JH, Laub O, Rutter W. Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of e antigen. *Proc Natl Acad Sci MSA* 1986; 83:1578-1582.
22. Ou JH, Yeh CT, Yen TSB. Transport of hepatitis B virus precore protein into the nucleus alter cleavage of its signal peptide. *J Viral* 1989; 63:238-243.
23. Tiollais P, Pourcell C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317:489-495.
24. Seeger C, Mason W. Hepatitis B virus biology. *Microbiology and molecular biology reviews.* 2000; 64:51-68.
25. Cooper A, Paran N, Shaul Y. The earliest steps in hepatitis B virus infection. *EMBO J.* 2003; 13:2273-2279
26. Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, Locarnini S. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes, *J Virol.* 1995 Jun; 69(6):3350-3357
27. Ganem D, Pollack JR, Tavis J. Hepatitis B virus reverse transcriptase and its many roles in hepadnaviral genomic replication. *Infect Agents Dis.* 1994; 3:85-93
28. Hirsch R, Colgrove R, Ganem D. Replication of duck hepatitis B virus in two differentiated human hepatoma cell lines after transfection with cloned viral DNS. *Virology.* 1988 Nov; 167(1):136-142
29. Lewin S, Walters T, Locarnini S. Hepatitis B treatment: rational combination chemotherapy based on viral kinetic and animal model studies. *Antiviral Res.* 2002 Sep; 55(3):381-396
30. Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 1987; 232:477-484
31. Summers J, Smith PM, Horwich AL. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol.* 1990; 64:2819-2824
32. Sung JJ, Wong ML, Bowden S, Liew CT, Hui AY, Wong VW, Leung NW, Locarnini S, Chan HL. Intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy. *Gastroenterology.* 2005 Jun; 128(7):1890-1897
33. Pungpapong S, Kim WR, Poterucha JJ. Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians. *Mayo Clin Proc.* 2007 Aug; 82(8):967-975
34. Tran TT, Martin P. Hepatitis B: epidemiology and natural history. *Clin Liver Dis.* 2004; 8:255-266
35. Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003; 23:47-58
36. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255017/1/WHO-HIV-2017.06-eng.pdf?ua=1>
37. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:29-60
38. http://www.keelpno.gr/Portals/0/Newsletter/2012/keelpno_newsletter_march2012.pdf
39. Dienstag JL, Isselbacher KJ. Acute viral hepatitis. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, eds. *Harrison's principles of internal medicine.* 14th Edition. New York, 1998; 1677-1692.
40. Zhu Y, Luo K, Yu L. Clinical and histological features of fibrosing cholestatic hepatitis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2002. Dec; 10(6):434-436.
41. Yoffe B, Burns DK, Bhatt HS, Combes B. Extrahepatic hepatitis B virus DNA sequence in patients with acute hepatitis B infection. *Hepatology.* 1990. Aug; 12(2):187-192.

42. Dienstag JL, Isselbacher KJ. Chronic hepatitis. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, eds. *Harrison's principles of internal medicine*. 14th edition. New York. 1998; 1696-1704
43. Papatheodoridis GN, Dimou E, Laras A, Papadimitropoulos V, Hadziyannis SJ. Course of virologic breakthroughs under long-term lamivudine in HBeAg-negative precore mutant HBV liver disease. *Hepatology* 2002; 36:219-226
44. Zhao DY, Qin YQ, Tang XM, Liu GZ, Zheng W, Nong HR, Song JJ, Xie QY. Relationship among pathological changes in Liver tissues and level of serum HBV DNA, HBeAg and ALT of 194 patients with chronic hepatitis B. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2007 Mar; 21(1):35-37
45. Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Brechot P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? *Hepatology*. 2001; 34:194-203
46. Γιουλεμέ Όλγα. Οι ορολογικοί δείκτες των ιογενών ηπατίτιδων HBV, HCV, HDV, HGV/GBV-C. Μετεκπαιδευτικά μαθήματα 2005. Ελληνική Γαστρεντερολογική Εταιρεία. Τμήμα της Βορείου Ελλάδος, Θεσσαλονίκη 2005:27-32
47. Cline MK, Bailey-Dorton C, Cayelli M. Update in maternity care. Maternal infections: diagnosis and management. *Primary care: clinics in office practice* 2000; 27(1):13-33
48. Reinus JF, Leikin EL. Pregnancy and liver disease: viral hepatitis in pregnancy. *Clin Liver Dis* 1999; 3(1):115-130
49. Bloom BS, Hillman AC, Fendrick AM. Reappraisal of hepatitis B virus vaccination strategies using cost effectiveness analysis. *Ann Intern Med* 1993; 118:298-306
50. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:29-60
51. Gambarin-Gelwan M. Hepatitis B in pregnancy. *Clin Liver Dis*. 2007 Nov; 11(4):945-963
52. Boni C, Bertolletti A, Penna A. Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1998; 102:968-975
53. Ferrari C, Penna A, Bertolletti A. Cellular immune response to hepatitis virus encoded antigens in acute and chronic hepatitis B. *J Immunol* 1990; 145:3442-3449
54. Chen HS, Kew MC, Hornbuckle WE. The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host. *J Virol* 1992; 66:5683-5684
55. Lau JYN, Wright TL. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 1993; 342:1335-1340
56. Sen GC. Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001; 55:255-281
57. De Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ. Type I interferon receptors biochemistry and biological functions. *J Biol Chem* 2007; 282(28):20053-20057
58. Oldham R. Natural killer cells: Artifact to reality: An odyssey in biology. *Cancer Metastasis Reviews* 1983; (4):323-336
59. Masmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today*. 1996;17:138-146
60. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T- cell priming and Th1/Th2 mediated responses. *Immunology Today*. 1998; 19:568-574
61. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kubi J. *Immunology*. 5th edition. New York 2007; 1:11-20
62. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kubi J. *Immunology*. 5th edition. New York 2007; 7:201-218

