



«Σχολή Θετικών επιστημών και τεχνολογίας»

«Χημική και βιομοριακή ανάλυση»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**«Η χρήση μη κωδικοποιητικών RNA ως βιοδείκτες των
ηπατικών νόσων»**

Αναστασία Μόνιου

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Αικατερίνη Κωνσταντίνου

Πάτρα, Ιούλιος 2023

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



«Η χρήση μη κωδικοποιητικών RNA ως βιοδείκτες των ηπατικών νόσων»

Αναστασία Μόνιου

Επιτροπή Επίβλεψης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Αικατερίνη Κωνσταντίνου

Συνεργαζόμενο εκπαιδευτικό προσωπικό

Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Ανδρέας Σκορίλας

Καθηγητής-Τμήμα Βιολογίας

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Πάτρα, Ιούλιος 2023

*Σε εκείνον που έφυγε,
σε εκείνον που ήρθε
και στους βράχους της ζωής μου...*

Κατερίνα, σε ευχαριστώ για όλα!

Περίληψη

Οι ηπατικές νόσοι, ανεξαρτήτου προέλευσης, έχουν υψηλό επιπολασμό και ευθύνονται για ένα μεγάλο ποσοστό θανάτων παγκοσμίως. Η έγκαιρη και έγκυρη διάγνωσή τους είναι καθοριστικής σημασίας για την ποιότητα ζωής και την επιβίωση των ασθενών. Λόγω του ασυμπτωματικού χαρακτήρα πολλών ηπατικών νόσων μέχρι το στάδιο της σοβαρής ηπατικής βλάβης, είναι ζωτική η ανάγκη για εύρεση νέων βιοδεικτών που μπορούν να προβλέψουν την παρουσία και εξέλιξη μίας ηπατικής νόσου, είτε αυτή έχει εκφραστεί κλινικά είτε όχι. Οι αιματολογικοί βιοδείκτες και οι επεμβατικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα είναι αποτελεσματικές μέχρι ένα βαθμό. Τα μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs), που μέχρι πρόσφατα αντιμετωπίζονταν ως «άχρηστη πληροφορία» αποτελούν, πλέον, δυνητικούς βιοδείκτες. Παρουσία ιών (π.χ. HBV, HCV), γενετικών ή εξωγενών παραγόντων (π.χ. κατανάλωση αλκοόλ), επηρεάζεται η έκφραση κάποιων ncRNAs, με αποτέλεσμα την απελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία του αίματος. Τα περισσότερα κυκλοφορούντα ncRNAs ανήκουν στην κατηγορία των micro-RNAs (miRNAs), μελετώνται όμως και ncRNAs από τις κατηγορίες των long-non coding RNAs (lncRNAs) και των κυκλικών RNAs (circRNAs). Τα ncRNAs ως βιοδείκτες είναι πολλά υποσχόμενοι, καθώς μπορούν να αποτελέσουν φθηνούς, μη επεμβατικούς δείκτες των ηπατικών νόσων και να αποκαλύψουν την ύπαρξη ηπατικής νόσου εγκαίρως για την καλύτερη αντιμετώπιση του ασθενούς. Σε πολλές περιπτώσεις, τα ncRNAs είναι ωφέλιμα όταν συνεκτιμώνται με τους ήδη υπάρχοντες επικυρωμένους βιοδείκτες, υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που τα ncRNAs εμφανίζονται στην κυκλοφορία του αίματος όταν ακόμα οι κλασσικοί αιματολογικοί βιοδείκτες (AST, ALT, γ-GT, κλπ) δεν παρουσιάζουν ακόμα μεταβολή. Η ευαισθησία, η εξειδίκευση και η ακρίβεια είναι οι παράγοντες που χαρακτηρίζουν έναν αξιόπιστο βιοδείκτη και εφόσον πληρούνται και στην περίπτωση των ncRNAs, τα καθιστούν κατάλληλα προς χρήση.

Λέξεις – Κλειδιά

Ηπατικές νόσοι, Βιοδείκτες, Μη-κωδικοποιητικά RNAs, miRNAs.

Abstract

Liver diseases, regardless of origin, have a high prevalence and are responsible for a large proportion of deaths worldwide. Their timely and valid diagnosis is crucial for the quality of life and survival of patients. Due to the asymptomatic nature of many liver diseases until the stage of severe liver damage, there is a vital need to find new biomarkers that can predict the presence and progression of a liver disease, whether it has been clinically expressed or not. Hematological biomarkers and interventional methods used to date are effective up to a point. Non-coding RNAs (ncRNAs), which until recently were treated as "useless information", are now potential biomarkers. In the presence of viruses (e.g. HBV, HCV), genetic or exogenous factors (e.g. alcohol consumption), the expression of some ncRNAs is affected, resulting in their release into the bloodstream. Most circulating ncRNAs belong to the category of micro-RNAs (miRNAs), but ncRNAs from the categories of long-non-coding RNAs (lncRNAs) and circular RNAs (circRNAs) are also being studied. ncRNAs as biomarkers are promising, as they can be inexpensive, non-invasive markers of liver diseases and reveal the existence of liver disease in time for better patient management. In many cases, ncRNAs are beneficial when taken together with already existing validated biomarkers, but there are also cases where ncRNAs appear in the bloodstream when the classic hematological biomarkers (AST, ALT, γ -GT, etc) still do not show a change. Sensitivity, specificity and accuracy are the factors that characterize a reliable biomarker and if they are also met in the case of ncRNAs, they make them suitable for use.

Keywords

Liver disease, Biomarkers, Non-coding RNAs, miRNA.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	v
Abstract	vi
Περιεχόμενα	vii
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	x
Κατάλογος Πινάκων	xi
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xii
1. Εισαγωγή.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.1 Δομή και ανατομία του ήπατος	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.2 Λειτουργίες του ήπατος	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.2.1 Ήπαρ και μεταβολισμός.....	3
1.2.2 Ο ρόλος του ήπατος σε άλλες φυσιολογικές λειτουργίες	6
1.3 Αίτια ηπατικής δυσλειτουργίας.....	7
2. Στόχος.....	10
3. Ηπατικές νόσοι.....	11
3.1 Αλκοολικές ηπατικές νόσοι (ALD).....	11
3.1.1 Λιπώδες ήπαρ/ Στεάτωση	13
3.1.2 Αλκοολική στεατοηπατίτιδα/ Αλκοολική ηπατίτιδα	14
3.1.3 Αλκοολική κίρρωση.....	14
3.2 Μη αλκοολικές ηπατικές νόσοι (NALD).....	16
3.2.1 Μη-αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD).....	16
3.2.2 Μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH)	17
3.3 Ιογενής ηπατίτιδα	18
3.3.1 Ηπατίτιδα Α (HAV)	18
3.3.2 Ηπατίτιδα Β (HBV).....	19
3.3.3 Ηπατίτιδα C (HCV).....	20
3.3.4 Ηπατίτιδα D (HDV)	21
3.3.5 Ηπατίτιδα Ε (HEV)	21
3.3.6 Ηπατίτιδα προερχόμενη από άλλους ιούς.....	22
3.4 Αυτοάνοσες παθήσεις του ήπατος	23
3.4.1 Αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΙΗ).....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.

3.4.2 Πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα (PBC)	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης. 4
3.4.3 Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (PSC).....	24
3.5 Κληρονομικές ασθένειες του ήπατος.....	25
3.5.1 Νόσος του Wilson	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης. 6
3.5.2 Ανεπάρκεια άλφα-1 αντιθρυψίνης	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης. 6
3.5.3 Αιμοχρωμάτωση.....	27
3.5.4 Ανεπάρκεια λιπάσης λυσοσωμικού οξέος (LAL-D) ...	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης. 8
3.6 Κίρρωση του ήπατος	29
3.7 Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	30
4. Βιοδείκτες.....	32
4.1 Ορισμοί	32
4.2 Χρησιμότητα και πλεονεκτήματα της χρήσης βιοδεικτών	33
4.3 Κατηγορίες βιοδεικτών	33
4.4 Ποιοτικά χαρακτηριστικά βιοδεικτών.....	35
4.5 Επικύρωση και αξιολόγηση βιοδεικτών	37
4.6 Περιορισμοί και μειονεκτήματα στη χρήση βιοδεικτών.....	39
5. Μη κωδικοποιητικά RNAs.....	41
5.1 Small ncRNA (sncRNAs)	42
5.1.1 miRNA	43
5.1.2 siRNA.....	45
5.1.3 piRNA	46
5.1.4 snRNA.....	48
5.1.5 snoRNA.....	49
5.2 Long ncRNA (lncRNAs).....	50
5.3 Κυκλικά ncRNA (circRNAs)	52
6. Ηπατικές νόσοι και μη κωδικοποιητικά RNAs.....	54
6.1 Για τις αλκοολικές ηπατικές νόσους	56
6.2 Για τις μη αλκοολικές ηπατικές νόσους.....	58
6.3 Για τις ιογενείς ηπατίτιδες.....	61
6.4 Για την ίνωση και την κίρρωση του ήπατος	64

6.5 Για το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.....	68
7. Συμπεράσματα	70
Βιβλιογραφία.....	73

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1 Η δομή του ηπατικού λόβιου.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
Εικόνα 2 Διαγραμματική απεικόνιση όλων των κυτταρικών τύπων του ήπατος	3
Εικόνα 3 Ο μεταβολισμός των τριγλυκεριδίων	5
Εικόνα 4 Ο μεταβολισμός της αιθανόλης	13
Εικόνα 5 Καμπύλη ROC για τον APRI στην πρόβλεψη ίνωσης και κίρρωσης	37
Εικόνα 6 Τα βήματα της αξιολόγησης ενός βιοδείκτη	38
Εικόνα 7 Κατηγορίες RNA	42
Εικόνα 8 Η βιοσύνθεση των miRNAs	44
Εικόνα 9 Οι λειτουργίες των μακρών μη κωδικοποιημένων RNA (lncRNAs) σχετίζονται με την θέση τους στο κύτταρο.	51
Εικόνα 10 Τα κυκλοφορούντα miRNA (ώριμα ή πρόδρομα) μπορούν να απελευθερωθούν μέσα σε εξωσώματα, μικροκυστίδια, HDL, αποπτωτικά σώματα και με πρωτεΐνες (Ago2).	55

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Τα κυριότερα ncRNAs που παρουσιάζουν αύξηση ή μείωση στην έκφρασή τους στις αλκοολικές ηπατικές νόσους (ALD) και ποια από αυτά εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος	57
Πίνακας 2 Τα κυριότερα ncRNAs που παρουσιάζουν αύξηση ή μείωση στην έκφρασή τους στις μη-αλκοολικές ηπατικές νόσους (NAFLD και NASH) και ποια από αυτά εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος	60
Πίνακας 3 Τα κυριότερα ncRNAs που παρουσιάζουν αύξηση ή μείωση στην έκφρασή τους στις ηπατίτιδες HBV και HCV και ποια από αυτά εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος	62
Πίνακας 4 Τα κυριότερα ncRNAs που παρουσιάζουν αύξηση ή μείωση στην έκφρασή τους στην ίνωση και την κίρρωση του ήπατος και ποια από αυτά εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος.....	65
Πίνακας 5 Τα κυριότερα ncRNAs που παρουσιάζουν αύξηση ή μείωση στην έκφρασή τους στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) και ποια από αυτά εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος	68
Πίνακας 6 Τα βασικότερα ncRNAs που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες στις ηπατικές νόσους	72

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

ncRNA	non-coding RNA
miRNA	micro-RNA
siRNA	small interfering RNA
piRNA	piwi-interacting RNA
snRNA	small nuclear RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
lncRNA	long non-coding RNA
circRNA	circular RNA
ALD	Alcohol Liver Disease
NAFLD	Non-alcohol Fat Liver Disease
NASH	Non-alcohol Steatohepatitis
PBC	Primary Biliary Cholangitis
PSC	Primary Sclerosing Cholangitis
AIH	Auto-immune Hepatitis
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HDL	High Density Lipoprotein
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
AST	Aspartate Aminotransferase
ALT	Alanine Aminotransferase

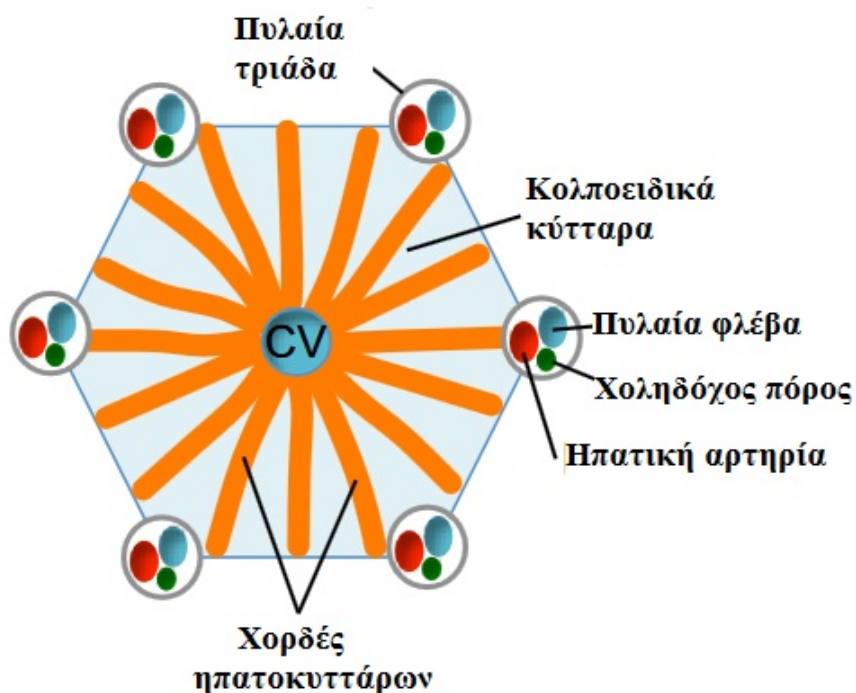
1. Εισαγωγή

1.1 Δομή και ανατομία του ήπατος

Το ήπαρ, όπως μαρτυρά και η λέξη (ηπάομαι=επιδιορθώνω), είναι ένα όργανο- ρυθμιστής του ανθρώπινου σώματος, υπεύθυνο για την εύρυθμη λειτουργία πολλών άλλων ζωτικών οργάνων. Αποτελεί το μεγαλύτερο αδένα στον άνθρωπο, με μέγεθος που αντιστοιχεί στο 2% του συνολικού βάρους ενός ενήλικα, δηλαδή περίπου 1,5 kg κατά μέσο όρο και στο 5% του συνολικού βάρους ενός εμβρύου. Εντοπίζεται ανάμεσα στο διάφραγμα και το στομάχι, στο πάνω δεξιό τμήμα της κοιλιάς και περιέχει το 13% του συνολικού αίματος.

Για την περιγραφή της δομής του διαιρείται σε 2 λοβούς, τον αριστερό και τον δεξιό, ενώ στην οπίσθια επιφάνεια παρατηρούνται δύο επιπλέον λοβοί, ο κερκοφόρος και ο τετράπλευρος. Η εισροή του αίματος μέσα στο ήπαρ ρυθμίζεται από ένα σύστημα αγγείωσης που αποτελείται από την πυλαία φλέβα και την ηπατική αρτηρία. Η πυλαία φλέβα καλύπτει τα $\frac{3}{4}$ της αιματικής παροχής και το αίμα που μεταφέρει, φέρει ουσίες προερχόμενες από τη διαδικασία της πέψης, καθώς και ουσίες προερχόμενες από το έντερο, τον σπλήνα και το πάγκρεας. Η ηπατική αρτηρία καλύπτει το υπόλοιπο $\frac{1}{4}$ της παροχής σε αίμα και μεταφέρει αίμα από την αορτή. Και οι δύο παρέχουν στο ήπαρ το απαραίτητο οξυγόνο, σε ποσοστό 50% έκαστη. Η εκροή του αίματος πραγματοποιείται από τρεις ηπατικές φλέβες διαμέσου των οποίων απάγεται αίμα προς την κάτω κοίλη φλέβα. γίνεται μέσω του χοληδόχου πόρου.^[1]

Τα κύτταρα του ήπατος οργανώνονται σε λειτουργικές δομικές μονάδες του ήπατος - τα λόβια. Το σχήμα του λόβιου είναι εξαγωνικό, στο κέντρο έχει μια κεντρική φλέβα και στις κορυφές του εξαγώνου την πυλαία τριάδα, η οποία αποτελείται από τριχοειδή της πυλαίας φλέβας, της ηπατικής αρτηρίας και του χοληφόρου πόρου όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.^[2]



Εικόνα 1: Η δομή του ηπατικού λόβιου- Το ήπαρ είναι οργανωμένο σε λόβια, που αποτελούν τις λειτουργικές του μονάδες. Κάθε λόβιο αποτελείται από μια κεντρική φλέβα (CV), από την οποία ξεκινούν οι χορδές των ηπατοκυττάρων και καταλήγουν στις πυλαίες τριάδες. Η πυλαία τριάδα αποτελείται από μια πυλαία φλέβα, μία ηπατική αρτηρία και έναν χοληφόρο πόρο. Οι χορδές ηπατοκυττάρων μεταφέρουν αίμα από τις πυλαίες τριάδες στην κεντρική φλέβα

Πηγή: M. Gordillo et al. Development. 2015 Jun 15

Οι τύποι κυττάρων που συναντώνται στο ήπαρ είναι πολλοί και την πλειοψηφία αυτών-περίπου το 78%- αποτελούν τα ηπατοκύτταρα. Άλλα κύτταρα είναι τα κολποειδικά κύτταρα σε ποσοστό περίπου 2,5%. Πρόκειται για ενδοθηλιακά κύτταρα που ρυθμίζουν την ανταλλαγή πρωτεϊνών μεταξύ κυττάρων και πλάσματος και διαχωρίζονται από τα ηπατοκύτταρα μέσω του χώρου Disse. Επίσης, στον χώρο Disse υπάρχουν τα αστροειδή κύτταρα σε ποσοστό περίπου 1,4%, που αποτελούν αποθήκες της βιταμίνης A και είναι υπεύθυνα για την διαχείριση του κολλαγόνου στο τραυματισμένο ήπαρ. Τέλος, άλλα σημαντικά κύτταρα είναι τα κύτταρα Kupffer σε ποσοστό περίπου 2%, τα μακροφάγα που ενεργοποιούνται ως άμυνα στην παρουσία παθογόνων που εισέρχονται μέσω της πυλαίας φλέβας στο ήπαρ και τα χολαγγειοκύτταρα σε ποσοστό περίπου 3%, τα οποία βρίσκονται ως επένδυση στους χοληφόρους πόρους.^[3] Όλα τα παραπάνω κύτταρα οργανώνονται κατάλληλα γύρω από τον λόβιο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2: Διαγραμματική απεικόνιση όλων των κυτταρικών τύπων του ήπατος- Μέσα σε κάθε λοβό υπάρχει ένας αριθμός κολποειδικών τριχοειδών. Τα αστροειδή κύτταρα βρίσκονται στο χώρο του Disse μεταξύ των χορδών ηπατοκυττάρων και των κολποειδικών τριχοειδών. Τα κύτταρα Kupffer, βρίσκονται επίσης στα κολποειδικά. Τα ηπατοκύτταρα εκκρίνουν χολικά άλατα στα χοληφόρα κανάλια που οδηγούν στον χοληδόχο πόρο. Τα χολαγγειοκύτταρα είναι τα επιθηλιακά κύτταρα τα οποία βρίσκονται ως επένδυση στους χοληφόρους πόρους.

Πηγή: M. Gordillo et al. *Development*. 2015 Jun 15

1.2 Λειτουργίες του ήπατος

Η παρουσία του ήπατος στον οργανισμό είναι καθοριστική και η λειτουργία του αναντικατάστατη. Συμμετέχει σε μεταβολικές διαδικασίες, στη σύνθεση, απέκκριση ή αποθήκευση ουσιών, και στην άμυνα του οργανισμού.

1.2.1 Ήπαρ και μεταβολισμός

Ο ρόλος του ήπατος στο μεταβολισμό και τον μεταβολικό έλεγχο του σώματος είναι πολυεπιπέδου.

1. Ο μεταβολισμός των υδατανθράκων και ο ρόλος του ήπατος στη ρύθμισή του

Πολύ βασική ρύθμιση στον ανθρώπινο οργανισμό είναι αυτή της γλυκόζης στο αίμα. Στο ήπαρ συντίθεται γλυκόζη (γλυκονεογένεση) και μαζί με τη διατροφικά προερχόμενη αποθηκεύεται στη μορφή του πολυσακχαρίτη που ονομάζεται γλυκογόνο. Η διαδικασία παραγωγής γλυκογόνου από γλυκόζη ονομάζεται γλυκογονογένεση και προωθείται από

την ινσουλίνη. Σε περίπτωση που ο οργανισμός απαιτεί πρόσληψη ενέργειας, το αποθηκευμένο γλυκογόνο διασπάται σε γλυκόζη, με τη βοήθεια της ορμόνης γλυκαγόνης, μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται γλυκογονόλυση. Κατά τη διάρκεια της σίτισης, που τα επίπεδα ινσουλίνης είναι υψηλά, το ήπαρ αναστέλλει τη *de novo* γλυκονογένεση και αυξάνει τη γλυκογονογένεση. Αντίθετα, κατά τη νηστεία, τα επίπεδα ινσουλίνης μειώνονται και η γλυκαγόνη προωθεί τη γλυκογονόλυση, που τελικά οδηγεί σε έξοδο γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος για να καλυφθούν οι ανάγκες του οργανισμού σε ενέργεια. Ουσιαστικά, η απόκριση του ήπατος στην αναλογία γλυκαγόνης- ινσουλίνης της κυκλοφορίας είναι αυτή που διατηρεί τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα σταθερή.^[4]

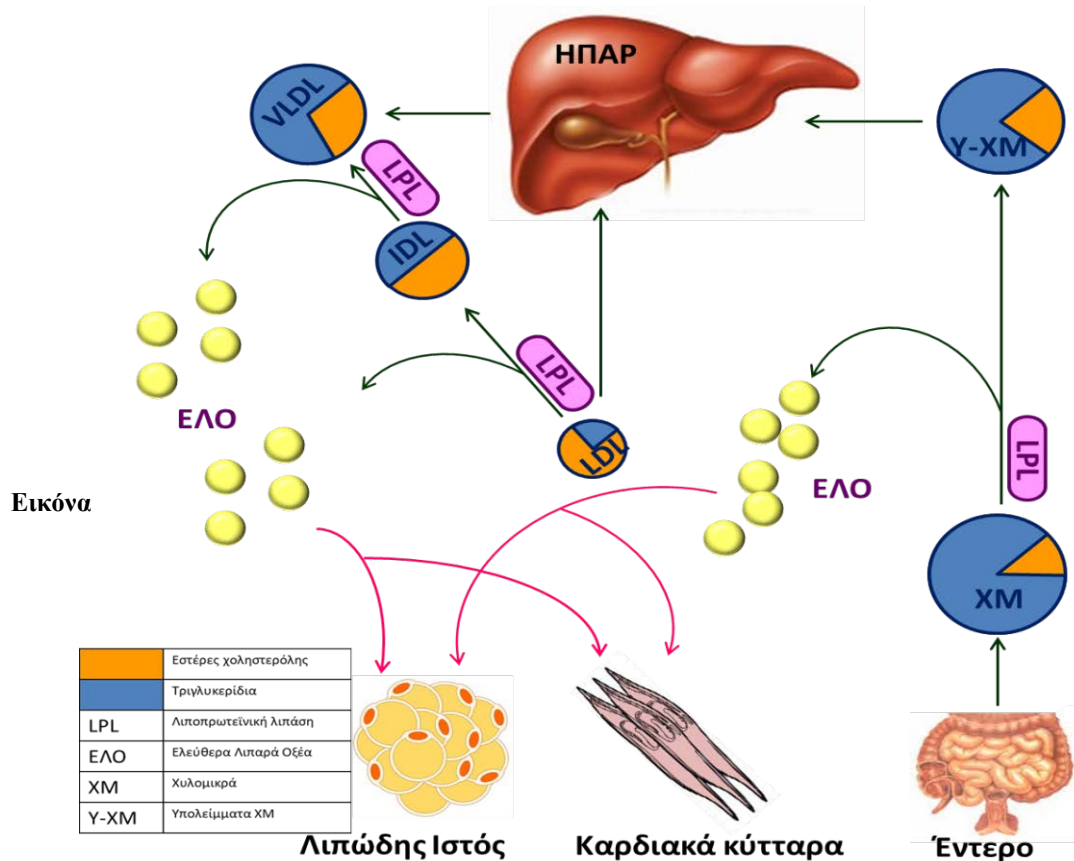
2. Ο μεταβολισμός των λιπιδίων και ο ρόλος του ήπατος στη ρύθμισή τους

Το ήπαρ είναι επίσης υπεύθυνο για το μεταβολισμό λιπιδίων και κυρίως την ομοιοστάση της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων. Η χοληστερόλη εκτός από διατροφικής προέλευσης, συντίθεται *de novo* στο ήπαρ και αποτελεί απαραίτητο μόριο στη διατήρηση της διαπερατότητας και της ρευστότητας της μεμβράνης, τη διαμόρφωση διαμεμβρανικών οδών σηματοδότησης, στη σύνθεση στεροειδών ορμονών, χολικών οξέων και βιταμίνης D.

Η ομοιοστάσή της ρυθμίζεται αποκλειστικά από το ήπαρ με τα ηπατοκύτταρα να παρουσιάζουν μεταβλητή έκφραση των υποδοχέων των λιποπρωτεϊνών που μεταφέρουν χοληστερόλη και έτσι να ρυθμίζουν την ποσότητα αυτής που θα μεταφερθεί στην κυκλοφορία του αίματος. Η έκκριση της χοληστερόλης από το ήπαρ στη κυκλοφορία του αίματος πραγματοποιείται μέσω των σωματιδίων χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (very low density lipoprotein-VLDL). Σημαντικό ρόλο στην ομοιοστάση της χοληστερόλης έχει και η ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης από εξωηπατικούς ιστούς στο ήπαρ με σκοπό την επεξεργασία και απέκκρισή της. Η μεταφορά αυτή πραγματοποιείται κυρίως από σωματίδια υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL) και βοηθά τα κύτταρα αυτών των ιστών να αποβάλλουν την περίσσεια χοληστερόλης.^[5]

Τα τριγλυκερίδια, αν και μπορούν δυνητικά να συντίθενται από όλα τα κύτταρα του σώματος, τρεις είναι οι κύριοι ιστοί προέλευσης των τριγλυκεριδίων της κυκλοφορίας: το λεπτό έντερο, ο λιπώδης ιστός και το ήπαρ, με το τελευταίο να κατέχει εξέχοντα ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού τους καθώς είναι υπεύθυνο για τη διακίνησή τους προς και από όλους τους περιφερειακούς ιστούς. Ο μεταβολισμός των τριγλυκεριδίων (Εικόνα 3)

συμβαίνει μέσω δύο κύριων οδών: **α)** του μονοπατιού των χυλομικρών και **β)** του μονοπατιού των VLDL που ρυθμίζεται από το ήπαρ.^[6]



Εικόνα 3: Ο

μεταβολισμός των τριγλυκεριδίων- Τα χυλομικρά δομούνται στο εσωτερικό των κυττάρων του άνω λεπτού εντέρου και αποδίδουν τα εξωγενώς (διατροφικά) προερχόμενα τριγλυκερίδια σε περιφερειακούς ιστούς. Τα σωματίδια VLDL εκκρίνονται στην κυκλοφορία του αίματος από το ήπαρ και περιέχουν ενδογενή τριγλυκερίδια που προέρχονται από τη λυσοσωμική διάσπαση άλλων πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών ή από de novo λιπογένεση στο ήπαρ. Τα τριγλυκερίδια τόσο των χυλομικρών όσο και των VLDL σωματιδίων υφίστανται φυσιολογικά ενδοαγγειακή υδρόλυση από την λιποπρωτεΐνη λιπάση, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων για χρήση τους είτε ως καύσιμα στους περιφερειακούς ιστούς (π.χ. μύες και καρδιά) είτε για αποθήκευση ενέργειας με τη μορφή λίπους (λιπώδης ιστός)

Πηγή: 11^η εργαστηριακή άσκηση XBA54- Προσδιορισμός των επιπέδων ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και ελεύθερων λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία του αίματος.

3. Ο μεταβολισμός των αμινοξέων και ο ρόλος του ήπατος στη ρύθμισή τους

Ο μεταβολισμός των αμινοξέων παρέχει ενέργεια στο ήπαρ. Η αλανίνη αντιπροσωπεύει περίπου το 50% της συνολικής ηπατικής πρόσληψης αμινοξέων και μάλιστα η πρόσληψη αλανίνης είναι τουλάχιστον ~ 3,5 φορές υψηλότερη από αυτή της γλουταμίνης για την υποστήριξη της οξείδωσης των μιτοχονδρίων κατά τη διάρκεια της νηστείας. Στο ήπαρ πραγματοποιείται, επίσης, σε μεγάλο ποσοστό, η παραγωγή των κυκλοφορούντων πρωτεϊνών, με την αλανίνη και τη γλουταμίνη να αποτελούν το 30-40% της σύστασης των πρωτεϊνών στο πλάσμα. Η αλβουμίνη είναι η πολυπληθέστερη πρωτεΐνη που συναντάμε στο πλάσμα του αίματος, η παραγωγή της αντιπροσωπεύει το 10% της συνολικής ηπατικής παραγωγής πρωτεϊνών και είναι σημαντική για τη διατήρηση του όγκου του αίματος.^[7]

1.2.2 Ο ρόλος του ήπατος σε άλλες φυσιολογικές λειτουργίες

Επιπλέον, το ήπαρ ρυθμίζει την *πήξη του αίματος*, αφού πολλοί παράγοντες πήξης συντίθενται στο ήπαρ, όπως το ινωδογόνο (παράγοντας πήξης I), η προθρομβίνη (παράγοντας πήξης II), αλλά και οι παράγοντες V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, η πρωτεΐνη C, η πρωτεΐνη S και η αντιθρομβίνη. Εξίσου σημαντική είναι και η συμβολή του στην αιμοποίηση μέσω της παραγωγής ερυθρών αιμοσφαιρίων. Στις πρώτες εβδομάδες μάλιστα της εμβρυικής ζωής, το ήπαρ έχει την αποκλειστική σύνθεση ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τέλος, η θρομβοποιητίνη είναι μία γλυκοπρωτεϊνική ορμόνη που παράγεται στο ήπαρ και συμβάλλει στη ρύθμιση παραγωγής αιμοπεταλίων, για την οποία είναι υπεύθυνος ο μυελός των οστών. Στο ήπαρ πραγματοποιείται και η παραγωγή μίας ορμόνης που ονομάζεται αγγειοτενσιογόνο και είναι ρυθμιστής της αρτηριακής πίεσης.^[8]

Εκτός, όμως, από *παραγωγή ορμονών*, στο ήπαρ λαμβάνει χώρα και *μεταβολισμός ορμονών*. Η ινσουλίνη που προαναφέρθηκε, αν και παράγεται αποκλειστικά από τα β-παγκρεατικά κύτταρα, διασπάται στο ήπαρ, όπως και η χολερυθρίνη, η οποία σχηματίζεται κατά την αποδόμηση της αιμοσφαιρίνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και απεκκρίνεται έπειτα στη χολή. Αναμενόμενα, ο μεταβολισμός πρωτεϊνών και αμινοξέων οδηγεί στον *κύκλο της ουρίας*, αφού παράγονται αζωτούχα απόβλητα, τα οποία πρέπει να αποβληθούν. Το ήπαρ είναι το μόνο όργανο που μπορεί από αμμωνία να παράγει ουρία.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η συμβολή της ηπατικής λειτουργίας στην άμυνα του οργανισμού, στην αντιμετώπιση λοιμώξεων και στην απομάκρυνση τοξικών ουσιών από το αίμα. Τα κύτταρα Kupffer είναι φαγοκύτταρα που αναλαμβάνουν συνεχώς να απομακρύνουν τα παθογόνα του αίματος που προέρχονται από το έντερο. Εκκρίνουν μια μεγάλη ποικιλία από κυτοκίνες και χημειοκίνες, με τις τελευταίες να συμμετέχουν στη στρατολόγηση λευκοκυττάρων σε περιοχές που παρουσιάζεται φλεγμονή.^[9] Ακόμα, μπορούν να αφαιρέσουν τα κατεστραμμένα ερυθροκύτταρα, αφού εκφράζουν κατάλληλους υποδοχείς Fc. Μακροφάγα που προέρχονται από μονοκύτταρα συναντώνται στο υγιές ήπαρ στην πυλαία τριάδα, όπου συνεισφέρουν στον μεταβολισμό του σιδήρου και της χοληστερόλης.^[10]

1.3 Αίτια ηπατικής δυσλειτουργίας

Η διατήρηση του ήπατος σε υγιή κατάσταση είναι καθοριστική για πολλές λειτουργίες του οργανισμού, όπως είδαμε παραπάνω. Η ηπατική βλάβη και η επαγόμενη ηπατική δυσλειτουργία συνδέονται με κλινικές καταστάσεις που επιφέρουν, σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία, το θάνατο σε 2.000.000 ανθρώπων ετησίως, σε παγκόσμιο επίπεδο, αριθμός που αντιστοιχεί στο 3,5% επί του συνολικού αριθμού θανάτων. Στην Ευρώπη οι θάνατοι που οφείλονται σε ηπατικές ασθένειες ετησίως αντιστοιχούν σε 151.513, με την κατανομή τους ανά χώρα να παρουσιάζει μεγάλες αποκλίσεις.^[11]

Οι παράγοντες που ευθύνονται για τη δυσλειτουργία του ήπατος είναι τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς. Στους ενδογενείς, περιλαμβάνονται **α)** γενετικές διαταραχές που προκαλούν βλάβες στο ήπαρ, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη νόσο Wilson, **β)** αυτοάνοσα νοσήματα που μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε ηπατική δυσλειτουργία, ακόμα και αυτοάνοση ηπατίτιδα και **γ)** υπάρχουν και άλλες επιβαρυντικές ασθένειες, που αν και δεν πηγάζουν από το ήπαρ επιδρούν αρνητικά σε αυτό. Τέτοια περίπτωση αποτελεί ο διαβήτης τύπου 2. Στους εξωγενείς παράγοντες περιλαμβάνεται η κατανάλωση αλκοόλ, ο σύγχρονος τρόπος διατροφής, η παχυσαρκία, η κατανάλωση ορισμένων φαρμάκων, ακόμα και το κάπνισμα. Επιπλέον, από τις κυριότερες αιτίες πρόκλησης ηπατικής βλάβης είναι οι ιογενείς ηπατίτιδες.

Σχετικά με τους εξωγενείς παράγοντες, η κατανάλωση αλκοόλ συνδέεται άμεσα με την εμφάνιση ηπατικών ασθενειών και ακόμα και αν δεν αποτελέσει πρωτογενή πηγή παθολογικής κατάστασης στο ήπαρ, συμβάλλει αρνητικά στην εξέλιξη μιας τέτοιας της κατάστασης. Καθώς τα ηπατοκύτταρα είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό της αιθανόλης, η παρουσία υπερβολικής ποσότητας αλκοόλης προκαλεί τραυματισμό των ιστών μέσω συσσώρευσης ακεταλδεϋδης και του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και οξειδωτικής πίεσης. Πέρα από τον τραυματισμό του ήπατος, προκύπτει και διαταραχή συνολικά στον ηπατικό μεταβολισμό. Μάλιστα, στα άτομα με δείκτη μάζας σώματος μεγαλύτερο από 35 kg/m² η ηπατοτοξικότητα από την κατανάλωση αλκοόλης διπλασιάζεται.^[12] Στην Ευρώπη συναντώνται τα υψηλότερα επίπεδα κατανάλωσης αλκοόλ ανά άτομο, ενώ το 50% των θανάτων λόγω κίρρωσης του ήπατος οφείλεται στην κατανάλωση αλκοόλ.

Οι διατροφικές διαταραχές είναι ένας σημαντικός παράγοντας δυσλειτουργίας του ήπατος, ενώ τόσο η ποσότητα, όσο και η ποιότητα φαγητού επηρεάζουν εξίσου την υγεία αυτού του οργάνου. Η παχυσαρκία είναι χαρακτηριστικό του σύγχρονου δυτικού κόσμου και ευθύνεται για πολλές ασθένειες που σχετίζονται με το καρδιαγγειακό σύστημα. Το ήπαρ δεν θα μπορούσε να μένει ανεπηρέαστο από αυτές τις συνθήκες, ειδικά όταν η παχυσαρκία συνυπάρχει μαζί με αντίσταση στην ινσουλίνη, όπως συμβαίνει συχνά στα παχύσαρκα άτομα. Αυτές οι δύο συνθήκες οδηγούν σε αυξημένη ροή ελεύθερων λιπαρών οξέων προς το ήπαρ, όπου ενισχύεται η *de novo* λιπογένεση και τελικά το ήπαρ καταλήγει να συσσωρεύει ποσότητα τριγλυκεριδίων μεγαλύτερη από το φυσιολογικό. Τα αυξημένα επίπεδα λιπαρών οξέων, ελεύθερης χοληστερόλης και άλλων λιπιδικών μεταβολιτών προκαλούν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία με οξειδωτική πίεση και ηπατική φλεγμονή. Η πιο συχνή ηπατική ασθένεια που σχετίζεται με τη παχυσαρκία είναι η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NALFD) με επιπολασμό 25.2% στον παγκόσμιο πληθυσμό. Εξίσου βλαβερός είναι ο υποσιτισμός και η χρόνια ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών και πρωτεΐνης, τα οποία προκαλούν σοβαρή ηπατική δυσλειτουργία, ακόμα και ηπατομεγαλία ή λιπώδες ήπαρ. Σε πιο παθολογικές καταστάσεις, όπως η νευρική ανορεξία, παρατηρούνται, επιπλέον, ενδοκρινολογικές ανωμαλίες που συνδέονται με ανάπτυξη χρόνιας ηπατικής νόσου. Σε κάποιες περιπτώσεις η ηπατική δυσλειτουργία είναι αναστρέψιμη, ιδιαίτερα όταν ο παράγοντας που την προκαλεί αντιμετωπιστεί εγκαίρως.^[13]

Η λήψη φαρμάκων έχει κάποιες φορές έχει ως παρενέργεια την αύξηση των ηπατικών ενζύμων και σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει σε ηπατική ανεπάρκεια. Ακόμα

και συμπληρώματα διατροφής, φυτικά σκευάσματα και φάρμακα ευρείας χρήσης μπορούν να προκαλέσουν ηπατική βλάβη και σχετίζονται με ηπατοτοξικότητα. Καθώς το ήπαρ είναι το υπεύθυνο όργανο για το μεταβολισμό και την απόρριψη ουσιών, οι φαρμακευτικές ουσίες που εισβάλλουν σε αυτό μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, ακολουθούν μία διαδικασία επεξεργασίας από τα ηπατοκύτταρα και μεταβολίζονται από κατάλληλα ένζυμα. Η απέκκριση των ουσιών και των μεταβολιτών τους γίνεται από τα ηπατοκύτταρα στη χολή ή στους νεφρούς. Η ηπατική βλάβη, που προκαλείται από φάρμακα (Drug-Induced Liver Injury- DILI), έχει διαβάθμιση ανάλογα με την ποσότητα του φαρμάκου που λαμβάνεται και είναι εμφανής μερικές ώρες ή μέρες μετά τη λήψη του φαρμάκου.^[14]

Ιδιαίτερα επιβαρυντικό περιβάλλον για την υγεία του ήπατος δημιουργεί ο ιός της ηπατίτιδας, καθώς η λοίμωξη από τον ιό προκαλεί φλεγμονή στο ήπαρ και σε ένα σημαντικό αριθμό ασθενών οδηγεί σε χρόνια ηπατίτιδα, κίρρωση, ακόμα και καρκίνο του ήπατος. Στον παγκόσμιο πληθυσμό, οι θάνατοι που οφείλονται σε ιογενή κίρρωση και ηπατοκαρκίνωμα είναι περίπου 1.400.000 ετησίως. Υπάρχουν οι εξής πέντε τύποι του ιού της ηπατίτιδας: ο ιός της ηπατίτιδας Α (HAV), ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV), ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV), ο ιός της ηπατίτιδας D (HDV) και ο ιός της ηπατίτιδας Ε (HEV). Η μετάδοση των HAV και HEV συναντάται κυρίως σε χώρες του αναπτυσσόμενου κόσμου και σχετίζεται με τις κακές συνθήκες υγιεινής, την κατανάλωση μολυσμένων τροφών και νερού. Αυτοί οι δύο τύποι σπάνια οδηγούν σε χρόνια ηπατίτιδα και περαιτέρω επιπλοκές. Αντίθετα, οι HBV και HCV είναι υπεύθυνοι για το θάνατο περίπου 1.200.000 ανθρώπων κάθε χρόνο παγκοσμίως, εκ των οποίων οι 780.000 θάνατοι αφορούν σε ασθένειες προερχόμενες από τον HBV, ενώ οι υπόλοιπες σχετίζονται με τον HCV. Μάλιστα, λόγω των πολλών πιθανών τρόπων μετάδοσης του HBV- μπορεί να μεταδοθεί μέσω της σεξουαλικής επαφής, του αίματος και των άλλων σωματικών υγρών με μικρότερες πιθανότητες- το 1/3 του παγκόσμιο πληθυσμού έχει μολυνθεί κάποια στιγμή στη ζωή του από HBV, ενώ το 25% αυτών παραμένουν χρόνια ασθενείς, σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία. Ο HCV μεταδίδεται κυρίως με το αίμα, ωστόσο και οι δύο ιοί μεταφέρονται περιγεννητικά. Τέλος, ο HDV εμφανίζεται συνδυαστικά με τον HBV, είτε ο ασθενής μολυνθεί ταυτόχρονα και από τους δύο ιούς, είτε ο HDV εμφανιστεί σαν διαδοχική λοίμωξη σε φορείς του HBV. Εκτενής αναφορά στις ασθένειες που προκαλούν οι ιοί της ηπατίτιδας θα γίνει σε επόμενο κεφάλαιο.^[15]

2. Στόχος

Ένα υγιές ήπαρ είναι η βάση ενός υγιούς οργανισμού. Οι δυσλειτουργίες του ήπατος και ιδιαίτερα οι χρόνιες ασθένειες, οδηγούν πολλές φορές σε επιπλοκές, όπως η κίρρωση ή/και το ηπατοκαρκίνωμα και αποτελούν την έβδομη αιτία θανάτου στον παγκόσμιο πληθυσμό. Η έγκαιρη και έγκυρη ανίχνευση, λοιπόν, των αιτιών που προκαλούν την ηπατική δυσλειτουργία, καθώς και η πρόγνωση, διάγνωση και θεραπευτική παρακολούθηση των ηπατικών νόσων είναι εξαιρετικής σημασίας για τον ασθενή. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ευρέως μέχρι σήμερα για τη διερεύνηση της ηπατικής δυσλειτουργίας είναι οι απεικονιστικές, με χρήση υπερήχων και αξονικής ή μαγνητικής τομογραφίας, οι εργαστηριακές για τον προσδιορισμό των επιπέδων ηπατικών ενζύμων (π.χ τρανσαμινασών, χολοστατικών ενζύμων κ.α.) και συχνά γίνεται χρήση επεμβατικών μεθόδων, όπως η λήψη ηπατικού ιστού για βιοψία. Η ανάγκη για ανάδυση πιο σύγχρονων και κυρίως, μη επεμβατικών μεθόδων προσδιορισμού της ηπατικής λειτουργίας είναι επιτακτική. Στόχος της παρούσας ΜΔΕ είναι η διερεύνηση τέτοιων πιθανών βιοδεικτών στη δεξαμενή των μη κωδικοποιητικών RNA, με έμφαση εκείνα που μπορούν να προσδιοριστούν μη επεμβατικά στη κυκλοφορία του αίματος.

3. Ηπατικές νόσοι

Οι νόσοι που σχετίζονται με το ήπαρ είναι πολυάριθμες και με πολλές διαφορετικές πηγές προέλευσης, όπως αναφέρεται σε προηγούμενο κεφάλαιο. Οι μοριακοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται για κάθε νόσο ποικίλλουν, παρατηρούνται όμως αρκετές ομοιότητες στον τρόπο που το ήπαρ διαχειρίζεται την επαγόμενη βλάβη. Κάποιες καταστάσεις είναι αναστρέψιμες, ενώ άλλες οδηγούν σε χρόνιες καταστάσεις. Σε πολλές περιπτώσεις, η έγκαιρη παρέμβαση εξασφαλίζει την επιβίωση του ασθενούς, είτε μέσω της πλήρους θεραπείας και αποκατάστασης ή επιβραδύνοντας την εξέλιξη της νόσου. Η διάγνωση των περισσότερων ηπατικών νόσων γίνεται όταν, πλέον, η νόσος έχει αφήσει ισχυρό αποτύπωμα στον οργανισμό και τη δομή του ήπατος και ως εκ τούτου, μέχρι την έναρξη της όποιας πιθανής θεραπείας, έχει χαθεί πολύτιμος χρόνος.