63. Boehm T, Zuffell F. MHC peptides and the sensory evaluation of genotype. *Trends Neurosci.* 2006; 29(2):100-107
64. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol.* 2005; 84:627-639
65. Viktorsson K, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies. *Avd. Cancer Res.* 2005; 94:143-196
66. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kubi J. *Immunology.* 5th edition. New York 2007; 2:34-37
67. Osborne BA. Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 1996; 8:245
68. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr Rev.* 2005 Dec; 26(7):877-897
69. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* 2005; 4:139-163
70. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in human disease. *J. Intern. Med.* 2005; 258:479-517
71. Griffith TS, Ferguson TA. The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol Today.* 1997 May; 18(5):240-244
72. Steward M, Bishop R, Piggott NH, Milton ID, Angus B, Horne CH. Production and characterization of the CD3 T-cell associated antigen in formalin-fixed embedded tissue. *Histopathology* 1997 Jan; 30(1):16-22
73. Dabbs DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry.* Elsevier Inc. 2nd Edition. 2006; 141-150
74. Mason DY, Cordell JL, Gaulard P, Tse AGD, Brown MH. Immunohistological detection of human cytotoxic/suppressor T cells using antibodies to a CD8 peptide sequence. *J Clin Pathol* 1992; 45:1084-1088
75. Uckan D, Steele A, Cherry, Wang BY, Chamizo W, Koutsonikolis A, Gilbert-Barnes E, Good RA. Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. *Mol Hum Reprod.* 1997 Aug; 3(8):655-6
76. Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, van Schip JJ, Kleijburg C, de Groot-Swings GM, Kanhai HH, Claas FH, Scherjon SA. Differential distribution of CD4(+)CD25(bright) and CD8(+)CD28(-) T-cells in decidua and maternal blood during human pregnancy. *Placenta.* 2006 Apr; 27 Suppl A:S47-53. Epub 2006 Jan 25
77. Tilburgs T, Scherjon SA, Roelen DL, Claas FH. Decidual CD8+CD28- T cells express CD103 but not perforin. *Hum Immunol.* 2009 Feb; 70(2):96-100. doi: 10.1016/j.humimm.2008.12.006. Epub 2009 Jan 14
78. Tilburgs T, Schonkeren D, Eikmans M, Nagtzaam NM, Datema G, Swings GM, Prins F, van Lith JM, van der Mast BJ, Roelen DL, Scherjon SA, Claas FH. Human decidual tissue contains differentiated CD8+ effector-memory T cells with unique properties. *J Immunol.* 2010 Oct 1; 185(7):4470-7. doi: 10.4049/jimmunol.0903597. Epub 2010 Sep 3
79. Aschkenazi S, Straszewski S, Verwer K.M.A., Foellmer H, Rutherford T., Mor G. Differential regulation and function of the Fas/Fas Ligand system in human trophoblast cells. *Biology of Reproduction.* Vol 66, Issue 6. 2002 Jun;1853-1861.
80. Pharmakakis NM, Petropoulos IK, Georgakopoulos CD, Vantzou CV, Anastassiou ED, Mavropoulos A, Zolota V. Apoptotic mechanisms within the retina in *Staphylococcus epidermidis* experimental endophthalmitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009 May;247(5):667-74. doi: 10.1007/s00417-008-0996-z. Epub 2008 Nov 28

ΠΗΓΕΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- 1.<http://www.ubooks.pub/Books/ON/B0/E28R8369/P6C2S3U27.html>
- 2.<http://www.pzarganis.com/γιατηνεγκυο>
- 3.Τροποποιημένη εικόνα από Gerlich WH et al. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. Virol J. 2013 (21)
- 4.Τροποποιημένη εικόνα από Dienstag JL et al. Hepatitis B virus infection. The New England Journal of Medicine. 2008 (27)
- 5.<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:3oAHXyU5YAMJ:eclass.uoa.gr/modules/document/index.php%3Fcourse%3DBIOL120%26download%3D/54324d208YcR/5486dd8cuw2o.ppt+&cd=2&hl=el&ct=clnk&gl=gr&client=firefox-b>
- 6.<https://www.ioanninamed.gr/updating/prevention/69-vaccines-for-adults/168-hepatitis-b-vaccine>
- 7.<https://www.slideshare.net/yayakuku/ethiopian-pathology>
- 8.<http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/2818/1/doctorateapoptosis.pdf>
- 9.<http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/440/1/210.pdf>
- 10.<http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/2818/1/doctorateapoptosis.pdf>
- 11-17: Εικόνες από το οπτικό μικροσκόπιο Leica DM1000 με χρήση κάμερας Leica DFC 290 και με τη βοήθεια του προγράμματος Leica Application Suite LAS V4.5 στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς «οι Άγιοι Ανάργυροι»
- 18-20: Εικόνες από το μηχανοκίνητο ορθό συνεστιακό μικροσκόπιο σταθερής τράπεζας Leica TCS SP στη Μονάδα Οπτικής Μικροσκοπίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ
- 21.<https://momsweb.mx/articulo/ser-mama/nuestros-hijos/8-cosas-realmente-sorprendentes-que-hacen-los-bebes-dentro-del-vientre>