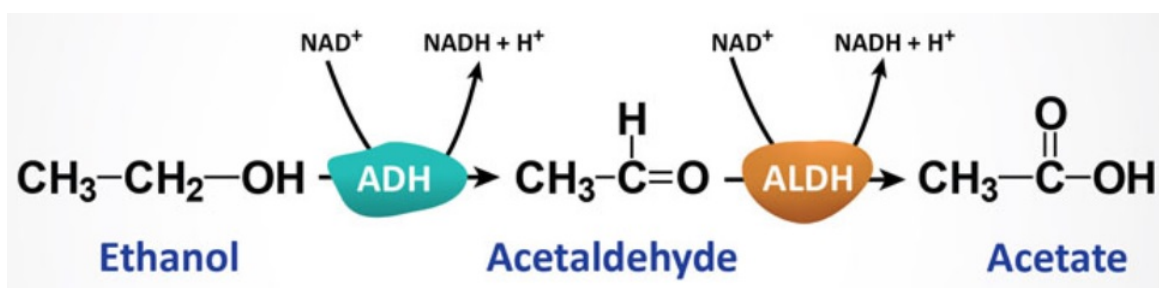
Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται πολλές δεκάδες ασθένειες του ήπατος, όπως οι ηπατικές νόσοι που προκαλούνται από τοξικότητα των φαρμάκων στο ήπαρ (DILI) ή κάποια σύνδρομα που σχετίζονται με γενετικές μεταλλάξεις. Παρακάτω αναλύονται οι βασικότερες νόσοι, των οποίων οι βιοδείκτες είναι και το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

3.1 Αλκοολικές ηπατικές νόσοι (ALD)

Η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ ευθύνεται για ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα και η ηπατική βλάβη. Σε παγκόσμια κλίμακα, η ALD ευθύνεται για το 4% της θνησιμότητας, στην Ευρωπαϊκή Ένωση, το 41% της θνησιμότητας που σχετίζεται με το ήπαρ αποδίδεται στο αλκοόλ, ενώ στις ΗΠΑ ο επιπολασμός της ALD είναι περίπου 2% στον γενικό πληθυσμό.^[16]

Η αιθανόλη είναι ένα μικρό μόριο που διαπερνά εύκολα την κυτταρική μεμβράνη, οπότε μπορεί να διεγείρει τα κύτταρα Kupffer, να αυξήσει την οξειδωτική πίεση και να επηρεάσει τα επίπεδα σιδήρου. Ο μεταβολισμός της πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο από τα ηπατοκύτταρα και σε μικρότερο ποσοστό από τα κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου και από εντερικά βακτήρια, ενώ ένα μικρό μέρος της αποβάλλεται απευθείας από τους νεφρούς, τους πνεύμονες και τον ιδρώτα.^[17]

Στο ήπαρ, ο μεταβολισμός της αιθανόλης λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 4. Προηγείται ο μεταβολισμός της αιθανόλης μέσω του ενζύμου αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) στα μιτοχόνδρια των ηπατοκυττάρων. Η οξείδωση της αιθανόλης οδηγεί στην παραγωγή ακεταλδεΐδης και στη μετατροπή του συνένζυμου NAD^+ σε NADH . Ακολουθεί η περαιτέρω οξείδωση της ακεταλδεΐδης, που οδηγεί σε παραγωγή οξικού οξέος, μέσω της αδεϋδικής αφυδρογονάσης (ALDH) και απελευθερώνεται ξανά NADH . Όταν διαταράσσεται η αναλογία NAD^+/NADH επηρεάζεται και η υγιής δραστηριότητα του κυττάρου και προκαλείται μείωση στην παραγωγή ATP, δηλαδή στην παραγωγή ενέργειας.^[18]



Εικόνα 4: Ο μεταβολισμός της αιθανόλης- Η αιθανόλη οξειδώνεται μέσω του ενζύμου αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) και παράγεται ακεταλδεΐδη, η οποία με τη σειρά της οξειδώνεται μέσω της αδεϋδικής αφυδρογονάσης (ALDH) και παράγεται οξικό οξύ.

Πηγή: <https://themedicalbiochemistrypage.org/ethanol-alcohol-metabolism-acute-and-chronic-toxicities/>

Ακόμα ένα ένζυμο που συμμετέχει στο μεταβολισμό της αιθανόλης είναι η καταλάση, η οποία μετατρέπει την περίσσεια υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό. Τέλος, το μικροσωμικό ένζυμο P450-2E1 (ή και CYP2E1) είναι παρόν κυρίως σε συνθήκες υψηλής κατανάλωσης αλκοόλ και συμβάλλει επίσης στη μετατροπή της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη. Επιπλέον, παράγει δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως ανιόντα υπεροξειδίου, ρίζες υδροξυλίου, κ.α. Κύριες πηγές παραγωγής ROS είναι τα μιτοχόνδρια μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας, τα κύτταρα Kupffer μέσω παραγωγής του NADH και το ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω της δράσης των CYP2E1.^[29] Η παραγωγή ROS ενισχύεται από την παρουσία περίσσειας NADH και από την αυξημένη συγκέντρωση ακεταλδεΐδης.^[19,20]

Η περίσσεια ακεταλδεϋδης συνδέεται ομοιοπολικά με τους μικροσωληνίσκους των κυττάρων, με αποτέλεσμα να παραμένουν εντός του κυττάρου πρωτεΐνες που θα έπρεπε να εξέρχονται από αυτό. Σαν συνέπεια, τα ηπατοκύτταρα οδηγούνται σε διόγκωση. Επίσης, η ακεταλδεϋδη μεταβάλλει τον εντερικό φραγμό και προωθεί τη μετατόπιση των λιποπολυσακχαριτών (LPS) από το παχύ έντερο στο ήπαρ. Οι παραπάνω διεργασίες οδηγούν στην ανάπτυξη της Αλκοολικής Ηπατικής Νόσου (ALD), η οποία χωρίζεται σε τρεις τύπους, ανάλογα με το στάδιο της ηπατικής βλάβης:

3.1.1 Λιπώδες ήπαρ/ Στεάτωση

Η στεάτωση παρατηρείται στο 90% των ατόμων που καταναλώνουν υπερβολική ποσότητα αλκοόλ. Πρόκειται για πρώιμη ιστοπαθολογική εκδήλωση της ALD, για αυτό σπάνια παρατηρούνται κλινικά συμπτώματα στους ασθενείς και είναι αναστρέψιμη, εφόσον αντιμετωπιστεί άμεσα. Μεταξύ των ασθενών με στεάτωση, περίπου το 35% εξελίσσεται σε στεατοηπατίτιδα και το 5-10% θα οδηγηθεί σε αλκοολική κίρρωση.

Η στεάτωση προκαλείται από τη συσσώρευση ηπατικών λίπους που προκύπτει από τις διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων, κατά τη χρόνια κατανάλωση αλκοόλ. Πολλοί μηχανισμοί αυξάνουν τη λιπογένεση και μειώνουν την εξαγωγή λιπαρών οξέων από το ήπαρ. Η χρόνια χρήση αλκοόλ ενισχύει τη διάσπαση του λιπώδους ιστού και τη λιπόλυση, απελευθερώνοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία εστεροποιούνται στα ηπατοκύτταρα σε τριγλυκερίδια. Επιπλέον, η χρόνια κατανάλωση αλκοόλ συνδέεται με αυξημένη έκφραση των μεταφορέων ηπατικών λιπαρών οξέων (π.χ. FATP) και ως εκ τούτου, αυξημένη πρόσληψη εξωγενών λιπαρών οξέων από το ήπαρ. Εκτός από τα εξωγενή λιπαρά οξέα που μπορεί να εισέλθουν στο ήπαρ, η φυσιολογική λειτουργία του ήπατος περιλαμβάνει τη σύνθεση λιπαρών οξέων από σάκχαρα και πρωτεΐνες.^[21] Οι φωσφατιδυλοφωσφατάσες (PAPs) και οι ακυλοτρανσφεράσες είναι ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση γλυκερολιπιδίων, τα οποία συμβάλλουν περαιτέρω στην παραγωγή τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων. Η κατανάλωση αλκοόλ επηρεάζει πολλούς από τους ρυθμιστικούς παράγοντες αυτών των ενζύμων, με συνέπεια τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ. Αυξημένη λιπογένεση παρατηρείται όταν ενισχύεται η ηπατική έκφραση της πρωτεΐνης-1c που δεσμεύει το ρυθμιστικό στοιχείο της στερόλης (SREBP1c), ενός μεταγραφικού παράγοντα που διεγείρει την έκφραση λιπογονικών

γονιδίων. Ακόμα, η συσσώρευση λιπιδίων οφείλεται σε μειωμένη εξαγωγή των λιπιδίων από το ήπαρ, καθώς το αλκοόλ μειώνει την έκκριση των VLDL, που είναι υπεύθυνα για αυτή τη διαδικασία. Το αλκοόλ φαίνεται, επίσης, να απενεργοποιεί- άμεσα ή έμμεσα μέσω της οξειδωτικής πίεσης- τον υποδοχέα ενεργοποιημένου PPAR-α, που ρυθμίζει την ελάττωση στην έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στη μεταφορά και την οξείδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Ο υποδοχέας PPAR-α, εφόσον απενεργοποιηθεί, οδηγεί σε μειωμένη ηπατική λιπόλυση.^[22]

3.1.2 Αλκοολική στεατοηπατίτιδα/ Αλκοολική ηπατίτιδα

Πρόκειται για φλεγμονή στο ήπαρ και ουσιαστικά αποτελεί την έναρξη της ίνωσης του ήπατος. Η ακεταλδεϋδη και το LPS διεγείρουν τα κύτταρα Kupffer στο ήπαρ, με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται ROS και προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Έτσι, τα κύτταρα Kupffer προκαλούν ηπατοτοξικότητα, είτε διεγερθούν απευθείας από την αιθανόλη ή έμμεσα από την αυξημένη συγκέντρωση του LPS. Ως αποτέλεσμα προκαλείται αλκοολική στεατοηπατίτιδα, η οποία ιστολογικά χαρακτηρίζεται από στεάτωση, διόγκωση των ηπατοκυττάρων και διηθήσεις από πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα. Η αλκοολική στεατοηπατίτιδα σχετίζεται σταθερά εδώ και δεκαετίες με υψηλή βραχυπρόθεσμη θνησιμότητα. Εφόσον η φλεγμονή είναι οξεία και η κατάσταση χρόνια, το ήπαρ οδηγείται σε σοβαρή αλκοολική ηπατίτιδα, με εμφανή συμπτώματα στους ασθενείς, όπως ηπατομεγαλία, ασκίτης και ίκτερος.

3.1.3 Αλκοολική κίρρωση

Είναι το σοβαρότερο στάδιο της ηπατικής βλάβης, καθώς έχει επέλθει διάχυτη νέκρωση των ηπατοκυττάρων και έχει δημιουργηθεί ουλώδης ιστός. Σταδιακά, το ήπαρ οδηγείται σε απώλεια της λειτουργίας, μία κατάσταση που είναι πλέον μη αναστρέψιμη και συχνά οδηγεί στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Το 2010, σχεδόν μισό εκατομμύριο θάνατοι στην Ευρώπη οφείλονταν σε κίρρωση που σχετίζεται με το αλκοόλ.^[23,24]

Καμία από τις αλκοολικές ηπατικές νόσους δεν είναι κληρονομήσιμη. Υπάρχουν όμως στοιχεία που αποδεικνύουν ότι κάποιοι κληρονομικοί γενετικοί παράγοντες λειτουργούν επιβαρυντικά στην εμφάνιση και εξέλιξη αυτών των ηπατικών νόσων. Η πιο γνωστή μη

συνώνυμη γενετική παραλλαγή στο γονίδιο PNPLA3, που κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη με δράση λιπάσης, η οποία σχετίζεται με την αναδιαμόρφωση των φωσφολιπιδίων, συνδέεται με αυξημένο ηπατικό λίπος και έχει αναδειχθεί ως κύριος παράγοντας κινδύνου για την εξέλιξη της χρόνιας ηπατικής νόσου. Άλλη μία παραλλαγή στο γονίδιο TM6SF2, που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη της μεμβράνης του συμπλέγματος Golgi καθώς και στο MBOAT7, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη LPI ακυλοτρανσφεράση 1 (LPIAT1), φαίνεται να αυξάνει την ευαισθησία απέναντι στη χρόνια παρουσία των νόσων. Η πρώτη σχετίζεται με την έκκριση λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας και η δεύτερη εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση της φωσφολιπιδικής ακυλικής αλυσίδας, ενσωματώνοντας αραχιδονικό οξύ (AA) και άλλα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) στο LPI και άλλα λυσοφωσφολιπίδια, άρα η μειωμένη έκφραση των γονιδίων τους λειτουργεί επιβαρυντικά. Άλλοι επιβαρυντικοί παράγοντες είναι η φυλετική καταγωγή, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τους ανατολικούς Ασιάτες που έχουν γενετική έλλειψη στην ηπατική ALDH2, η οποία κατά την κατανάλωση αλκοόλ προκαλεί αυξημένα επίπεδα ακεταλδεϋδης στο αίμα, το φύλο, με τις γυναίκες να είναι περισσότερο από δύο φορές πιο ευάλωτες στις ηπατοτοξικές επιδράσεις του αλκοόλ σε σχέση με τους άντρες, οι διατροφικές συνήθειες και η παχυσαρκία.^[25]

Η διάγνωση των αλκοολικών νόσων πραγματοποιείται μέσω μεθόδων απεικόνισης, με την χρήση υπερήχων να είναι η πιο διαδεδομένη και μέσω παρατήρησης κάποιων χαρακτηριστικών βιοδεικτών. Η ελαστογραφία έχει κερδίσει έδαφος καθώς παρέχει μέτρηση της ηπατικής ακαμψίας (LSM). Χαρακτηριστικοί αιματολογικοί βιοδείκτες είναι η ασπαρτική ή οξαλοξική αμινοτρανσφεράση (AST ή SGOT) και η αλανινική ή πυροσταφυλική αμινοτρανσφεράση (ALT ή SGPT), γνωστές και ως τρανσαμινάσες. Ο λόγος τους AST/ALT στο 70% των ασθενών με ALD είναι μεγαλύτερος από 1,5-2, αφού τα επίπεδα της AST είναι τυπικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα της ALT. Άλλοι σημαντικοί βιοδείκτες είναι η α2-μακροσφαιρίνη, η απολιποπρωτεΐνη Apo1, η ολική χολερυθρίνη, η απτοσφαιρίνη και η γ-γλουταμυλ-τρανσφεράση (γ-GT). Η γ-GT είναι δείκτης ενζύμων που απελευθερώνονται από τα ηπατοκύτταρα και συμμετέχουν στη μεταφορά αμινοξέων μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και μαζί με την αλκαλική φωσφατάση (ALP) αποτελούν τα χολοστατικά ένζυμα. Επιπλέον, μετράται η αλβουμίνη και ο χρόνος προθρομβίνης. Στο εμπόριο υπάρχουν τεστ που συνδυάζουν κάποιους από τους παραπάνω βιοδείκτες του ορού του αίματος συνεκτιμώντας τους για να

προσδιορίζεται το στάδιο της ηπατικής ίνωσης, συμπεριλαμβανομένου του υαλουρονικού οξέος, του N-τερματικό προπεπτίδιο για το κολλαγόνο τύπου III (PIIINP) και του αναστολέα της μεταλλοπρωτεΐνωσης-1 (TIMP-1). Σύγχρονοι δείκτες με υψηλότερη ευαισθησία συγκριτικά με τις αμινοτρανσφεράσες στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο είναι τα θραύσματα κυτοκερατίνης 18 (M30) και M65.^[26,27]

3.2 Μη αλκοολικές ηπατικές νόσοι (NALD)

Σε αντίθεση με τις αλκοολικές ηπατικές νόσους, οι μη αλκοολικές ηπατικές νόσοι δεν έχουν ξεκάθαρη αιτία προέλευσης. Τα στάδια της εξέλιξής τους όμως είναι ίδια και μπορεί να οδηγήσουν σε στεάτωση, κίρρωση ακόμα και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Οι κυριότερες μορφές των μη αλκοολικών νόσων είναι: η Μη-αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) και η Μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH).

3.2.1 Μη-αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD)

Χαρακτηρίζεται από πληθώρα ηπατικών διαταραχών που προκαλούνται από μεταβολή στους ομοιοστατικούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν την ποσότητα λίπους στο ήπαρ. Η NAFLD προκύπτει από συσσώρευση λίπους (ηπατική στεάτωση) σε περισσότερο από το 5% των ηπατοκυττάρων, κυρίως με τη μορφή τριγλυκεριδίων. Η συσσώρευση περίσσειας ηπατικών λιπιδίων οδηγεί σε αυξημένη έκκριση ηπατοκινών, μειωμένη σύνθεση γλυκογόνου και αυξημένη γλυκονεογένεση, και αναστολή της σηματοδότησης της ινσουλίνης. Τα παραπάνω έχουν σαν συνέπεια την εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη και τη χρόνια φλεγμονή αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης ίνωσης, κίρρωσης και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

Η NAFLD, λοιπόν, είναι μια πολυσυστηματική ασθένεια και θεωρείται η έκφραση του μεταβολικού συνδρόμου (MetS) στο ήπαρ. Το MetS χαρακτηρίζεται από παχυσαρκία, υπερχοληστερολαιμία, υπερτριγλυκεριδαιμία και υπέρταση.^[28] Η παρουσία NAFLD συνοδεύεται από σακχαρώδη διαβήτη τύπου II στο 70% των ασθενών, συνδέεται με χρόνια νεφρική νόσο και καρδιαγγειακές παθήσεις. Ο επιπολασμός της NAFLD παγκοσμίως είναι περίπου 30–40% στους άνδρες και 15–20% στις γυναίκες και είναι

ακόμη υψηλότερο σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, τα οποία έχουν διπλάσιες πιθανότητες να εμφανίσουν ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Οι λόγοι που η νόσος εκδηλώνεται συχνότερα στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες δεν είναι απολύτως σαφείς.^[29,30]

Η παχυσαρκία είναι ένας ιδιαίτερα επιβαρυντικός παράγοντας στην ανάπτυξη ηπατικής στεάτωσης, όμως ακόμα και η δυσλειτουργία του λιπώδους ιστού, ανεξάρτητα από την παχυσαρκία, συμβάλλει στην παθογένεση της NAFLD. Η κατανάλωση αλκοόλ σε συνδυασμό με τη NAFLD είναι συχνή και μπορεί να οδηγήσει στο «σύνδρομο μεταβολικής και αλκοολικής στεατοηπατίτιδας» (SMASH).^[31] Στους παράγοντες κινδύνου συγκαταλέγονται και η ηλικία, με τους ανθρώπους άνω των 50 ετών να κινδυνεύουν περισσότερο, η αντίσταση στην ινσουλίνη και τα αυξημένα επίπεδα φερριτίνης. Επιπλέον, το ένζυμο CYP2E1, που αναφέρθηκε στις αλκοολικές νόσους ως επαγόμενο από την διάσπαση της αιθανόλης, προάγει και στις μη- αλκοολικές νόσους την παραγωγή ROS. Η προέλευσή του, σε αυτή την περίπτωση, είναι τα διατροφικά λιπαρά και συμβάλλει στην εξέλιξη της στεάτωσης του ήπατος σε ίνωση.^[32]

Όπως και στις αλκοολικές νόσους, δεν έχει επιβεβαιωθεί κληρονομικός παράγοντας που να προκαλεί τη NAFLD, έχει παρατηρηθεί όμως ότι το 50% των ασθενών με NAFLD φέρει τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο παραλλαγής στο γονίδιο PNPLA3, με την παραλλαγή I148M να αναστέλλει την ενδοηπατοκυτταρική λιπόλυση. Η στεάτωση στη NAFLD που σχετίζεται με το PNPLA3 δεν συνοδεύεται από φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μεταβολικού συνδρόμου.^[33]

Στην κλινική πράξη, η αρχική διάγνωση της NAFLD συνήθως πραγματοποιείται με χρήση υπερήχων, εφόσον έχει παρατηρηθεί συσώρευση ηπατικού λίπους και έχουν αποκλειστεί άλλοι παράγοντες εμφάνισής τους, όπως αλκοόλ, χρήση φαρμάκων, κλπ. Στις αιματολογικές εξετάσεις, οι βιοδείκτες που αξιολογούνται είναι όμοιοι με εκείνους της ALD.

3.2.2 Μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH)

Περιγράφει τη φλεγμονώδη κατάσταση του ήπατος που έπεται της απλής στεάτωσης σε ποσοστό 30–40% των ασθενών με NAFLD. Τα αστερικά κύτταρα του ήπατος, σε μια προσπάθεια αναγέννησης του κατεστραμμένου ιστού, θα ενεργοποιηθούν και θα

απελευθερώσουν κολλαγόνο τύπου I, οδηγώντας το 40–50% των ασθενών με NASH προς ίνωση και περίπου το 20% σε κίρρωση με τις εμφανείς κλινικές τους συνέπειες. Στις ΗΠΑ η NASH είναι η κυριότερη αιτία μεταμόσχευσης ήπατος.^[34]

Η διάγνωση της NASH γίνεται επεμβατικά με βιοψία και ιστολογική εξέταση. Ενδείξεις θεωρούνται: η ηπατική στεάτωση μεγαλύτερη από 5%, η διόγκωση των ηπατοκυττάρων και φλεγμονή στους ηπατικούς λοβίους. Οι αιμοτολογικοί βιοδείκτες είναι δύσκολο να διαχωρίσουν την NASH από τη NAFLD. Η αμινοτρανσφεράση ALT έχει μόνο 72% ευαισθησία και 51% ειδικότητα για τη διάγνωση της NASH. Ευρέως επικυρωμένος βιοδείκτης για το NASH είναι η κυτοκερατίνη 18 (CK-18), ένας δείκτης της απόπτωσης των ηπατοκυττάρων.^[35]

3.3 Ιογενής ηπατίτιδα

Η φλεγμονή του ήπατος, προερχόμενη από ιούς ή από ουσίες τοξικές για το ήπαρ, ονομάζεται ηπατίτιδα και άλλοτε χαρακτηρίζεται από χρονιότητα, ενώ άλλες φορές είναι προσωρινή και αναστρέψιμη. Υπάρχουν οι ιοί της ηπατίτιδας A, B, C, D και E, που προσβάλλουν αποκλειστικά το ήπαρ καθώς και ιοί, που προσβάλλουν κι άλλα όργανα, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος. Τέτοιοι ιοί είναι ο κυτταρομεγαλοϊός CMV και ο ιός Epstein- Barr.

3.3.1 Ηπατίτιδα Α (HAV)

Ο ιός της ηπατίτιδας Α (HAV) είναι ένα μονόκλωνο μόριο ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) που μεταδίδεται μέσω της στοματικής οδού και των κοπράνων, είτε από μολυσμένη τροφή και νερό ή από άτομο σε άτομο. Ο ιός επιβιώνει του στομαχικού υγρού και καταλήγει στο λεπτό έντερο. Αφού διαπεράσει το βλεννογόνο στα τοιχώματα του λεπτού εντέρου, μεταφέρεται μέσω της πυλαίας φλέβας στο ήπαρ, όπου και πολλαπλασιάζεται. Έπειτα μέσω των χοληφόρων πόρων επιστρέφει στο λεπτό έντερο και αποβάλλεται στα κόπρανα ολοκληρώνοντας έτσι τον γνωστό ως «εντεροηπατικό κύκλο». Στη διάρκεια αυτού του κύκλου ενεργοποιούνται τα αντιγόνα των λεμφοκυττάρων και καταστρέφουν τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα.

Σε παγκόσμιο επίπεδο καταγράφονται περίπου 1,4 εκατομμύρια περιπτώσεις ηπατίτιδας Α ετησίως, με τον επιπολασμό της νόσου να έχει υψηλή γεωγραφική και δημογραφική μεταβλητότητα. Συχνότερα, απαντάται σε αναπτυσσόμενες χώρες, λόγω των φτωχών συνθηκών υγιεινής, ενώ στις αναπτυγμένες χώρες μεγαλύτερο κίνδυνο αντιμετωπίζουν τα άτομα που συναναστρέφονται άστεγους ή χρήστες ουσιών και οι άντρες που έχουν σεξουαλικές επαφές με άντρες. Η θνησιμότητα είναι πολύ χαμηλή, της τάξης του 0,5% . Ο HAV δεν συνδέεται με άμεση ηπατοτοξικότητα, συνοδεύεται όμως από βλάβη στα ηπατοκύτταρα εξαιτίας της ανοσολογικής απόκρισης. Περίπου το 60% των ασθενών έχει πλήρη ανάρρωση εντός 2 μηνών, αλλά ακόμα και σε περιπτώσεις υποτροπιάζουσας νόσου η πλήρης ανάρρωση παρατηρείται εντός 6 μηνών από την έναρξη της νόσου.

Η ηπατίτιδα Α είναι κυρίως ασυμπτωματική στις νεαρές ηλικίες, ιδιαίτερα σε παιδιά κάτω των 6 ετών, με τον ίκτερο να είναι το κύριο σύμπτωμα ενώ η προχωρημένη ηλικία θεωρείται επιβαρυντικός παράγοντας για συμπτωματική νόσο, με πιθανότητες λιγότερες από 1% να οδηγήσει σε οξεία ηπατική ανεπάρκεια. Η συγκεκριμένη νόσος δεν συνδέεται με χρόνια μόλυνση. Η διάγνωση της ηπατίτιδας Α γίνεται μέσω της ανίχνευσης αντισωμάτων anti-HAV IgM στον ορό του αίματος, ενώ στους ασθενείς με ηπατίτιδα Α παρατηρείται αυξημένη η αμινοτρανσφεράση ALT έναντι της AST. Η βιοψία δεν ενδείκνυται και ο εμβολιασμός είναι η απαραίτητη πρόληψη.^[36,37]

3.3.2 Ηπατίτιδα Β (HBV)

Ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV) είναι ένας δίκλωνος DNA ιός με 10 γνωστούς γονότυπους, που μεταδίδεται μέσω των σωματικών υγρών- κυρίως του αίματος- πιο συχνά από ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών, σεξουαλική επαφή, μετάγγιση μολυσμένου αίματος ή περιγεννητικά από τη μητέρα στο παιδί. Ο HBV εισέρχεται στα ηπατοκύτταρα και ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή, σχηματίζοντας ένα ομοιοπολικά κλειστό κυκλικό DNA (cccDNA). Κατά τη διαδικασία της μεταγραφής, το cccDNA λειτουργεί ως πρότυπο για τη δημιουργία νέων μορίων που φέρουν τον ιό και απελευθερώνονται με εξωκυττάρωση. Ο οργανισμός ενεργοποιεί την ανοσοαπόκριση στα αντιγόνα, γεγονός που οδηγεί σε βλάβη των ηπατοκυττάρων, ενώ ο ιός εκφράζει σημαντικές πρωτεΐνες για την επιβίωσή του. Η πιο γνωστή πρωτεΐνη είναι το επιφανειακό ή αυστραλιανό αντιγόνο (HBsAg) και το αντιγόνο e (HBeAg).

Οι νοσούντες υπολογίζονται σε 257 εκατομμύρια παγκοσμίως, σύμφωνα με στοιχεία του 2015, με το 68% των ασθενών να εντοπίζεται στην Αφρική και στο Δυτικό Ειρηνικό. Η εξέλιξη της υγείας των φορέων του HBV είναι δύσκολο να προβλεφθεί. Το cccDNA παραμένει στα ηπατοκύτταρα, ακόμα και όταν ο ιός φαίνεται αδρανής και μπορεί να ενεργοποιηθεί ξανά μεταγενέστερα. Η αδυναμία ανοσολογικής απόκρισης οδηγεί σε χρόνια ηπατίτιδα Β, η οποία με τη σειρά της καταλήγει σε κίρρωση του ήπατος και ηπατοκυτταρικό καρκίνο, προκαλώντας το θάνατο 700.000 ασθενών κάθε χρόνο. Ωστόσο, καθοριστικός παράγοντας για την πορεία της νόσου φαίνεται να είναι η ηλικία της αρχικής νόσησης. Τα νεαρά άτομα και ιδιαίτερα όσοι έχουν μολυνθεί περιγεννητικά, έχουν περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν χρόνια ηπατική νόσο.

Η διάγνωση του HBV γίνεται μέσω της ανίχνευσης των αντιγόνων HBsAg και HBeAg και των αντισωμάτων κατά του αντιγόνου e και του πυρήνα (anti-HBe και anti-HBc) που υπάρχουν στον ορό του αίματος. Η οξεία λοίμωξη διακρίνεται από τη χρόνια από την παρουσία ή όχι του αντισώματος anti-HBc IgM. Σε χρόνια νόσο έχουμε μόνο θετικά αντισώματα anti-HBc IgG, ενώ και στις δύο περιπτώσεις εντοπίζεται θετικό αυστραλιανό αντιγόνο, HBsAg. Πέρα από την ποιοτική ανίχνευση των αντιγόνων, ο ποσοτικός προσδιορισμός του ιικού φορτίου είναι εξίσου σημαντικός για την αντιμετώπιση του ιού και πραγματοποιείται μέσω του qHBsAg (quantitative HBsAg). Ακόμα, ένας δείκτης πρόγνωσης για ασθενείς που υποβάλλονται σε αντική θεραπεία είναι ο HBcrAg ο οποίος είναι χρήσιμος και ως προγνωστικός δείκτης για την ανάπτυξη HCC. Μέχρι σήμερα, ο εμβολιασμός κατά του ιού της ηπατίτιδας Β είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος πρόληψης.

3.3.3 Ηπατίτιδα C (HCV)

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) είναι ένας μονόκλωνος RNA ιός με 67 γονότυπους, που μεταδίδεται μέσω του μολυσμένου αίματος. Μόλις ο HCV εισέλθει στο ηπατοκύτταρο, πολλαπλασιάζεται και προκαλεί άμεση ανοσολογική απόκριση, που με τη σειρά της οδηγεί σε κυτταρική νέκρωση και φλεγμονή, λόγω διαταραχής στην ομοιόσταση του ήπατος. Επίσης, οι πρωτεΐνες του πυρήνα του HCV οδηγούν σε αντίσταση στην ινσουλίνη και οξειδωτική πίεση. Η χρόνια λοίμωξη οφείλεται στην αδυναμία του ανοσοποιητικού να καταπολεμήσει την ταχεία αναπαραγωγή του ιού.

Οι νοσούντες υπολογίζονται σε 71 εκατομμύρια παγκοσμίως, σύμφωνα με στοιχεία του 2015, με τον επιπολασμό της νόσου να έχει το υψηλότερο ποσοστό (2%) στην Ανατολική Μεσόγειο. Από αυτούς που θα οδηγηθούν σε χρόνια νόσο, το 30%-40% παρουσιάζει κίρρωση του ήπατος και 1%-3% ηπατοκυτταρικό καρκίνο.

Καθώς η ηπατίτιδα C είναι κυρίως ασυμπτωματική, η διάγνωσή της γίνεται από την ανίχνευση αντισωμάτων για τον ιό HCV και συχνά ακολουθείται από ποσοτικό προσδιορισμό του ιικού φορτίου. Για την αντιμετώπιση της ηπατίτιδας C χορηγούνται αντιικά φάρμακα άμεσης δράσης (DAA), με το 80% των ασθενών να έχει αποτελεσματική απόκριση. Η απόκριση, βέβαια, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του γονότυπου. Τέλος, να αναφερθεί ότι δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο.

3.3.4 Ηπατίτιδα D (HDV)

Ο ιός της ηπατίτιδας D (HDV) είναι ένας μονόκλωνος πολύ μικρού μεγέθους RNA ιός, με 8 γονότυπους και απαιτεί την παρουσία του ιού HBV για να αντιγραφεί και να εκφραστεί. Περίπου το 11% των ασθενών με HBV μολύνεται ταυτόχρονα και με HDV. Η ταυτόχρονη λοίμωξη HBV και HDV συνήθως οδηγεί σε ήπια νόσο, ενώ η επιμόλυνση HDV σε χρόνιους φορείς HBV θεωρείται πιθανότερο να επιφέρει κλινική επιδείνωση και κίρρωση του ήπατος, λόγω της ήδη επιβαρυνμένης κατάστασης του ήπατος. Πέρα από την έμμεση ηπατοκυτταρική βλάβη που προκαλείται από το ανοσοποιητικό παρουσία του HDV, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι ο HDV είναι άμεσα ηπατοτοξικός.

Στον παγκόσμιο πληθυσμό, 62 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν μολυνθεί με τον ιό, με την πλειοψηφία να συναντάται στην δυτική και κεντρική Αφρική, στην κοιλάδα του Αμαζονίου και στην Ανατολική Ευρώπη. Οι τρόποι μετάδοσης του HDV είναι όμοιοι με εκείνους του HBV και η περιορισμός της διασποράς του γίνεται έμμεσα, με τον εμβολιασμό του παγκόσμιου πληθυσμού για τον HBV. Με αιματολογικές εξετάσεις, όπως και στις προαναφερθείσες μορφές ηπατίτιδας, μπορεί να γίνει ανίχνευση αντισωμάτων αντι-HDV.

3.3.5 Ηπατίτιδα Ε (HEV)

Ο ιός της ηπατίτιδας Ε (HEV) είναι ένας μονόκλωνος μικρού μεγέθους RNA ιός και αποτελεί τη συνηθέστερη αιτία εμφάνισης οξείας ηπατίτιδας. Από τους 20 εκατομμύρια νοσούντες παγκοσμίως το 17% θα παρουσιάσει ήπια συμπτώματα τις 10 πρώτες μέρες της επώασης του ιού, όπως ίκτερο και αυξημένους δείκτες AST και ALT, ενώ λιγότερο από 5% των ασθενών θα εμφανίσουν οξεία ηπατική βλάβη. Υψηλότερο κίνδυνο διατρέχουν οι ηλικιωμένοι ασθενείς, οι γυναίκες, ιδιαίτερα στην περίοδο της εγκυμοσύνης και οι Ασιάτες.

Η μετάδοση του ιού γίνεται όπως και με τον ιό HAV, δηλαδή μέσω της στοματικής οδού και των κοπράνων, οπότε οι καλές συνθήκες υγιεινής είναι το βασικότερο μέτρο προστασίας. Στους ασθενείς με HEV δεν συστήνεται θεραπεία, αφού ο οργανισμός είναι σε θέση να καταπολεμήσει τον ιό μετά το πέρας κάποιων εβδομάδων, για αυτό δεν παρατηρείται χρονιότητα. Ο εμβολιασμός του πληθυσμού είναι εγκεκριμένος μόνο στην Κίνα μέχρι σήμερα.^[38,39,40]

3.3.6 Ηπατίτιδα προερχόμενη από άλλους ιούς

Εκτός από τους προαναφερθέντες ιούς της ηπατίτιδας, η φλεγμονή του ήπατος έχει συνδεθεί και με την παρουσία άλλων ιών, με πιο γνωστούς δύο ιούς της οικογένειας των ερπητοϊών, τον κυτταρομεγαλοϊό (CMV) και τον ιό Epstein-Barr (EBV). Κατ' εκτίμηση, στις ανεπτυγμένες χώρες, το 1% έως 4% των περιστατικών οξείας ηπατίτιδας σε ενήλικες οφείλονται σε λοιμώξεις από EBV και CMV.

Ο EBV εμφανίζεται στο 90% του παγκόσμιου πληθυσμού και είναι συχνά ασυμπτωματικός. Είναι γνωστός για την εκδήλωση της λοιμώδους μονοκυρήνωσης, η οποία σε ένα σημαντικό ποσοστό της τάξης του 70-90% οδηγεί σε μέτρια ηπατίτιδα. Η βλάβη στα ηπατοκύτταρα είναι είτε άμεση είτε έμμεση από φλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως οι κυτοκίνες, η ιντερφερόνη-γ, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF), που παράγονται μετά την ενεργοποίηση των CD81 T κυττάρων, ως αποτέλεσμα της ανοσοαπόκρισης του οργανισμού στην παρουσία ιών.

Ο CMV είναι η συνηθέστερη αιτία χρόνιας λοίμωξης, ενώ στο ήπαρ, ο CMV μολύνει συχνότερα τα ηπατοκύτταρα και τα μακροφάγα. Η ηπατίτιδα CMV χαρακτηρίζεται από

άμεση βλάβη στα ηπατοκύτταρα, στο επιθήλιο των χοληφόρων, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα κύτταρα Kupffer.

Η οξεία ηπατίτιδα σε ασθενείς με επαρκές ανοσοποιητικό χαρακτηρίζεται από μικρές αυξήσεις στις τιμές των ALT και AST και ίκτερο. Σπάνια αναφέρεται οξεία ηπατική ανεπάρκεια στους ασθενείς. Η χολόσταση και η χρόνια ηπατίτιδα μπορούν να εκδηλωθούν άτυπα έπειτα από λοίμωξη με EBV, ενώ ο CMV συνδέεται επίσης με θρόμβωση της πυλαίας φλέβας. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο πλαίσιο της μεταμόσχευσης ήπατος, ο CMV είναι η πιο κοινή λοιμώδης επιπλοκή, η οποία στη συνέχεια συνδέεται με σημαντική νοσηρότητα.^[41]

3.4 Αυτοάνοσες παθήσεις του ήπατος

Οι αυτοάνοσες παθήσεις του ήπατος είναι, όπως όλες οι αυτοάνοσες παθήσεις, πολύπλοκες διαταραχές με ασαφή πηγή προέλευσης. Φαίνεται να πυροδοτούνται από τη συνεπίδραση πολλαπλών γονιδίων σε συνδυασμό με αγνώστους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Στο ήπαρ 3 είναι οι πιο γνωστές αυτοάνοσες παθήσεις: η αυτοάνοση ηπατίτιδα (AIH), η πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα (PBC) και η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (PSC) και διακρίνονται από το σημείο στο ήπαρ που εκδηλώνεται η βλάβη, το είδος της φλεγμονής και την κλινική εικόνα που δημιουργούν. Η κίρρωση του ήπατος, ακόμα και η ηπατική ανεπάρκεια, είναι πιθανές επιπλοκές που μπορούν προκύψουν και στις 3 περιπτώσεις.

3.4.1 Αυτοάνοση ηπατίτιδα (AIH)

Στην AIH, η καταστροφή των ηπατοκυττάρων είναι το κύριο γνώρισμα της νόσου. Πρόκειται για μία χρόνια φλεγμονώδη νόσο με αυτοάνοσα χαρακτηριστικά, που κλινικά μπορεί να συνοδεύεται από ίκτερο, ηπατομεγαλία, σπληνομεγαλία και κόπωση. Στον ορό του αίματος παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα AST, ALT και γ-σφαιρίνης και ανιχνεύονται αυτοαντισώματα (ANA, SMA, αντι-LKM1, αντι- LC-1), που διαχωρίζουν την αυτοάνοση ηπατίτιδα από τις ιογενείς ηπατίτιδες. Τα πιο γνωστά αυτοαντισώματα είναι τα αντιπυρηνικά (ANA) και μαζί με τα αντισώματα κατά των λείων μυών (αντι-

SMA) ανιχνεύονται στην αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου I, σε ποσοστό 80% και 63% αντίστοιχα. Η αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου II αντιστοιχεί στο 5-10% των περιπτώσεων αυτοάνοσης ηπατίτιδας και εκδηλώνεται κυρίως σε παιδιά. Σε αυτή συναντάμε κυρίως τα αντι-LKM1, αντι-LC-1.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η ΑΙΗ επηρεάζει συχνότερα τις γυναίκες, ιδιαίτερα της ηλικιακής ομάδας 30 έως 45 ετών, με αναλογία ανδρών/γυναικών 1:7. Επίσης το 40% των ασθενών παρουσιάζει επιπλέον αυτοάνοση διαταραχή του θυρεοειδούς. Κατά τη στιγμή της διάγνωσης, περίπου το 30% των ενηλίκων έχουν παρουσιάσει κίρρωση του ήπατος, που όμως περιορίζεται εφόσον ληφθεί αγωγή. Η συνηθέστερη θεραπεία είναι η χρήση γλυκοκορτικοειδών, με το ποσοστό 10ετούς επιβίωσης να ξεπερνά πλέον το 90%. Εφόσον δεν θεραπευτεί η ΑΙΗ οδηγεί σε σημαντική θνησιμότητα, με ποσοστά 5ετούς και 10ετούς επιβίωσης 50% και 10% αντίστοιχα. Οι επιπλοκές που σχετίζονται με την ΑΙΗ είναι παρόμοιες με εκείνες των ιογενών ηπατίτιδων. Παρόλα αυτά, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα σε ασθενείς με ΑΙΗ είναι σπάνιο, σε ποσοστό 3,3-5,1% και αναπτύσσεται μόνο σε μακροχρόνια κίρρωση.^[42]

3.4.2 Πρωτοπαθής χολική χολαγγειΐτιδα (PBC)

Στην PBC, ο αυτοάνοσος τραυματισμός επηρεάζει τους μικρούς, ενδοηπατικούς χοληφόρους πόρους, προκαλώντας χολαγγειΐτιδα. Όταν τα χοληφόρα καταστρέφονται, η χολή συσσωρεύεται στο ήπαρ και συμβάλλει στη φλεγμονή και τη δημιουργία ίνωσης. Το 70% των ασθενών βιώνει κόπωση και κνησμό ως πρωταρχικά συμπτώματα. Παρατηρείται ακόμα πυλαία υπέρταση χωρίς να σχετίζεται με κίρρωση του ήπατος. Οι ασθενείς με PBC συχνά εμφανίζουν και μεταβολική νόσο των οστών, ενώ στο 5% εκδηλώνονται αυτοάνοσες δερματικές παθήσεις. Όμοια με την ΑΙΗ, οι γυναίκες παρουσιάζουν συχνότερα από τους άντρες PBC, συνήθως στην ηλικία των 50-60 ετών.

Για τη διάγνωση της PBC παρακολουθούνται τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης ALP και γ-GT σε διάστημα 6 μηνών, ως δείγμα χολόστασης, ελέγχεται η παρουσία αυτοαντισωμάτων ορού (αντι-μιτοχονδριακά αντισώματα AMA) και εφόσον υπάρχει διαθέσιμη βιοψία και η χολαγγειΐτιδα.

3.4.3 Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (PSC)

Στην PSC επηρεάζονται τόσο οι ενδοηπατικοί όσο και οι εξωηπατικοί χοληφόροι πόροι, προκαλώντας ίνωση και πολυεστιακή στένωση του χοληφόρου πόρου. Συμπτώματα της PSC αποτελούν το κοιλιακό άλγος, ο ίκτερος και ο πυρετός. Στο 44% των ασθενών παρατηρείται, επίσης, ηπατομεγαλία και στο 39% αυτών σπληνομεγαλία.

Το PSC σχετίζεται με σημαντικό κίνδυνο γαστρεντερικών κακοηθειών, κυρίως χολαγγειοκαρκίνωμα και καρκίνου του παχέος εντέρου. Σε αντίθεση με την ΑΙΗ και την PBC η PSC επηρεάζει και τα δύο φύλα με περισσότερο από το 60% των ασθενών να είναι άνδρες.

Για τη διάγνωση της PSC αξιολογούνται οι ίδιοι δείκτες με την PBC και εφόσον τα επίπεδα της ALP παραμένουν αυξημένα για περισσότερο από 6 μήνες γίνεται χρήση απεικονιστικών μεθόδων, κυρίως μέσω μαγνητικής τομογραφίας, αλλά και ενδοσκοπικά.^[43,44]

3.5 Κληρονομικές ασθένειες του ήπατος

Πολλές κληρονομικές ασθένειες είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση ηπατικής βλάβης, αλλά είναι λίγες αυτές που θεωρούνται κληρονομικές ηπατικές ασθένειες, με κύριο στόχο το ήπαρ. Οι πιο γνωστές από αυτές είναι: η νόσος του Wilson, η ανεπάρκεια άλφα-1-αντιθρυψίνης, η κληρονομική αιμοχρωμάτωση και η LAL-D. Επιπλέον αυτών αναφέρονται το σύνδρομο Alagille και ως αρκετά σπανιότερο το σύνδρομο Crigler-Najjar. Κοινό χαρακτηριστικό όλων αυτών των διαταραχών είναι η ανεπάρκεια στη σύνθεση ή στη λειτουργικότητα πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για το μεταβολισμό. Η ηπατική βλάβη στην καθεμία ποικίλει ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο του ασθενούς.

Καθώς πρόκειται για διαταραχές του μεταβολισμού, οι περισσότερες ασθένειες εκφράζονται στη βρεφική και παιδική ηλικία. Οι κληρονομικές μεταβολικές ασθένειες σχετίζονται με ηπατομεγαλία, οξεία ηπατική ανεπάρκεια στο 10-15% των περιπτώσεων, με το ποσοστό αυτό να αυξάνεται στις ηλικίες κάτω των 3 ετών, κίρρωση ή χολόσταση, με τη θνησιμότητα να κυμαίνεται στο 22-65%. Η μεταβολική ηπατική νόσος ευθύνεται για το 8-13% των μεταμοσχεύσεων του ήπατος στην παιδική ηλικία.^[45,46]

3.5.1 Νόσος του Wilson

Η νόσος Wilson είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή και οφείλεται σε γενετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο ATP7B στο χρωμόσωμα 13. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη (τριφωσφατάση αδενοσίνης τύπου P) πάνω στην οποία δεσμεύεται ο χαλκός για να μεταφερθεί στο σύμπλεγμα Golgi, να παραχθεί σερουλοπλασμίνη στα ηπατοκύτταρα, η οποία με τη σειρά της απεκκρίνεται στη χολή με τον χαλκό δεσμευμένο σε αυτήν, λειτουργώντας ως η κύρια οδός για την απομάκρυνση της περίσσειας χαλκού από το σώμα. Σε περιπτώσεις που η πρωτεΐνη δεν εκφράζεται σωστά, ο χαλκός συσσωρεύεται στα ηπατοκύτταρα και έπειτα περνάει στην κυκλοφορία του αίματος, προκαλώντας και άλλα συμπτώματα, εκτός από τα ηπατολογικά, όπως νευρολογικά, ψυχιατρικά και οφθαλμολογικά.

Η νόσος Wilson, με επιπολασμό 1 στους 30000 εμφανίζεται στις ηλικίες 10 έως 20 ετών, αλλά οι ασθενείς συνήθως εκδηλώνουν συμπτώματα στην ηλικία των 40 ετών ή αργότερα. Τα συμπτώματα στην αρχή της νόσου είναι ήπια, η ασθενείς όμως, μπορεί να οδηγηθούν σε χρόνια ενεργό ηπατίτιδα, ίνωση και κίρρωση, εφόσον δεν λάβουν έγκαιρα την απαραίτητη θεραπεία για την εξισορρόπηση της ομοιόστασης του χαλκού στον οργανισμό και δεν ακολουθήσουν ειδική διατροφή. Σε ασθενείς με νόσο Wilson σπάνια ο κίνδυνος ηπατοκυτταρικού καρκινώματος είναι πού χαμηλός.

Στη διάγνωση λαμβάνεται υπόψιν το επίπεδο σερουλοπλασμίνης ορού, το οποίο είναι χαμηλό στους περισσότερους ασθενείς με νόσο Wilson. Επίσης, ελέγχεται το επίπεδο του δεσμευμένου και του ελεύθερου χαλκού στον ορό, με τον ελεύθερο χαλκό να είναι βασικός δείκτης της ασθένειας. Τα επίπεδα χαλκού στα ούρα είναι εξίσου ένα σημαντικό μέτρο της απέκκρισης χαλκού, αφού τα αυξημένα επίπεδα χαλκού στα ούρα υποδηλώνουν μειωμένη απέκκριση χαλκού από τη χολή. Ακόμα, συνεκτιμώνται και οι βασικοί ηπατικοί βιοδείκτες, όπως οι τρανσαμινάσες, για την συνολική εικόνα της κατάστασης του ήπατος.

[47]

3.5.2 Ανεπάρκεια άλφα-1 αντιθρυψίνης

Η πρωτεΐνη άλφα-1 αντιθρυψίνη (AAT) είναι ένας αναστολέας πρωτεάσης σερίνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο SERPINA1, συντίθεται και εκκρίνεται κυρίως από τα ηπατοκύτταρα. Ο ρόλος της είναι σημαντικός στην υγεία των πνευμόνων, καθώς προστατεύει τους ιστούς από βλάβες που προκαλούν πρωτεολυτικά ένζυμα. Η ανεπάρκεια άλφα-1 αντιθρυψίνης είναι μια σπάνια κληρονομική πάθηση που οφείλεται σε παραλλαγή στο γονίδιο SERPINA1 και χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα κυκλοφορίας της AAT και εμφανίζεται σε 1 στα 2000–5000 νεογνά. Στη Δυτική Ευρώπη ο επιπολασμός της νόσου είναι περίπου 1 στους 2500 με τους Σκανδιναβούς να έχουν τα υψηλότερα ποσοστά.

Στο 10% των παιδιών η ανεπάρκεια AAT οδηγεί σε ενδοηπατική χολόσταση, δηλαδή χρόνιο αποφρακτικό ίκτερο, ενώ το 2,5% αυτών αναπτύσσει κίρρωση στην παιδική ή εφηβική ηλικία, που συνήθως απαιτεί μεταμόσχευση. Στους ενήλικες, το 10% των κάτω των 50 ετών και 20–40% των άνω των 50 ετών χρόνια παρουσιάζει ηπατίτιδα ή κίρρωση του ήπατος.

Για τη διάγνωση της ανεπάρκειας AAT γίνεται εξέταση ορού αίματος και μετρώνται τα επίπεδα της AAT. Τα αποτελέσματα είναι εγκυρότερα στους ασθενείς χωρίς φλεγμονώδεις νόσους, καθώς, παρουσία φλεγμονής, προκαλείται έκφραση της AAT και αυξάνεται η ποσότητά της στον ορό. Για αυτό το λόγο, προτείνεται και η μέτρηση της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), που υποδεικνύει φλεγμονή. Εφόσον τα επίπεδα της CRP είναι παθολογικά η τιμή της AAT πρέπει να αξιολογείται διαφορετικά. Όσον αφορά στα βρέφη, ο ίκτερος παρατεταμένης χρονικής διάρκειας είναι βασική ένδειξη για μέτρηση της AAT. Τέλος, σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, προτείνεται η εξέταση των συγγενών για να εντοπιστούν τυχόν ασυμπτωματικοί φορείς. Η ανάλυση γονότυπου είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος που μπορεί να ανιχνεύσει ή να αποκλείσει τις πιο κοινές μεταλλάξεις στο SERPINA1.^[48]

3.5.3 Αιμοχρωμάτωση

Η αιμοχρωμάτωση είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη μετάλλαξη στο γονίδιο HFE, με τη συνηθέστερη μορφή να είναι η ομοζυγωτία για το C282Y. Χαρακτηρίζεται από υπερβολική εναπόθεση σιδήρου σε ιστούς και οφείλεται στην ανεπάρκεια της ορμόνης

επιδίνης. Η συγκεκριμένη ορμόνη εκκρίνεται από το ήπαρ και είναι ο ρυθμιστής απορρόφησης σιδήρου από τα κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου. Η ηπατική βλάβη σχετίζεται κυρίως με την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από τον σίδηρο. Τα κύτταρα Kupffer αντιδρούν και απελευθερώνουν κυτοκίνες που με τη σειρά τους διεγείρουν τα αστεροειδή κύτταρα να παράγουν κολλαγόνο, οδηγώντας έτσι σε ίνωση. Ο σίδηρος τελικά συσσωρεύεται στα ηπατοκύτταρα, προκαλώντας χρόνια ηπατική βλάβη, με πιθανή εξέλιξη σε κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

Ο επιπολασμός της νόσου είναι 1 στα 200–400 άτομα, με τις υψηλότερες τιμές να καταγράφονται σε άτομα σκανδιναβικής και ιρλανδικής καταγωγής και τις χαμηλότερες σε άτομα αφρικανικής καταγωγής. Οι περισσότεροι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί μέχρι την ηλικία των 30 ετών.

Στα πλαίσια της διάγνωσης γίνεται μέτρηση των επιπέδων φερριτίνης στον ορό του αίματος, και ελέγχεται το επίπεδο κορεσμού της τρανσφερρίνης. Το επίπεδο κορεσμού της τρανσφερρίνης είναι σημαντικό να αξιολογείται με βάση τη φυλετική καταγωγή του ασθενούς, λόγω της έντονης μεταβλητότητας. Η μαγνητική τομογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποσοτικοποίηση του σιδήρου στο ήπαρ. Η πιο έγκυρη μέθοδος, αν και επεμβατική, θεωρείται η βιοψία.^[49]

3.5.4 Ανεπάρκεια λιπάσης λυσοσωμικού οξέος (LAL-D)

Η ανεπάρκεια λιπάσης λυσοσωμικού οξέος (LAL-D) είναι μια σπάνια αυτοσωματική υπολειπόμενη διαταραχή που προκαλείται από έλλειψη ή ανεπάρκεια λιπάσης λιποσωμικού οξέος και οδηγεί σε προβλήματα με το μεταβολισμό της χοληστερόλης. Η πιο σοβαρή έκδήλωση της νόσου είναι αυτή που οφείλεται στην μειωμένη ή ανύπαρκτη δράση του ενζύμου LAL και κάνει την εμφάνισή της στην βρεφική ηλικία (νόσος Wolman). Στις μεγαλύτερες ηλικίες το ένζυμο LAL παρουσιάζει υψηλότερο επίπεδο δραστηριότητας καθυστερώντας την εμφάνιση ηπατοσπληνομεγαλίας και δυσλιπιδαιμίας. Στην εξέλιξή της, όμως, οδηγεί σε αθηροσκλήρωση και ηπατική νόσο.

Στις εξετάσεις των ασθενών καταγράφονται υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων και ολικής χοληστερόλης με χαμηλά επίπεδα λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL). Στις περιπτώσεις ασθενών με ηπατομεγαλία αξιολογούνται τα επίπεδα AST και ALT. Ως θεραπεία χρησιμοποιούνται μέθοδοι ενζυμικής υποκατάστασης.^[50]

3.6 Κίρρωση του ήπατος

Η κίρρωση του ήπατος αναφέρθηκε στην παραπάνω ανάλυση των ηπατικών νόσων ως στάδιο εξέλιξης των- ανεξαρτήτου προέλευσης- χρόνιων ηπατικών νόσων. Θεωρείται το τελικό στάδιο της ίνωσης και χαρακτηρίζεται από υψηλή θνησιμότητα. Η μη αντιρροπούμενη κίρρωση ευθύνεται ετησίως για ένα εκατομμύριο θανάτους σε παγκόσμιο επίπεδο και σε ευρωπαϊκό επίπεδο για 170.000 θανάτους ετησίως. 5000 ασθενείς οδηγούνται σε μεταμόσχευση ήπατος λόγω κίρρωσης στην Ευρώπη κάθε χρόνο. Το 29% των θανάτων από κίρρωση προέρχεται από χρόνια ηπατίτιδα Β.

Η ηπατική ίνωση προκύπτει άλλοτε άμεσα από τη συσσώρευση κολλαγόνου στα πλαίσια της επούλωσης του τραυματισμένου ιστού και άλλοτε προκαλείται έμμεσα εξαιτίας της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού σε ιούς. Τα κύρια κύτταρα που συμμετέχουν στη διαδικασία της ίνωσης ονομάζονται μυοϊνοβλάστες και δεν απαντώνται στο υγιές ήπαρ. Αντίθετα, ενεργοποιούνται στην περίπτωση ηπατικής βλάβης και ο ρόλος τους είναι να παράγουν κολλαγόνο, κυρίως τύπου I. Επίσης, ενεργοποιούνται τα αστεροειδή κύτταρα που υπάρχουν στον χώρο Disse των φυσιολογικών ηπατοκυττάρων και διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην φλεγμονώδη αντίδραση του ήπατος.^[51]

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της ίνωσης, η φλεγμονή που προκαλείται από τραυματισμό πυροδοτεί τη στρατολόγηση μακροφάγων στο ήπαρ. Τα μακροφάγα, όπως και τα κύτταρα Kupffer, μπορούν να προάγουν την ινογένεση με την έκκριση του TGFβ, της πιο ισχυρής κυτοκίνης, που αποτελεί το βασικό μεσολαβητή της ίνωσης. Οι κυτοκίνες και χημειοκίνες που παράγονται διεγείρουν τα αστεροειδή κύτταρα, τα οποία μεταναστεύουν στο σημείο του τραυματισμού και εκκρίνουν κολλαγόνο, δημιουργώντας ουλώδη ιστό. Η εναπόθεση κολλαγόνου στον χώρο του Disse μπορεί να οδηγήσει στη δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων και στη μετατροπή των κολποειδών σε αγγειακούς χώρους με χαρακτηριστικά τριχοειδών. Αυτά θα έχουν ως αποτέλεσμα την διαταραχή της ανταλλαγής ουσιών και την αύξηση της κολποειδικής αντίστασης. Ακόμα, επηρεάζονται κλάδοι της πυλαίας φλέβας, γεγονός που συμβάλλει στην ανάπτυξη πυλαίας υπέρτασης.

Η ίνωση εξελίσσεται σε στάδια. Στο πρώτο στάδιο αυξάνεται η εναπόθεση του κολλαγόνου και η ηπατική βλάβη είναι αναστρέψιμη. Στο δεύτερο στάδιο, η ίνωση προχωράει στις πυλαίες οδούς. Στο τρίτο στάδιο, υπάρχει διάχυτη ιστολογική διαταραχή

του ήπατος με εμφάνιση αναγεννητικών όζων και πλέον ονομάζεται κίρρωση. Στο τελικό αυτό το στάδιο η ηπατική βλάβη είναι μη αναστρέψιμη.^[52]

Στις κυριότερες επιπλοκές της κίρρωσης του ήπατος συγκαταλέγεται ο ασκίτης, δηλαδή η παθολογική συσσώρευση υγρού στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Στο 18% των ασθενών με μη αντιρροπούμενη ηπατική νόσο παρουσιάζεται ηπατονεφρικό σύνδρομο εντός του πρώτου έτους από τη διάγνωση, λόγω αντίδρασης των νεφρών με αγγειοσυστολή στην αύξηση της σπλαχνικής πίεσης. Παρατηρούνται επίσης γαστροοισοφαγικοί κίρσοι με κίνδυνο αιμορραγίας στο 25-40% των ασθενών με κίρρωση, διαταραχές πήκτικότητας που προκύπτουν από την μειωμένη ικανότητα του ήπατος να συνθέσει τους παράγοντες πήξης και εγκεφαλοπάθειες.

Στους βιοδείκτες που ελέγχονται για την εξέλιξη της ίνωσης και τη διάγνωση της κίρρωσης περιλαμβάνονται οι περισσότεροι γενικοί βιοδείκτες των ηπατικών νόσων. Αναφορικά αυτοί είναι: Οι αμινοτρανσφεράσες ALT και AST και η αναλογία αυτών, η AST προς το δείκτη αναλογίας αιμοπεταλίων (APRI), η χολερυθρίνη, η γ-GT, η απολιποπρωτεΐνη A1, ο αριθμός αιμοπεταλίων και η χοληστερόλη. Στους πιο ειδικούς βιοδείκτες ανήκουν τα πεπτίδια προκολλαγόνου I και III, το κολλαγόνο τύπου I και IV Έμμεσοι), η λαμινίνη, οι κυτοκίνες, καθώς και ο μετασχηματιστικός αυξητικός TGF-α και TGF-β. Στις απεικονιστικές μεθόδους συνηθίζεται η ελαστογραφία.^[53]

3.7 Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC)

Ο καρκίνος του ήπατος αποτελεί την τέταρτη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως και είναι συνηθέστερος στους άνδρες παρά στις γυναίκες, με αναλογία περίπου 3:1. Μπορεί να εμφανιστεί πρωτοπαθώς από πολλές ηπατικές ασθένειες, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα στο παρόν κεφάλαιο ή δευτεροπαθώς, κυρίως ως μεταστατικός καρκίνος έπειτα από καρκίνο του παχέως εντέρου σε ποσοστό 70%. Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα έχει ως προέλευση την κίρρωση σε ποσοστό 80-90%. Οι ιογενείς ηπατίτιδες καταλήγουν συχνά σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, με τους ασθενείς με HBV να αποτελούν το 54,5% των νέων περιστατικών καρκίνου του ήπατος σε παγκόσμιο επίπεδο και τους ασθενείς με HCV το 21,2%, σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία του 2018. Οι ασθενείς με ALD

αντιστοιχούν στο 30% των περιπτώσεων με ηπατοκυτταρικό καρκίνο, ενώ το 2,6% των ασθενών με NAFLD κινδυνεύουν να καταλήξουν σε καρκίνο του ήπατος.^[54]

Στη διάγνωση του HCC καθοριστικές είναι οι τιμές της α-εμβρυϊκής σφαιρίνης (AFP), που σχετίζεται με τη φλεγμονή και υποδεικνύει τον ηπατικό καρκίνωμα. Ιδιαίτερα η γλυκοζυλιωμένη μορφή της AFP-L3 είναι στενά συνδεδεμένη με το HCC και σε συνδυασμό με υψηλά επίπεδα προθρομβίνης, θεωρούνται αρνητικοί, ως προς την πρόγνωση της νόσου, βιοδείκτες.^[55]

4. Βιοδείκτες

4.1 Ορισμοί

Παρόλο που η λέξη βιοδείκτης είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη στην ιατρική και φαρμακευτική κοινότητα, ο ορισμός της λέξης έχει αποδειχθεί περίπλοκος και πολυδιάστατος. Ο απλούστερος και πιο γενικευμένος ορισμός έχει δοθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) και το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (NIH): «Βιοδείκτης είναι ένα καθορισμένο χαρακτηριστικό που μετράται ως δείκτης φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών, παθογόνων διεργασιών ή αποκρίσεων σε μια έκθεση ή παρέμβαση, συμπεριλαμβανομένων των θεραπευτικών παρεμβάσεων».^[56] Κατά συνέπεια, ένας βιοδείκτης αποτελεί έναν αντικειμενικό δείκτη διάγνωσης πρόγνωσης και πρόβλεψης των νόσων και μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε οποιοδήποτε επίπεδο: μοριακό, κυτταρικό ή ιστολογικό επίπεδο.

Οι βιοδείκτες έχουν συνδεθεί και λανθασμένα συγχέονται με τις έννοιες «τελικό κλινικό σημείο» (clinical endpoint) και «υποκατάστατο τελικού κλινικού σημείου» (surrogate clinical endpoint). Για αυτό το λόγο αξίζει να σημειωθεί ο ορισμός τους:

- *Τελικό κλινικό σημείο*: υποκειμενικό χαρακτηριστικό (ή μεταβλητή) που αντικατοπτρίζει το πώς αισθάνεται, λειτουργεί ή επιβιώνει ένας ασθενής.
- *Υποκατάστατο τελικού κλινικού σημείου*: είναι ένας βιοδείκτης που προορίζεται να υποκαταστήσει ένα κλινικό τελικό σημείο. Σκοπός είναι το υποκατάστατο τελικού σημείου να προβλέπει το όφελος ή τη βλάβη της κλινικής εικόνας του ασθενούς με βάση επιδημιολογικά, θεραπευτικά, παθοφυσιολογικά ή άλλα επιστημονικά στοιχεία.^[57]

Συμπερασματικά, οι παραπάνω έννοιες δεν είναι συνώνυμες των βιοδεικτών, σχετίζονται, όμως, με τη χρησιμότητα των βιοδεικτών και είναι κρίσιμο να συσχετίσουμε, ως προς την παθοφυσιολογία μίας νόσου, τον βιοδείκτη με το τελικό κλινικό σημείο. Τα υποκατάστατα τελικών σημείων αποτελούν βιοδείκτες χρήσιμους για την μελέτη της κλινικής πορείας του ασθενούς και την παρατήρηση της απόκρισης στη θεραπευτική αγωγή. Αυτό οδηγεί στη διαλογή ασθενών με διαφορετικό προφίλ προόδου της νόσου ή ανταπόκρισης στη φαρμακευτική αγωγή. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν είναι όλοι οι βιοδείκτες κατάλληλοι για να αποτελέσουν υποκατάστατο τελικού

σημείου και αυτό, διότι, μπορεί να γίνουν υποκατάστατα για μη κλινικά ενδιάμεσα αποτελέσματα ή να επηρεαστούν από την εξέλιξη της ίδιας της ασθένειας. Μάλιστα, επειδή η ασθένεια μπορεί να επηρεάζει την πραγματική κλινική έκβαση με άλλους μηχανισμούς, μπορεί να μετρηθούν βιοδείκτες αναξιόπιστοι για να θεωρηθούν υποκατάστατα τελικού κλινικού σημείου.

4.2 Χρησιμότητα και πλεονεκτήματα της χρήσης βιοδεικτών

Οι βιοδείκτες είναι χρήσιμα διαγνωστικά εργαλεία, που συμβάλλουν στην εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων, με φθινό και γρήγορο τρόπο σε σχέση με άλλες πιο σύνθετες μεθόδους. Επίσης, μπορούν να εκτιμήσουν τη σοβαρότητα μίας νόσου και το κατά πόσο αυτή η νόσος αυξάνει τις πιθανότητες σοβαρής βλάβης στην υγεία του ασθενούς ή θανάτου. Μέσω των κατάλληλων για κάθε ασθένεια βιοδεικτών, γίνεται εκτίμηση του κινδύνου που διατρέχουν υποομάδες ασθενών να υποτροπιάσουν ή να ωφεληθούν από μία παρέμβαση ή θεραπεία και τις πιθανότητες που έχουν οι ασθενείς να ανταποκριθούν σε φαρμακευτική αγωγή. Επιπλέον, αποτελούν μέσο παρακολούθησης της κλινικής πορείας του ασθενούς, είτε εκείνος λαμβάνει φαρμακευτική αγωγή ή άλλη θεραπεία είτε όχι και χρησιμοποιούνται ως κριτήρια για το σχεδιασμό της θεραπευτικής αντιμετώπισης μίας νόσου.

Στα πλεονεκτήματα της χρήσης των βιοδεικτών αξίζει να αναφερθούν το σχετικά χαμηλό κόστος σε πληθώρα μετρήσεων, πλην ιδιαίτερων περιπτώσεων, η ευκολία στη λήψη βιολογικών δειγμάτων, ειδικά όσον αφορά στο αίμα και στα ούρα και η σχετική ταχύτητα στην ανάλυση των δειγμάτων, άρα η έγκαιρη διάγνωση. Οι μετρήσεις μπορούν να επαναλαμβάνονται πολλαπλώς, με την ίδια ευκολία. Επιπρόσθετα, αποφεύγονται ηθικά διλήμματα ως προς τη μέτρηση κλινικών τελικών σημείων, καθώς δεν στηριζόμαστε σε δεδομένα όπως η θνησιμότητα για να εξάγουμε συμπεράσματα.^[58]

4.3 Κατηγορίες βιοδεικτών

Οι βασικές κατηγορίες στις οποίες χωρίζονται οι βιοδείκτες, ανάλογα με το σκοπό χρήσης του είναι οι:

α) Διαγνωστικοί βιοδείκτες

Χρησιμοποιούνται για να ανιχνευθεί με βεβαιότητα μία νόσος και για να αντιστοιχηθεί ο ασθενής σε κάποια υποκατηγορία της νόσου, αν υπάρχει. Οι διαγνωστικοί βιοδείκτες πρέπει να είναι σε θέση να διαχωρίζουν με ασφάλεια τον ασθενή από τον υγιή οργανισμό. Μετά τη διάγνωση, χρησιμοποιούνται οι *βιοδείκτες παρακολούθησης* της εξέλιξης της νόσου, είτε ο ασθενής υποβάλλεται σε φαρμακευτική αγωγή ή άλλη θεραπεία, είτε όχι. Αν καταγραφεί μεταβολή στο επίπεδο ενός βιοδείκτη έπειτα από έκθεση του ασθενούς σε ένα ιατρικό προϊόν ή έναν περιβαλλοντικό παράγοντα, μιλάμε για *βιοδείκτη φαρμακοδυναμικής/απόκρισης*. Ο τελευταίος τύπος βιοδείκτη είναι εξαιρετικά χρήσιμος τόσο στην κλινική πράξη, όσο και στο σχεδιασμό θεραπευτικών μεθόδων.

β) Προγνωστικοί βιοδείκτες

Είναι χρήσιμοι για τον προσδιορισμό της πιθανής έκβασης της νόσου. Η ανίχνευση ενός προγνωστικού βιοδείκτη ή η μεταβολή του, ανεξάρτητα από τη χορήγηση ή όχι θεραπείας στον ασθενή, εξάγει τις πιθανότητες που έχει ο ασθενής για μια θετική ή αρνητική εξέλιξη. Οι προγνωστικοί βιοδείκτες κατατάσσουν τους ασθενείς σε ομάδες ανάλογα με την επικινδυνότητα η νόσος να υποτροπιάσει και συμβάλλουν στις αποφάσεις των γιατρών σχετικά με τη διαχείριση του κάθε ασθενούς ατομικά, το χρόνο νοσηλείας ή τις πρόσθετες διαγνωστικές εξετάσεις.

γ) Προβλεπτικοί βιοδείκτες

Η παρουσία ή η απουσία ή η μεταβολή ενός προβλεπτικού βιοδείκτη επιτρέπει την πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας ή μη της θεραπείας που χορηγείται στον ασθενή. Άρα προσδιορίζεται η πιθανότητα τα άτομα υπό έκθεση σε ένα ιατρικό προϊόν να έχουν θετική ή αρνητική έκβαση στην εξέλιξη της υγείας τους. Οι προβλεπτικοί βιοδείκτες είναι ιδιαίτερα σημαντικοί στις κλινικές μελέτες για το βέλτιστο σχεδιασμό κλινικών δοκιμών στους ασθενείς.

Ο διαχωρισμός μεταξύ προγνωστικών και προβλεπτικών βιοδεικτών έγκειται στη χορήγηση ή όχι θεραπείας στον ασθενή. Στη μελέτη προβλεπτικών βιοδεικτών θεωρείται

δεδομένη η χορήγηση θεραπείας και μελετάται η ευνοϊκή ή δυσμενής επίδραση αυτής στην υγεία του ασθενούς, ενώ για τους προγνωστικούς βιοδείκτες η χορήγηση ή όχι θεραπείας δεν επηρεάζει το προγνωστικό αποτέλεσμα.

δ) Βιοδείκτες ασφαλείας

Η μέτρηση των βιοδεικτών ασφαλείας είναι χρήσιμη για να προσδιοριστούν οι πιθανότητες μία θεραπεία να προκαλέσει ανεπιθύμητες παρενέργειες και τοξικότητα στον ασθενή. Για να διασφαλιστεί όσο το δυνατόν η ακεραιότητα του ασθενούς, πριν από πολλές θεραπείες μετρώνται βιοδείκτες που σχετίζονται κυρίως με την καρδιακή, ηπατική ή νεφρική λειτουργία.^[59]

4.4 Ποιοτικά χαρακτηριστικά βιοδεικτών

Για την αξιολόγηση ενός βιοδείκτη πρέπει να μελετηθούν πολλά χαρακτηριστικά του, σε κάποιες περιπτώσεις και ανάλογα με τη χρήση του, ιδιαίτερα εξειδικευμένα. Παρόλα αυτά, κάθε βιοδείκτης πρέπει να πληροί ορισμένα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά για να θεωρηθεί κατάλληλος για χρήση. Αυτά είναι:

1. Ευαισθησία

Η ευαισθησία πρέπει να έχει αναλυτικό και διαγνωστικό χαρακτήρα, ώστε να ανιχνεύονται οι ασθενείς σε οποιοδήποτε στάδιο μίας νόσου. Αυτό συνεπάγεται ότι ο βιοδείκτης θα μπορεί να ανιχνεύεται ακόμα και σε μικρές ποσότητες.

2. Ειδικότητα

Η αναλυτική και διαγνωστική ειδικότητα εξασφαλίζει ότι ο προσδιορισμός του βιοδείκτη δεν θα επηρεαστεί από διαφορετικούς παράγοντες, που δε σχετίζονται με τους μηχανισμούς της νόσου, όπως η λήψη φαρμακευτικής αγωγής και θα εξάγει αρνητικό αποτέλεσμα στους υγιείς.

3. Κλινική συνάφεια

Ο βιοδείκτης πρέπει να αντικατοπτρίζει οποιαδήποτε κλινική αλλαγή σε μια φυσιολογική ή παθολογική διαδικασία, σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Αυτό οδηγεί σε υψηλή διαγνωστική αξία.

4. Αξιοπιστία

Ο βιοδείκτης θα πρέπει να παρουσιάζει μεταβολή στην τιμή του ανάλογη της εξέλιξης της νόσου ή της προοδευτικής απόκρισης του ασθενούς σε φαρμακευτική ή άλλη θεραπευτική αγωγή. Οι μετρήσεις θα χαρακτηρίζονται από ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα. Αντίστοιχα, τα επίπεδά του θα μένουν αμετάβλητα και ανεπηρέαστα από εξωτερικούς παράγοντες που δεν σχετίζονται με τη νόσο.

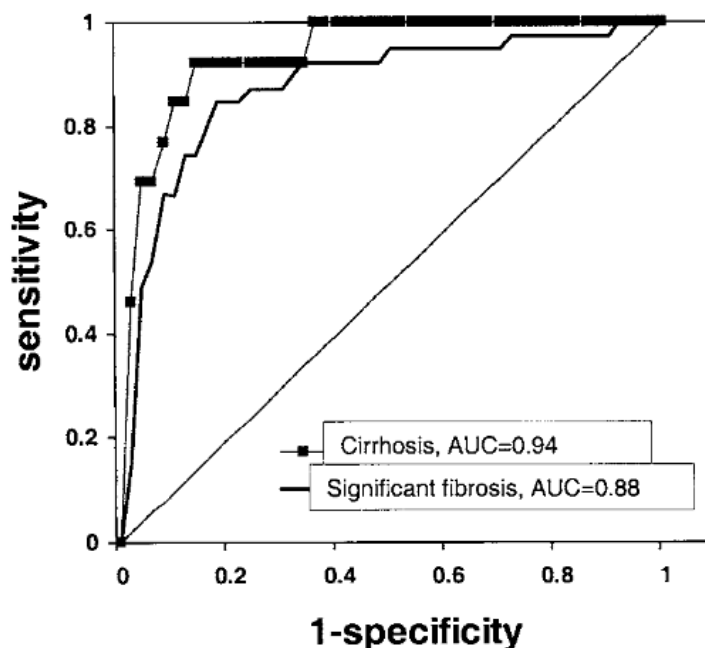
5. Πρακτικότητα

Ένας βιοδείκτης χαρακτηρίζεται από πρακτικότητα εφόσον προσδιορίζεται από όσο το δυνατόν λιγότερο επεμβατικές διαδικασίες και εξασφαλίζεται η ελάχιστη ταλαιπωρία για τον ασθενή.

6. Απλότητα

Η απλότητα περιλαμβάνει τον μη εξειδικευμένο εξοπλισμό και την ταχύτητα στην εξαγωγή αποτελεσμάτων με χαμηλό κόστος, εφόσον η μέθοδος προσδιορισμού δεν υπολείπεται σε εγκυρότητα.^[60]

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά προσδιορίζονται με στατιστικούς δείκτες, όπως ο LOD (Limit of Detection), που αντιστοιχεί στην ελάχιστη δυνατή ανιχνεύσιμη ποσότητα του βιοδείκτη, τη διαγνωστική αξία του θετικού αποτελέσματος PV^+ και τις καμπύλες ROC που συσχετίζουν την ευαισθησία και την ειδικότητα για τον προσδιορισμό της κλινικής διαγνωστικής αξίας ενός βιοδείκτη.^[61] Το εμβαδόν που βρίσκεται κάτω από την καμπύλη (AUC) μαρτυρά την ποιότητα του βιοδείκτη. Πιο συγκεκριμένα, το AUC ιδανικά πρέπει να έχει τιμή μεγαλύτερη του 0,75 πλησιάζοντας το 0,9 που αντιστοιχεί στον πολύ καλό βιοδείκτη. Ένα παράδειγμα της καμπύλης ROC φαίνεται στην Εικόνα 5.^[62]

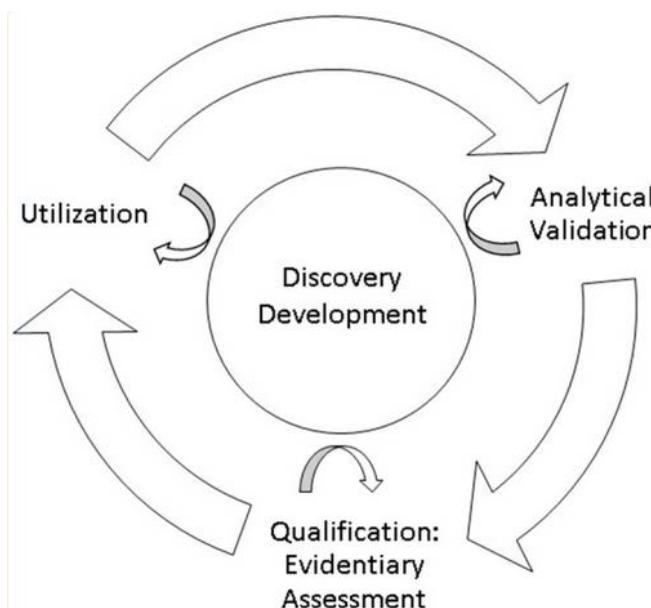


Εικόνα 5: Καμπύλη ROC για τον APRI (δείκτης αναλογίας AST προς αιμοπετάλια) στην πρόβλεψη ίνωσης και κίρρωσης. Στην ιδανική περίπτωση θα πρέπει το AUC να ισούται με 1,0, ενώ όταν η σχέση ευαισθησίας και (1-ειδικότητα) είναι γραμμική, το AUC είναι 0,5 και εκφράζει φτωχή διαγνωστική αξία. Στο συγκεκριμένο διάγραμμα ο APRI είναι κατάλληλος βιοδείκτης για πρόβλεψη τόσο της ίνωσης, όσο και της κίρρωσης.

Πηγή: P. Ray et al. *Anesthesiology*. (2010)

4.5 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Για την εισαγωγή ενός νέου, πρωτότυπου βιοδείκτη απαιτείται αξιολόγηση (evaluation). Η διαδικασία της αξιολόγησης περιλαμβάνει την επικύρωση (validation) και την πιστοποίηση (qualification) που οδηγούν στην χρηστικότητα (utilization) του βιοδείκτη. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες είναι αλληλοεξαρτώμενες και συνήθως δεν συμβαίνουν διαδοχικά, αλλά ταυτόχρονα με συνεχή ενημέρωση του κάθε βήματος, ανάλογα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν. Αποδεικνύουν, στην ουσία, αν ο βιοδείκτης είναι κατάλληλος για την προτεινόμενη χρήση. Η Εικόνα 6 περιγράφει σχηματικά τα 3 βήματα.^[63]



Εικόνα 6: Τα βήματα της αξιολόγησης ενός βιοδείκτη είναι αλληλοεξαρτώμενα. Ο κύκλος στο κέντρο υποδηλώνει συνεχείς διαδικασίες που θα πρέπει να ενημερώνουν κάθε βήμα στη διαδικασία αξιολόγησης βιοδεικτών

Πηγή: CM. Micheel. Institute of Medicine (US) Committee on Qualification of Biomarkers and Surrogate Endpoints in Chronic Disease. (2010)

Η επικύρωση ενός βιοδείκτη είναι σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει σχεδιασμό της μελέτης και της ανάλυσης δεδομένων, ακόμα και με χρήση στατιστικών μεγεθών. Στην φάση της επικύρωσης λαμβάνονται υπόψιν κάποια από τα χαρακτηριστικά του αξιόπιστου βιοδείκτη που αναφέρθηκαν παραπάνω και κάποια πρόσθετα. Πιο αναλυτικά ελέγχονται:

1. Η ευαισθησία

Η μεταβολή του κατάλληλου βιοδείκτη στην εξέλιξη μίας νόσου αντιπροσωπεύει την αλλαγή σε βασικά κλινικά τελικά σημεία. Οι δύο μεταβολές πρέπει να συσχετίζονται μεταξύ τους και να είναι ανάλογες.

2. Η ειδικότητα

Ο βιοδείκτης πρέπει να είναι σε θέση να ερμηνεύει σε μεγάλο βαθμό τις αλλαγές σε κάποιο τελικό κλινικό σημείο και να αξιολογεί αν οι παρεμβάσεις στους ασθενείς έχουν απόκριση, ώστε να διαχωρίζει τους επωφελούμενους ασθενείς από εκείνους που δεν ανταποκρίνονται στην παρέμβαση.

3. Η ακρίβεια

Ένας ακριβής βιοδείκτης πρέπει να έχει όσο το δυνατόν μικρότερη απόκλιση από την πραγματική τιμή.

4. Η πιστότητα

Η πιστότητα εξασφαλίζεται μέσω της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας.

5. Η πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων

Η θετική μεταβολή σε έναν βιοδείκτη μπορεί να μην συνεπάγεται θετική μεταβολή σε ένα κλινικό τελικό σημείο.

6. Η πιθανότητα ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων

Η μεταβολή σε έναν βιοδείκτη μπορεί να είναι μικρή ή ανύπαρκτη και δεν αντιπροσωπεύει μία πιθανή θετική μεταβολή σε ένα κλινικό τελικό σημείο.^[64]

Για την πιστοποίηση της ποιότητας του βιοδείκτη αξιολογούνται αποδεικτικά στοιχεία της συσχέτισης μεταξύ βιοδείκτη και κλινικών αποτελεσμάτων. Τέλος, για την χρηστικότητα του βιοδείκτη πρέπει να αξιολογούνται οι αναλύσεις κατά περίπτωση για να εξασφαλιστεί η σωστή χρήση του βιοδείκτη και η αντικειμενικότητα των αποτελεσμάτων. Η όλη διαδικασία της αξιολόγησης του βιοδείκτη πρέπει διαρκώς να ανανεώνεται με βάση τα νέα δεδομένα που προκύπτουν στη διάρκεια της αξιολόγησης.

4.6 Περιορισμοί και μειονεκτήματα στη χρήση βιοδεικτών

Πιθανά προβλήματα που μπορεί να προκύψουν κατά τον προσδιορισμό ενός βιοδείκτη σχετίζονται με την εργαστηριακή ανάλυση των δειγμάτων. Τα σφάλματα μέτρησης που οφείλονται σε ανθρωπογενείς παράγοντες ή τα συστηματικά σφάλματα των οργάνων ενός εργαστηρίου, μπορούν να οδηγήσουν σε λανθασμένες μετρήσεις. Στα πιθανά λάθη συγκαταλέγεται και ο τρόπος λήψης ή αποθήκευσης του δείγματος, ακόμα και το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε από τη λήψη μέχρι την επεξεργασία. Στον ανθρώπινο παράγοντα και στη μεροληψία αποδίδονται, επίσης, λανθασμένα συμπεράσματα ως προς την αξιολόγηση ενός βιοδείκτη και τη συσχέτισή του με την εμπλεκόμενη νόσο. Ακόμα, στην αξιολόγηση και ερμηνεία ενός βιοδείκτη πρέπει να συνεκτιμώνται επιπλέον

παράγοντες, όπως το φύλο, η φυλή, η ηλικία, η διατροφή, κ.α., ώστε να προκύπτει ένα εξατομικευμένο συμπέρασμα για κάθε ασθενή. Στους παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν πριν την εξαγωγή συμπερασμάτων είναι και η σχέση ευαισθησίας-ειδικότητας, καθώς και η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου μέτρησης. Ακόμα, η αξιοπιστία ενός βιοδείκτη πρέπει να στηρίζεται στην έρευνα επαρκούς αριθμού περιστατικών, να υπάρχει επαναληψιμότητα για να μην εξάγονται μη ακριβή συμπεράσματα.

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση βιοδεικτών είναι συνήθως σωματικά υγρά εύκολης και ασφαλούς λήψης, όπως το αίμα και τα ούρα. Σε πιο εξειδικευμένες περιπτώσεις όμως, απαιτείται η λήψη εγκεφαλονωτιαίου υγρού, που ενέχει κινδύνους για τον ασθενή και μεγαλύτερη ταλαιπωρία.^[65]

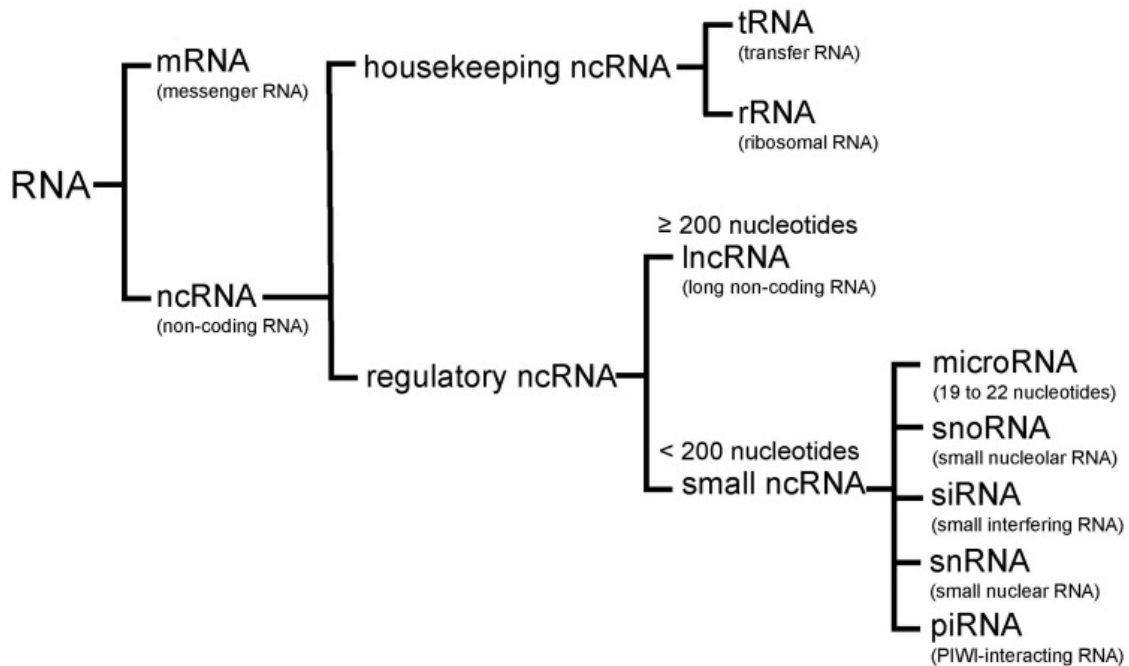
5. Μη κωδικοποιητικά RNAs

Για πολλές δεκαετίες, το RNA, ήταν, σύμφωνα με το κεντρικό δόγμα της βιολογίας, το προϊόν της μεταγραφής του DNA και η αποκωδικοποίησή του, γνωστή ως διαδικασία της μετάφρασης, παρείχε όλη την πληροφορία για την παραγωγή πρωτεϊνών. Κωδικοποιητικό RNA είναι το μεταφορικό RNA (mRNA), επιφορτισμένο με την ευθύνη να μεταγράψει περιοχές του γονιδιωματικού DNA και έπειτα να μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα, όπου αποτελεί το «καλούπι» για την μετάφραση των πρωτεϊνών. Και μπορεί το 90% του ανθρώπινου γονιδιώματος να μεταγράφεται, όμως, μόνο το 2% αυτών των μεταγράφων κωδικοποιούν τελικά κάποια πρωτεΐνη. Τα υπόλοιπα μετάγραφα δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες και αποτελούν τα *Μη-κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs)*, που είναι και το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας. Με την αυγή της νέας χιλιετίας, ο κατάλογος των ncRNAs εμπλουτίστηκε σημαντικά και συνεχίζει να εξελίσσεται.

Τα ncRNAs χωρίζονται σε 2 κατηγορίες: τα housekeeping ncRNAs και τα regulatory ncRNAs. Με τη σειρά τους, διακρίνονται σε επιπλέον υποκατηγορίες, ανάλογα με το μέγεθος και τη δράση τους. Στα housekeeping RNAs ανήκουν τα γνωστά για τη συμμετοχή τους στη διαδικασία της πρωτεϊνσύνθεσης tRNA (μεταφορικό RNA) και rRNA (ριβωσωμικό RNA). Αν και είναι ζωτικής σημασίας για τα κύτταρα, τα παραπάνω RNAs δεν αποτελούν αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας και για αυτό δεν θα αναλυθούν. Στα regulatory RNA συναντάμε 2 υποκατηγορίες: τα long non-coding RNA (lncRNA) και τα small non-coding RNA (small ncRNA). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 7 ακολουθεί περαιτέρω κατηγοριοποίηση των small ncRNA σε microRNA (miRNA), small nucleolar RNA (snoRNA), small interfering RNA (siRNA), small nuclear RNA (snRNA) και piwi-interacting RNA (piRNA).

Όλα τα παραπάνω είδη ncRNA διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στο μάτισμα, στη διατήρηση της πυρηνικής δομής, στη μεταφορά και τη μετάφραση. Βάσει των βασικών λειτουργιών τους, θα μπορούσαμε να πούμε ότι το tRNA, το rRNA, το snRNA και το snoRNA είναι σταθερής έκφρασης «δομικά» (housekeeping) ncRNAs, διότι συμμετέχουν στις διαδικασίες της μετάφρασης και του ματίσματος ενώ τα miRNA, siRNA και piRNA είναι ρυθμιστικά ncRNAs. Επιπλέον, η παρουσία τόσο των lncRNAs όσο και των small ncRNAs σε πολλές διαφορετικές ασθένειες μαρτυρά ότι η δράση τους έχει πολλαπλά επίπεδα.^[66]

Σαν ξεχωριστή κατηγορία ρυθμιστικών ncRNAs αξίζει να αναφερθούν τα κυκλικά RNAs (circRNAs). Παράγονται κατά τη διάρκεια του ματίσματος του πρόδρομου RNA (pre-RNA), όπου, αντί για γραμμικά μόρια RNA, προκύπτουν κυκλικά. Σε κάποιες άρθρα (Ebbesen KK, et al.) τα circRNAs αναφέρονται ως υποκατηγορία των lncRNA.^[85]



Εικόνα 7: Κατηγορίες RNA- Το RNA χωρίζεται σε κωδικοποιητικό RNA (μόνο το mRNA) και μη κωδικοποιητικό RNA (ncRNA). Τα ncRNAs χωρίζονται σε housekeeping ncRNAs, στα οποία ανήκουν το μεταφορικό RNA (tRNA) και το ριβοσωμικό RNA (rRNA) και σε regulatory ncRNAs, τα οποία με τη σειρά τους διακρίνονται σε long non-coding RNA (lncRNA) και small non-coding RNA (small ncRNA). Τα small ncRNA χωρίζονται σε microRNA (miRNA), small nucleolar RNA (snoRNA), small interfering RNA (siRNA), small nuclear RNA (snRNA) και piwi-interacting RNA (piRNA).^[67]

Πηγή: K.Inamura. Cells. (2017).

5.1 Small ncRNAs (sncRNAs)

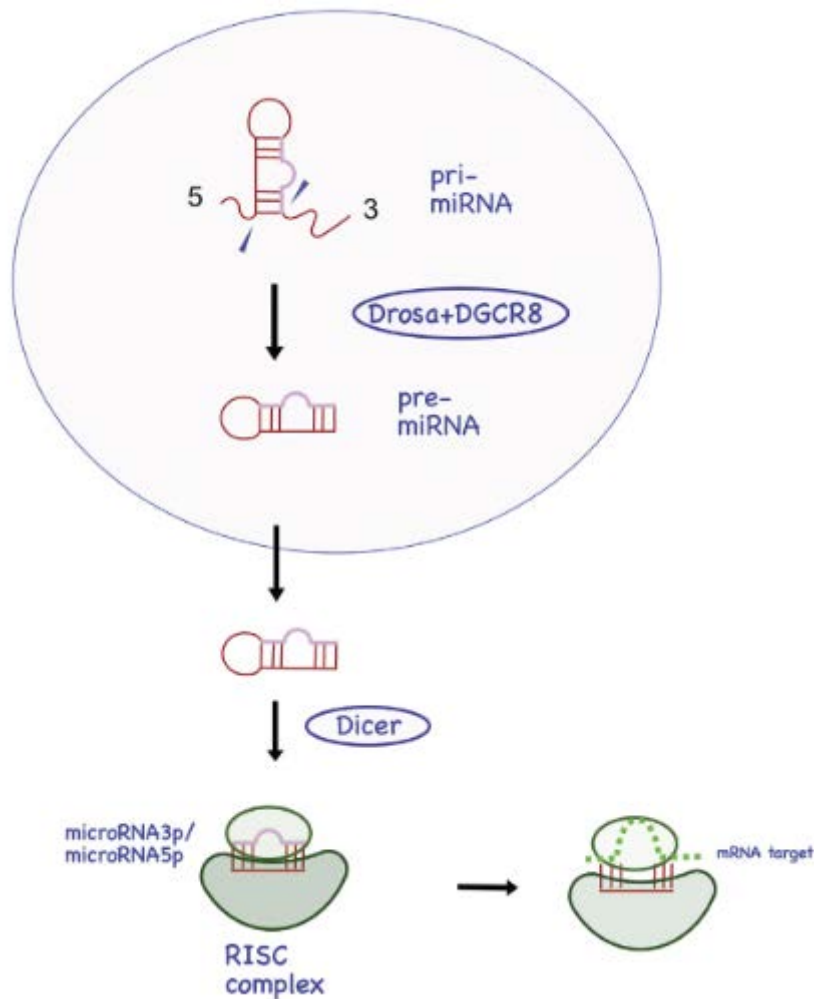
Τα small ncRNAs αποτελούνται από λιγότερα από 200 νουκλεοτίδια και θεωρούνται πλέον βασικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, με τα miRNAs, siRNAs και piRNAs και να είναι τα πιο διαδεδομένα. Διαφέρουν, όμως, στο τρόπο που δρουν, στη βιοσύνθεσή τους και στη ρύθμιση αυτής. Σε πολλές περιπτώσεις παρατηρείται συνεργασία μεταξύ τους για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και την διατήρηση της ακεραιότητας του

γονιδιώματος. Τα snRNAs και τα snoRNAs, ομοίως παρουσιάζονται σαν ρυθμιστές έκφρασης, αλλά συμμετέχουν και σε διαδικασίες, όπως η βιοσύνθεση rRNA και το μάτισμα.

5.1.1 miRNA

Βιογένεση και μηχανισμός δράσης

Τα περισσότερα miRNAs κωδικοποιούνται γονιδιωματικά και η RNA πολυμεράση II αναλαμβάνει τη μεταγραφή τους. Τα μετάγραφα προέρχονται από τα εσώνια και τα εξόνια κωδικοποιητικών ή μη-κωδικοποιητικών περιοχών, που συντίθενται από την RNA πολυμεράση II, από διάφορα τρανσποζόνια και από επεξεργασμένα ψευδογονίδια.^[68] Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία πρώιμων μεταγράφων (pri-miRNA) με δομή φουρκέτας, μέσα στην οποία περιέχεται η αλληλουχία του miRNA. Ακολουθεί επεξεργασία του pri-miRNA από ένα σύμπλεγμα που περιέχει την πρωτεΐνη DGCR8 (πρωτεΐνη που προσδένεται σε δίκλωνο RNA) και τη ριβονουκλεάση RNase III Drosha. Από τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση διασπάται ο βρόχος και απελευθερώνεται το pre-miRNA. Το pre-RNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της πρωτεΐνης exportin 5, έπειτα στον πυρήνα για να αλληλεπιδράσει και να απελευθερωθεί το υπόστρωμά του πάλι στο κυτταρόπλασμα, όπου η ενδονουκλεάση RNase III Dicer αποκόπτει τη θηλιά της φουρκέτας και απελευθερώνει ένα dsRNA. Στα θηλαστικά, εκτός από την RNase III Dicer συμμετέχει και ένας από τους δύο συμπαραγόντες TRBP ή PACT. Κάθε κλώνος του dsRNA προσδένεται στο σύμπλοκο RISC (RNA-induced-silencing-complex) και τελικό προϊόν της παραπάνω διαδικασίας είναι ένα μονόκλωνο, ώριμο miRNA, μήκους περίπου 21 νουκλεοτιδίων. Στο ώριμο miRNA προσδένεται μία πρωτεΐνη Ago, η οποία πρόκειται να οδηγήσει στο miRNA να προσδεθεί, βάσει συμπληρωματικότητας, στην αμετάφραστη περιοχή 3' των mRNA-στόχων. (Εικόνα 8). Για την πρόσδεση, η πρωτεΐνη TNRC6 στρατολογείται από την Ago και αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PABPC (σύνδεση poly(A)) στο 3' άκρο του mRNA.^[69]



Εικόνα 8: Η βιοσύνθεση των miRNAs- Τα miRNA μεταγράφονται στον πυρήνα ως πρόδρομα μόρια (pri-miRNAs) με δομή φουρκέτας. Τα pri-miRNA στη συνέχεια επεξεργάζονται από την RNase III Drosha και την πρωτεΐνη DGCR8 σε pre-miRNAs που εξάγονται στο κυτταρόπλασμα. Το pre-miRNA επεξεργάζεται από την RNase III Dicer και προκύπτει dsRNA περίπου 22 νουκλεοτιδίων, εκ των οποίων ο ένας κλώνος υποδεικνύεται ως 3p και ο άλλος ως 5p. Το ώριμο miRNA προσδένεται στο RISC και κατευθύνεται στο mRNA-στόχο για να προκληθεί καταστολή της έκφρασης του γονιδίου.^[73]

Πηγή: S. Panni. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* (2020)

Η παραπάνω διαδικασία είναι η συνηθέστερη για την παραγωγή miRNAs, όμως, υπάρχουν και εξαιρέσεις. Ορισμένα miRNA φαίνεται να κωδικοποιούνται από ένα σύμπλεγμα γονιδίων, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το σύμπλεγμα γονιδίων miR-17 ~ 92. Σε άλλες περιπτώσεις παρατηρείται απουσία της RNase III Drosha και της πρωτεΐνης DGCR8 από τη διαδικασία της βιογένεσης, με τα pre-miRNAs να προέρχονται από εσώνια. Αυτό το «μη-κανονικό» μονοπάτι βιογένεσης miRNA ονομάζεται mirtron. Το

pre-miRNA έπειτα θα ακολουθήσει το «κανονικό» μονοπάτι, με τη μεταφορά του στο κυτταρόπλασμα και την υπόλοιπη διαδικασία που αναλύθηκε παραπάνω.^[70]

Στους παράγοντες ρύθμισης της επεξεργασίας του miRNA περιλαμβάνονται RBPs (RNA binding proteins), παράγοντες ματίσματος και άλλοι παράγοντες επεξεργασίας RNA, που δρουν ως μετα-μεταγραφικά. Μία RBP μπορεί να συνδεθεί με ένα στέλεχος ενός pri-miRNA ή στο βρόχο που διαθέτει και το αποτέλεσμα μπορεί να είναι είτε θετικό είτε αρνητικό.

Ο φυσιολογικός τους ρόλος

Ο βασικότερος ρόλος των miRNAs είναι να δεσμεύονται από mRNA-στόχους και να προκαλούν καταστολή της έκφρασής τους, μέσω του συμπλόκου σίγησης RISC ή αποικοδόμηση. Εκτιμάται ότι το 60% των mRNAs διαθέτουν θέσεις πρόσδεσης για miRNA. Τα miRNAs είναι μερικώς συμπληρωματικά με τις περιοχές πρόσδεσης των mRNA και έχει αποδειχθεί ότι εκατοντάδες διαφορετικά mRNAs αποτελούν στόχο για ένα συγκεκριμένο miRNA και αντίστοιχα ένα mRNA μπορεί να αποτελέσει στόχο για πολλά διαφορετικά miRNAs. Αυτό καθιστά πολύπλοκο το ρυθμιστικό τους μηχανισμό, ο οποίος μεταξύ άλλων περιλαμβάνει την ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, διαφοροποίησης και απόπτωσης. Συνεπώς, τυχόν αλλαγές στην έκφραση, ή στις θέσεις-στόχου των miRNAs μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Έχει αποδειχθεί ότι μη σωστή ρύθμιση της έκφρασης των miRNA παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα και όχι μόνο. Η συμμετοχή κάποιων miRNAs επιβεβαιώνεται σταδιακά σε καρδιακές παθήσεις και ψυχικές διαταραχές όπως η σχιζοφρένεια. MiRNA συναντώνται επίσης στους πυρήνες των κυττάρων των θηλαστικών και συνδέονται με τη σίγαση της χρωματίνης σε συγκεκριμένους τόπους.^[71,72]

Τα miRNA υπολογίζεται ότι αντιπροσωπεύουν το 1-5% του ανθρώπινου γονιδιώματος και είναι ρυθμιστές τουλάχιστον για το 30% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες.

5.1.2 siRNA

Βιογένεση και μηχανισμός δράσης

Τα siRNAs προέρχονται κυρίως από εξωγενή dsRNAs, τρανσποζόνια, ιούς ή DNA ετεροχρωματίνης. Υπάρχουν βέβαια και siRNAs προερχόμενα από ενδογενείς

γονιδιωματικούς τύπους, τα οποία διαχωρίζονται από τα εξωγενή siRNA από την παρουσία πυρινηκής φάσης.

Το κύριο μονοπάτι για τη βιοσύνθεση των siRNAs είναι όμοιο στο μεγαλύτερο μέρος του με αυτό των miRNA, για αυτό και τα siRNAs έχουν περίπου ίδιο μήκος με τα miRNAs, δηλαδή της τάξης των 20-25 νουκλεοτιδίων, έχουν παρόμοια σύσταση και μηχανισμούς δράσης. Στη διαδικασία της βιοσύνθεσης συναντάμε τα ένζυμα RNase III Dicer που αποκόπτουν τα τμήματα siRNA από τα πρόδρομα μόριά τους. Οι διαφορές τους, όμως, είναι εκείνες που δίνουν στα siRNAs τη δυνατότητα να επιτελούν κι άλλες διαδικασίες, πέρα από την ρύθμιση της έκφρασης.^[74]

Εκτός από τη διαφορετική προέλευση, τα μεταγραφώματα συχνά παρουσιάζουν διαφορετική δομή, με τα πρώιμα miRNAs να έχουν τη δομή φουρκέτας, ενώ τα αντίστοιχα siRNAs να προέρχονται από μακρά dsRNA ή εκτεταμένες φουρκέτες. Έχει αποδειχθεί ότι τα ενδογενή siRNAs προέρχονται από εκτεταμένες δομές φουρκέτας και τα εξωγενή από μακρά dsRNA. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να προκύπτουν πολλαπλά siRNAs, εν αντιθέσει με τα pre-mRNAs που παράγουν ένα μοναδικό dsRNA. Να σημειωθεί ότι τα siRNAs φέρουν, όπως τα miRNAs, σύμπλοκο σίγησης RISC καθώς και πρωτεΐνη Ago και προσδένονται σε mRNA-στόχους με σκοπό την καταστολή τους. Η σύζευξη με τα mRNA-στόχους γίνεται βάσει πλήρους συμπληρωματικότητας των βάσεων, διότι τα siRNAs στοχεύουν σε μόρια όμοια με αυτά από τα οποία προήλθαν, δηλαδή τρανσποζόνια, ιούς, κλπ. Συνεπώς, τα siRNAs διατηρούνται δυσκολότερα στους οργανισμούς σε σχέση με τα miRNAs που συνδέονται πολλές φορές βάσει μερικής συμπληρωματικότητας με τα mRNA-στόχους.^[75]

Ο φυσιολογικός τους ρόλος

Λόγω της πρόσδεσης των siRNAs στους ιούς και τα τρανσποζόνια, ο κύριος ρόλος τους είναι η διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος, καθώς καταστέλλουν τα νουκλεϊκά οξέα που εισβάλλουν στον οργανισμό και δεν επιτρέπουν την έκφρασή τους. Μάλιστα, έχουν εντοπιστεί ενδογενή siRNA που συμβάλλουν στη διατήρηση της υγείας των γεννητικών κυττάρων στα θηλυκά θηλαστικά, μέσω καταστολής τρανσποζονίων.^[69]

5.1.3 piRNA

Βιογένεση και μηχανισμός δράσης

Τα piRNAs στα θηλαστικά προέρχονται κυρίως από τρανσποζόνια που περιέχονται σε συστάδες γονιδίων, οι οποίες μπορούν να δημιουργούν piRNA μόνο από έναν γονιδιωματικό κλώνο ή και από τους δύο. Μάλιστα, όπως έχει παρατηρηθεί στη *Drosophila*, οι συστάδες γονιδίων διαθέτουν μνήμη από προηγούμενη εισβολή τρανσποζονίων.

Αρχικά, τα piRNA μεταγράφονται ως μακρά πρωτογενή RNA και έπειτα από επεξεργασία μετατρέπονται σε πρωτογενή και δευτερογενή piRNA. Για να συμβεί αυτό, η βιοσύνθεσή τους ακολουθεί δύο μονοπάτια: την πρωτογενή οδό ρύθμισης και τη δευτερογενή οδό, που είναι γνωστή ως βρόχος ping-pong. Σε σύγκριση με τη βιοσύνθεση των miRNAs και των siRNAs, οι κύριες διαφορές αφορούν στην απουσία δράσης του ενζύμου RNase III Dicer και την παρουσία των πρωτεϊνών PIWI, υποοικογένειας των πρωτεϊνών AGO.

Η πρωτογενής οδός λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα. Εκεί, τα μακρά πρωτογενή RNA επεξεργάζονται από την ενδονουκλεάση Zuc, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων και τα διασπά σε μικρότερα τμήματα πρόδρομου piRNA, μήκους περίπου 25 νουκλεοτιδίων το καθένα. Έπειτα, η πρωτεΐνη Piwi ενσωματώνεται στο 5' άκρο αυτών των τμημάτων. Στην παραγωγή των ώριμων piRNAs σημαντικό ρόλο τα σώματα Yb, που επίσης βρίσκονται στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων καθώς και οι πρωτεΐνες Minotaur(Mino) and GasZ. Τελικά, μέσω της δράσης μίας εξωνουκλεάσης 3'-5', τα πρόδρομα piRNAs διαμορφώνονται σε ώριμα piRNAs. Ακολουθεί η 2'-O-μεθυλίωση του 3' άκρου του piRNA από τη μεθυλοτρανσφεράση DmHen1/Pimet, με αποτέλεσμα την παραγωγή συμπλόκων Piwi-piRNA. Αυτά τα λειτουργικά σύμπλοκα μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου κατευθύνουν τη μεθυλίωση της ιστόνης 3 λυσίνης 9 (H3K9me3) στη χρωματίνη στους τόπους των τρανσποζονίων-στόχων, ακολουθεί ο σχηματισμός ετεροχρωματίνης, με αποτέλεσμα τη μεταγραφική σίγησή των τρανσποζονίων.

Στη δευτερογενή οδό η πρωτεΐνες Aub και Ago3 αναλαμβάνουν τη διάσπαση τρανσποζονίων με πρόσδεση στο antisense και sense μετάγραφο, αντίστοιχα, του τρανσποζονίου. Το νέο sense piRNA που προκύπτει συνδέεται με την πρωτεΐνη Ago3 στο 3' άκρο του, η οποία μπορεί να διασπάσει μετάγραφα συστάδων ενώ τα antisense piRNA που συνδέονται με τις πρωτεΐνες Aub προκαλούν τον κατακερματισμό των

συμπληρωματικών μεταγράφων των τραπεζονίων, οδηγώντας στο κύκλο με το όνομα “βρόχος ring-pong”. Ως αποτέλεσμα, παρατηρείται η παραγωγή επιπλέον piRNAs.

Ο φυσιολογικός τους ρόλος

Τα piRNAs στα θηλαστικά εκφράζονται στα γεννητικά κύτταρα και η καταστολή των τραπεζονίων που επάγουν συμβάλλει στη διατήρηση της σταθερότητας και της ακεραιότητας των γαμετών. Φαίνεται, μάλιστα, να ειδικεύονται στην καταστολή τραπεζονίων που εμφανίζονται στους όρχεις των θηλαστικών. Σε ποντίκια, έχει παρατηρηθεί ότι κάποια ρετροτραπεζονία στα αρσενικά γεννητικά κύτταρα επηρεάζουν την γαμετογένεση. Τα piRNA που παράγονται στην ωοθήκη είναι εξίσου σημαντικά, κληρονομούνται στο έμβρυο και αποτελούν βασικούς φορείς επιγενετικής πληροφορίας, προστατεύοντας έτσι το έμβρυο από εισαγωγή επικίνδυνων τραπεζονίων. Επίσης, παρέχουν την πληροφορία για τον γενετικό τόπο που παράγει piRNAs.^[76,77]

5.1.4 snRNA

Βιογένεση και μηχανισμός δράσης

Τα snRNAs είναι μη πολυαδενυλιωμένα μετάγραφα, μήκους περίπου 150 νουκλεοτιδίων, που βρίσκονται στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων και συγκεκριμένα στο νουκλεόπλασμα. Ανάλογα με τις πρωτεΐνες Sm που προσδένονται σε αυτά, τα snRNAs χωρίζονται σε 2 κατηγορίες: τα Sm-class RNAs και τα Lsm-class RNAs. Οι πρωτεΐνες Sm είναι πολλές, οι U1, U2, U4, U4_{atac}, U5, U11 και U12 εμφανίζονται στα Sm-class RNAs, ενώ οι U6 και U6_{atac} εμφανίζονται στα Lsm-class RNAs. Οι διαφορές ανάμεσά τους αφορούν στον τρόπο με τον οποίο μεταγράφονται και τον τρόπο λειτουργίας τους. Τα μεν Sm-class RNAs μεταγράφονται από μία εξειδικευμένη RNA πολυμεράση II (Pol II) και ακολουθούν μία πορεία από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα για να προκύψει το τελικό προϊόν, ενώ τα Lsm-class RNAs μεταγράφονται από την Pol III με τη συμβολή ειδικών εκκινητών και δεν εγκαταλείπουν ποτέ τον πυρήνα. Οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες (RNPs) που προκύπτουν από την σύνθεση και κατεργασία των snRNAs έχουν σημαντική δράση.

Η βιοσύνθεση των Sm-class RNAs ξεκινάει με τη μεταφορά των μεταγράφων pre-snRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, με τη βοήθεια ενός συμπλόκου που αποτελείται από

την πρωτεΐνη πρόσδεσης PHAX, τον υποδοχέα εξαγωγής exportin-1 (CRM1), το σύμπλεγμα CBC για την πρόσδεση καλύμματος και την Ran GTPase. Στο κυτταρόπλασμα πραγματοποιείται απομάκρυνση του συμπλόκου από το pre-snRNA, μέσω δέσμευσης ενός άλλου συμπλόκου, του SMN (σύμπλοκο κινητικού νευρώνα), που προκαλεί αποφωσφορυλίωση του PHAX. Επίσης, το pre-snRNA συνδέεται με τις πρωτεΐνες Sm και έτσι ολοκληρώνεται το πρώτο βήμα για τη σύνθεση του πυρήνα μίας RNP. Έπειτα, δημιουργείται το κάλυμμα TGM-cap και το 3' άκρο κόβεται από άγνωστη εξωνουκλεάση. Αυτό κινητοποιεί το σύμπλοκο εισαγωγής, αποτελούμενο από τον προσδέτη εισαγωγής SPN και τον υποδοχέα εισαγωγής Imp-β, που θα οδηγήσει τις snRNPs πίσω στον πυρήνα. Εκεί θα δεσμευτούν από τα σωμάτια Cajal, τα οποία θα ολοκληρώσουν τη διαδικασία ωρίμανσης των πρωτεϊνών. Τέλος, οι snRNPs αποδεσμεύονται από τα σωμάτια Cajal και είτε συμμετέχουν απευθείας στο μάτισμα των ινιδίων της περιχρωματίνης ή αποθηκεύονται σε κοκκία διαχρωματίνης για μελλοντική χρήση.^[78]

Ο φυσιολογικός τους ρόλος

Οι πλούσιες σε ουριδίνη snRNPs εμπλέκονται στο μάτισμα και την απομάκρυνση των εσώνων από το pre-mRNA, μία διαδικασία που εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των snRNPs και των συνδέσμων εσώνιου- εξώνιου. Μεταλλάξεις στο γονίδιο του SMN οδηγούν σε σοβαρή μυϊκή απώλεια, λόγω εκφυλισμού των κινητικών νευρώνων της σπονδυλικής στήλης.

5.1.5 snoRNA

Βιογένεση και μηχανισμός δράσης

Τα snoRNAs μεταγράφονται είτε από ανεξάρτητες μονάδες μεταγραφής ή από snoRNA που κωδικοποιούνται από εσώνια. Σε ζυμομύκητες και φυτά, τα περισσότερα snoRNAs βρίσκονται ως ανεξάρτητα μεταγραφόμενα γονίδια, και η μεταγραφή τους γίνεται από την RNA πολυμεράση II ή III. Τα snoRNA που κωδικοποιούνται από εσώνια μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II και τους εκκινητές των γονιδίων- ξενιστών. Τα γονίδια αυτά μπορεί να είναι κωδικοποιητικά ή μη-κωδικοποιητικά.

Τα snoRNA χωρίζονται σε δύο ομάδες: τα C/D snoRNAs (SNORDs) έχουν συνήθως μήκος 60 έως 90 νουκλεοτίδια, τα H/ACA snoRNAs (SNORAs) μήκους από 120 έως 140

νουκλεοτιδίων. Υπάρχουν και τα μικρά ειδικά για τα σωμάτια Cajal RNA (SCARNA), που περιλαμβάνουν τα μοτίβα C/D και H/ACA σε ποικίλους συνδυασμούς και θα μπορούσαν να αποτελούν μία τρίτη ομάδα snoRNAs. Εντός του πυρήνα βρίσκονται τα SNORDs και μετά από ενσωμάτωση με RNPs συμβάλλουν στην τροποποίηση του rRNA. Ομοίως, τα SCARNAs εντοπίζονται στον πυρήνα και συγκεκριμένα προσδεμένα σε σωμάτια Cajal, με στόχο την τροποποίηση του U1 σε U6.

Η βιοσύνθεσή τους είναι όμοια με αυτή των snRNAs. Το μετάγραφο διαθέτει το 3' άκρο, το οποίο κόβεται από μία εξωνουκλεάση για να δημιουργηθούν τα ώριμα 3' άκρα. Το 5' άκρο συνδέεται με κάλυμμα m7G, το οποίο είτε αφαιρείται από την εξωνουκλεάση Rat1 και Xrn1 ή μετατρέπεται σε m2,2,7G από το TGS1. Σε αυτή την περίπτωση, το 5' άκρο κόβεται.^[79]

Ο φυσιολογικός τους ρόλος

Τα snoRNAs έχουν σαν στόχο την μετα-μεταγραφική τροποποίηση των ριβοσωμικών RNAs (rRNAs), μέσω της δημιουργίας συμπλεγμάτων ισχυρών ριβονουκλεοπρωτεϊνών RNPs.

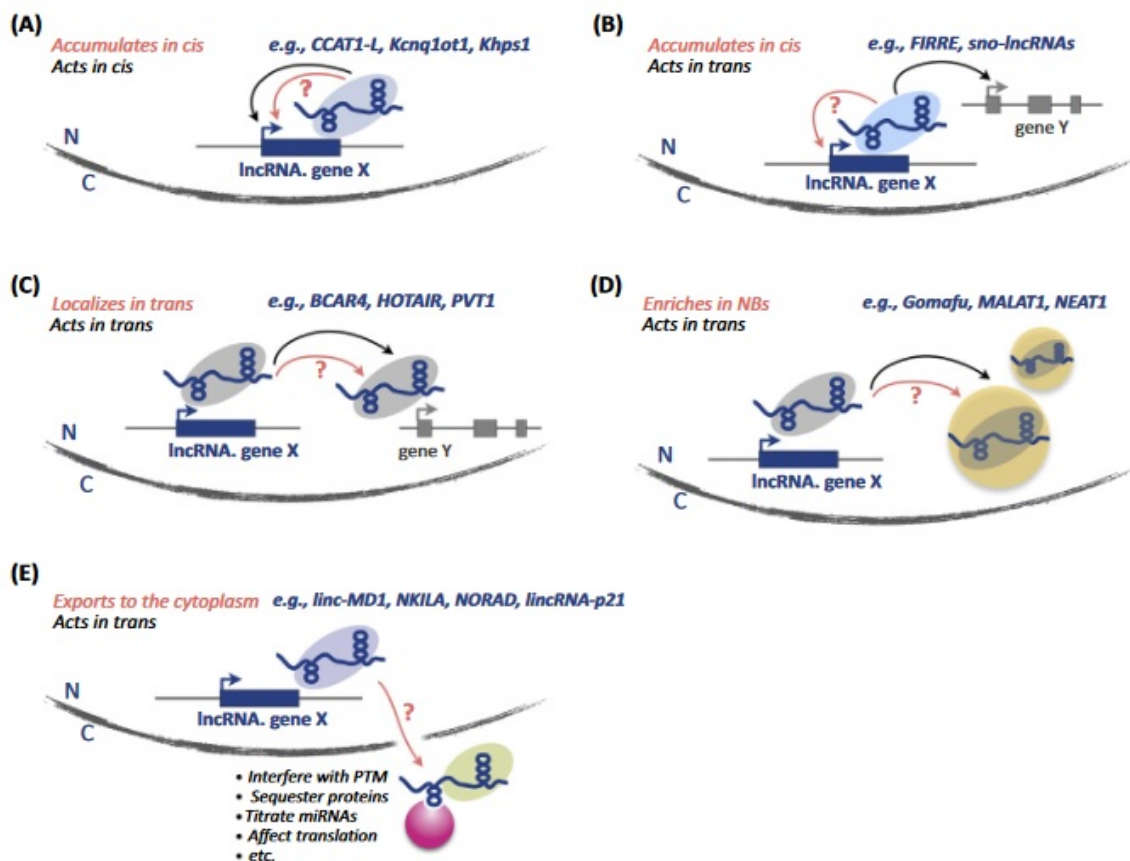
5.2 Long ncRNAs (lncRNAs)

Τα lncRNAs έχουν μήκος μεγαλύτερο από 200 νουκλεοτίδια και για πολλές δεκαετίες δεν είχε αξιολογηθεί η παρουσία τους. Τα lncRNAs παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με τα mRNAs, εμφανίζουν όμως μεγάλη ποικιλομορφία. Τα περισσότερα μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II, διαθέτουν 5' κάλυμμα και κάποια από αυτά μπορεί να είναι πολυαδενυλιωμένα ή όχι. Υπάρχουν όμως κι άλλοι τρόποι μεταγραφής, ανάλογα με την θέση των lncRNAs πάνω στο γονιδίωμα, που βοηθούν στην ταξινόμηση των lncRNAs σε 5 κατηγορίες:

- i. *Νοηματικά (sense)*: όταν επικαλύπτονται ένα ή περισσότερα εξώνια ενός άλλου μετάγραφου στον ίδιο κλώνο
- ii. *Αντινοηματικά (antisense)*: όταν επικαλύπτονται ένα ή περισσότερα εξώνια ενός άλλου μετάγραφου στον αντίθετο κλώνο

- iii. *Αμφίδρομα (bidirectional)*: όταν η έκφραση του lncRNA και ενός γειτονικού κωδικοποιητικού μεταγράφου στον αντίθετο κλώνο ξεκινά σε στενή γονιδιωματική εγγύτητα
- iv. *Εσωνικά (intronic)*: όταν προέρχονται εξ ολοκλήρου από ένα εσώνιο ενός δεύτερου μεταγράφου
- v. *Διαγονιδιακά (intergenic)*: όταν βρίσκονται στο γονιδιωματικό διάστημα μεταξύ δύο γονιδίων. Είναι γνωστά και ως lincRNAs.^[80,81]

Τα μετάγραφα, έπειτα, εντοπίζονται είτε στον πυρήνα του κυττάρου, όπου λειτουργούν σε cis ή σε trans θέσεις ή στο κυτταρόπλασμα. Όταν εντοπίζονται σε cis και δρουν σε θέσεις cis στον πυρήνα (Εικόνα 9Α), είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Αυτό πραγματοποιείται με τη στρατολόγηση μεταγραφικών παραγόντων, με την οργάνωση ή τροποποίηση της χρωματίνης και με τη δημιουργία συμπλόκων DNA-RNA που δεσμεύουν το lncRNA και τις κατάλληλες πρωτεΐνες στο γονίδιο που ρυθμίζεται. Η άλλη περίπτωση είναι να εντοπίζονται σε cis, αλλά να επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση σε θέσεις trans στον πυρήνα (Εικόνα 9Β), εκμεταλλευόμενα την τρισδιάστατη οργάνωση των χρωμοσωμάτων, η οποία επιτρέπει στα ρυθμιστικά στοιχεία να αλληλεπιδράσουν με το γονιδιακό τόπο ή δεσμεύοντας πρωτεΐνες RBPs. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση των lncRNA που εντοπίζεται επίσης στον πυρήνα, αλλά δρουν σε trans, οπότε ρυθμίζουν γονίδια από θέσεις εκτός της δικής τους (Εικόνα 9C). Επίσης, ιδιαίτερη είναι η περίπτωση lncRNA που συσσωρεύονται σε συγκεκριμένα πυρηνικά σωμάτια (Εικόνα 9D), που δεν διαθέτουν μεμβράνη και μαζί με κατάλληλες πρωτεΐνες ρυθμίζουν κάποιες πυρηνικές διεργασίες. Τέλος, τα lncRNAs μπορούν να μεταφερθούν στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 9Ε), όπου επηρεάζουν σε κάποιες περιπτώσεις τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών. Η εξαγωγή τέτοιων lncRNA θεωρείται ότι έχει παρόμοιους μηχανισμούς με αυτούς των mRNA, αλλά με τη συμμετοχή διαφορετικών πρωτεϊνών. Τα lncRNAs μπορούν, ακόμα, να επηρεάσουν τη σταθερότητα των mRNAs και να οδηγήσουν στην αποικοδόμηση τους, λειτουργώντας μάλιστα ανταγωνιστικά απέναντι στα miRNAs.^[82]



Εικόνα 9: Οι λειτουργίες των μακρών μη κωδικοποιημένων RNA (lncRNAs) σχετίζονται με την θέση τους στο κύτταρο. (A) Τα lncRNAs μπορούν να συσσωρευτούν και να δράσουν σε cis μόλις μεταγραφούν. (B) Τα lncRNAs μπορούν να συσσωρευτούν στο cis μόλις μεταγραφούν, αλλά δρουν σε trans που επηρεάζουν τα γονίδια που βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα σε απόσταση ή σε διαφορετικά χρωμοσώματα. (C) Τα lncRNAs μπορούν να εντοπιστούν αλλού στο νουκλεόπλασμα σε trans και να δράσουν σε trans. (D) Τα lncRNAs μπορούν να συσσωρευτούν σε συγκεκριμένα πυρηνικά σώματα (πορτοκαλί κύκλοι) και να δράσουν σε trans. (E) Τα lncRNA μπορούν να εξαχθούν στο κυτταρόπλασμα για να εκτελέσουν τις λειτουργίες τους. Για παράδειγμα, ένα κυτταροπλασματικό lncRNA μπορεί να δεσμεύσει πρωτεΐνη (ροζ κύκλος) ή να παρέμβει στη μετα-μεταφραστική τροποποίηση πρωτεΐνης (PTM).

Πηγή: LL. Chen. Trends Biochem Sci. (2016).

5.3 Κυκλικά ncRNAs (circRNAs)

Βιογένεση και μηχανισμός δράσης

Τα circRNAs δημιουργούνται στους ευκαρυώτες- και όχι μόνο- κατά τη διαδικασία του ματίσματος των pre-mRNAs, στη διάρκεια της οποίας, αντί να προκύψει ένα γραμμικό mRNA, δημιουργείται ένα μονόκλωνο κυκλικό RNA, τα άκρα του οποίου ενώνονται με

φωσφοδιεστερικό δεσμό. Υπεύθυνη για τη μεταγραφή των circRNAs είναι η RNA πολυμεράση II.

Ο κύριος μηχανισμός για τη δημιουργία circRNA είναι το ανάποδο μάτισμα, που οδηγεί σε σύζευξη εξωνίων που βρίσκονται σε πλευρικά εσώνια. Ο βρόχος δημιουργείται από το πλησίασμα του 5' άκρου του δότη ματίσματος και του 3' άκρου του λήπτη ματίσματος, που καταλήγει σε σύζευξη βάσεων μεταξύ ανεστραμμένων επαναλαμβανόμενων στοιχείων (όπως στοιχεία Alu). Αυτού του είδους τα circRNAs βρίσκονται στον πυρήνα των κυττάρων, όπου παραμένουν για να ρυθμίσουν τη μεταγραφή του γονιδίου από το οποίο προέρχονται. Η αποτελεσματικότητα των αντιδράσεων του ανάποδου ματίσματος ρυθμίζεται περαιτέρω από πρωτεΐνες δέσμευσης RBPs, οι οποίες προσδένονται στην ένωση εσωνίων- εξωνίων. CircRNAs παράγονται και από παράληψη των εξωνίων σύζευξης. Σε αυτή την περίπτωση, τα εξώνια που παρακάμπτονται από το τελικό mRNA δημιουργούν θηλιές, που με τη σειρά τους οδηγούν στη δημιουργία circRNA ή τα εσώνια που αποκόπτονται και δεν υφίστανται αποκλάδωση σχηματίζουν ένα circRNA, που περιέχει ένα εξώνιο τουλάχιστον. Πολλά από αυτά τα circRNAs δεν θα παραμείνουν στον πυρήνα, θα μεταφερθούν στο κυτταρόπλασμα, παρόλο που δεν διαθέτουν πολυαδενυλιωμένο 5' άκρο ή κάλυμμα. Γενικά, τα circRNAs θεωρούνται ανθεκτικά RNAs, καθώς οι εξωνουκλεάσες δύσκολα αποικοδομούν τα κυκλικά μόρια RNA. Η διάσπασή τους, λοιπόν, γίνεται περιορισμένα με τη δράση ορισμένων μόνο ενδονουκλεασών και για αυτό έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής.^[83]

Ο φυσιολογικός τους ρόλος

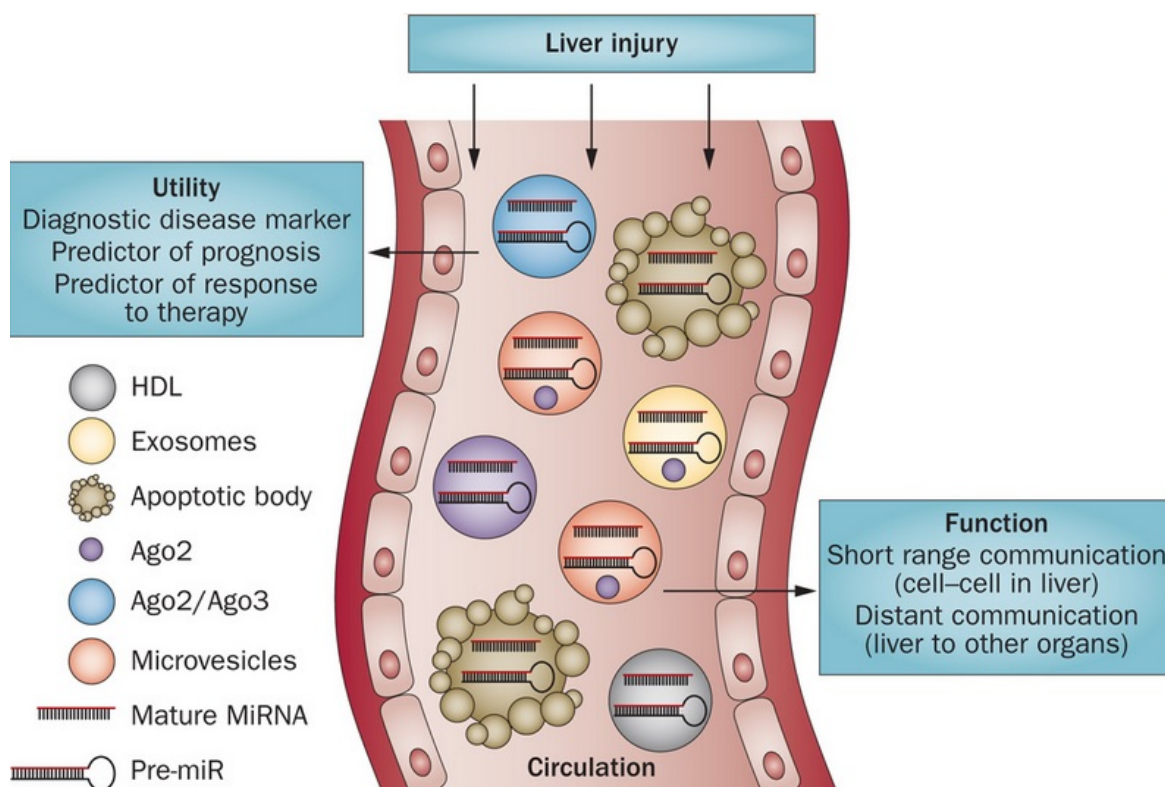
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα circRNAs που παραμένουν στον πυρήνα βοηθούν στη ρύθμιση της έκφρασης των γονικών τους γονιδίων. Αν και πολλές άλλες λειτουργίες των circRNA παραμένουν άγνωστες, η πιο γνωστή μέχρι σήμερα είναι η συμμετοχή τους στη ρύθμιση των miRNA. Κάποια circRNAs διαθέτουν πολλές θέσεις πρόσδεσης για τα miRNA και δρουν ως "σφουγγάρια", που δεσμεύουν τα miRNAs και δεν τους επιτρέπουν να προσδεθούν στα mRNA-στόχους. Ως "σφουγγάρια" συμπεριφέρονται και για πρωτεΐνες RBPs και τα προϊόντα αυτής της ένωσης είναι σύμπλοκα circRNPs, τα οποία επηρεάζουν τη μετάφραση και τη δράση της πρωτεΐνης. Τέλος, πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι, παρόλο που τα circRNAs στερούνται 5' καλύμματος, μπορούν να προσδεθούν στα ριβοσώματα, μέσω ειδικών θέσεων (IRES) που διαθέτουν και να μεταφραστούν.^[84]

6. Ηπατικές νόσοι και μη κωδικοποιητικά RNAs

Τα RNAs όλων των ειδών έχουν μελετηθεί διεξοδικά στο φυσικό τους περιβάλλον, το κύτταρο, όπου προστατευμένα από νουκλεάσες, εκτελούν πολλές διεργασίες. Η ανίχνευσή τους στα σωματικά υγρά αποτέλεσε έκπληξη και η μελέτη τους οδήγησε στη χρήση των κυκλοφορούντων RNAs ως αξιόπιστους διαγνωστικούς και θεραπευτικούς βιοδείκτες.

Οι τρόποι που τα RNAs απελευθερώνονται από τα κύτταρα είναι πολλαπλοί. Σε πολλές περιπτώσεις η απελευθέρωση έπεται της κυτταρικής νέκρωσης. Στη φάση της απόπτωσης του κυττάρου απορρίπτονται πολλές κυτταρικές δομές και το RNA συσκευάζεται σε κυστίδια και αποπτωτικά σωμάτια. Τα κύτταρα φαίνεται να απελευθερώνουν mRNA στα κυστίδια, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Με αυτό τον τρόπο φτάνει προστατευμένο στον εξωκυττάριο χώρο. Κάποια μικροκυστίδια απελευθερώνονται και από υγιή κύτταρα στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, όπου πλέον αναγνωρίζονται ως συστατικό μέρος του μεσοκυττάριου περιβάλλοντος. Αυτά τα μικροκυστίδια έχουν την μορφή κυστιδίων, εφόσον σχηματίζονται από την άμεση εκβλάστηση της πλασματικής μεμβράνης και τη μορφή εξωσωμάτων, όταν είναι προϊόντα ενδοκυττάρωσης, που ακολουθείται από την εκβλάστηση της ενδοσωμικής μεμβράνης προς τα μέσα. Τα εξωσώματα είναι μικρότερου μεγέθους από τα υπόλοιπα εξωκυτταρικά κυστίδια και παίζουν ρόλο στην κυτταρική επικοινωνία που σκοπό έχει την ανταλλαγή πρωτεϊνών και γενετικού υλικού μεταξύ των κυττάρων. Όσον αφορά στα ηπατικά κύτταρα, τα περισσότερα από αυτά απελευθερώνουν εξωσώματα, που επιτρέπουν στο ήπαρ να επικοινωνεί ακόμα και με απομακρυσμένα όργανα. Η εμβέλεια της διακυτταρικής επικοινωνίας εξαρτάται από το φορτίο που υπάρχει στα εξωσώματα, το οποίο μπορεί να είναι νουκλεϊκά οξέα ή πρωτεΐνες.

Στην περίπτωση των miRNAs, η μεταφορά τους στον εξωκυττάριο χώρο και το πλάσμα του αίματος σχετίζεται με την πρόσδεσή τους σε πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Αργοναύτης Ago2 αποτελεί τον κύριο μεταφορέα του miRNA στο πλάσμα, όπου το μεταξύ τους σύμπλοκο παραμένει ανιχνεύσιμο έως και δύο μήνες μετά τον κυτταρικό θάνατο. Ανάλογα τον ιστό προέλευσης των κυττάρων, σε κάποιες περιπτώσεις και οι πρωτεΐνες Ago1, Ago3 και Ago4, φαίνεται επίσης να έχουν το ρόλο του μεταφορέα miRNA. Τέλος, κάποιες λιποπρωτεΐνες εμφανίζονται με το ίδιο ρόλο.^[86] Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 30: Τα κυκλοφορούντα miRNA (ώριμα ή πρόδρομα) μπορούν να απελευθερωθούν μέσα σε εξωσώματα, μικροκυστίδια, HDL, αποπτωτικά σώματα και με πρωτεΐνες (Ago2).^[88]

Πηγή: G. Szabo et al. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* (2013)

Τα lncRNAs μπορούν, επίσης, να ανιχνευθούν στο πλάσμα και τον ορό του αίματος και επιδεικνύουν ανθεκτικότητα ακόμα και σε φυσικές, χημικές ή βιολογικές μεταβολές. Τα πιο καλά μελετημένα κυκλοφορούντα RNAs που εμφανίζονται στις ηπατικές ασθένειες ανήκουν στις κατηγορίες των miRNA, lncRNA και circRNA. Παρακάτω, αναλύονται τα κυκλοφορούντα ncRNAs που χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες ανά ηπατική νόσο.^[87]

Κλινικός προσδιορισμός ncRNAs

Η ανάδυση των ncRNAs σαν βιοδείκτες γίνεται με αλληλούχιση. Η αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS) αποτελεί κύριο τρόπο προσδιορισμού του προφίλ ενός νουκλεϊκού οξέος και δίνει τη δυνατότητα να ανιχνεύονται αλλαγές στην αλληλουχία, ακόμα και σε επίπεδο ενός νουκλεοτιδίου. Στην περίπτωση των ncRNAs, η NGS έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει μόρια με μεγαλύτερη ευαισθησία, ειδικότητα και προγνωστική ικανότητα για την ανίχνευση ασθενειών. Η κατασκευή βιβλιοθήκης αλληλουχιών μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας μια ποικιλία διαφορετικών κιτ ανάλογα με την

πλατφόρμα αλληλουχίας που χρησιμοποιείται. Για τα microRNAs, παραδείγματος χάριν, ευρέως διαδεδομένη είναι η microRNA-seq. Το βασικό μειονέκτημα των μεθόδων αλληλούχησης είναι το υψηλό κόστος και ο εξειδικευμένος εξοπλισμός.

Ωστόσο στην κλινική τους χρήση ο προσδιορισμός τους γίνεται με real-time PRC. Στην περίπτωση των κυκλοφορούντων microRNAs, προτιμάται η ποσοτική PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR), λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της ειδικότητας. Η ίδια μέθοδος αναφέρεται και στον προσδιορισμό των lncRNAs. Επιπλέον, η ποσοτικοποίηση των κυκλοφορούντων lncRNAs γίνεται και με real-time PRC, κάνοντας χρήση της χρωστικής SYBR Green, η οποία δεσμεύεται σε ειδικές θέσεις στο δίκλωνο αμπλικόνιο και εκπέμπει φθορισμό ανάλογο με την ποσότητα των προϊόντων της PCR.

6.1 Για τις αλκοολικές ηπατικές νόσους

Τα miRNA στα ηπατοκύτταρα ρυθμίζουν τη στεάτωση, ενώ στα κύτταρα Kupffer παράγουν μια προφλεγμονώδη κατάσταση, διαιωνίζοντας την ηπατική βλάβη. Η αιθανόλη και οι μεταβολίτες της είναι η κύρια αιτία απορρύθμισης του miRNA.

Τα κυκλοφορούντα miRNAs είναι οι πιο διαδεδομένοι και σταθεροί βιοδείκτες που ανιχνεύονται μη επεμβατικά στο αίμα και μαρτυρούν την έναρξη της ηπατικής βλάβης, πριν εκείνη γίνει κλινικά εμφανής. Η επίδραση της κατανάλωσης αιθανόλης μπορεί να αποκαλυφθεί με τον ποσοτικό προσδιορισμό των miRNAs που κυκλοφορούν στον ορό ή στο πλάσμα του αίματος. Τα miRNAs έχουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία του ήπατος και η απορρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας τους οδηγεί σε συμπεράσματα σχετικά με την ηπατική βλάβη.

Το γνωστότερο miRNA είναι το miR-122, που αποτελεί το 70% των miRNAs στα ηπατοκύτταρα και στην περίπτωση ηπατικής βλάβης ανιχνεύεται σε αυξημένες ποσότητες στον ορό ή στο πλάσμα του αίματος. Σε πολλές έρευνες παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση μεταξύ της ALT του ορού και του miR-122, γεγονός που αποδεικνύει την ποιότητα του miR-122 ως βιοδείκτη για την ηπατική βλάβη και όχι για την εξέλιξη της νόσου. Σε πειράματα με ποντίκια, στα οποία χορηγούνταν αλκοόλ, εκτός του miR-122, αυξημένες ήταν και οι τιμές των miR-30a και miR-192. Επιπλέον, το επίπεδο των miR-122, miR-30a και miR-192 φάνηκε αυξημένο στα εξωσώματα ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα. Η αξιοπιστία του miR-192, μάλιστα, επιβεβαιώνεται με ανάλυση της καμπύλης

ROC. Κλινικά και πειραματικά, το miR-182 σχετίζεται με βλάβη των χολαγγειοκυττάρων που σχετίζεται με την αλκοολική ηπατίτιδα και δείχνει την έκβαση της ασθένειας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το miR-155 που στο σύνολο των ηπατικών νόσων που σχετίζονται με την κατανάλωση αλκοόλ παρουσιάζει αυξημένη έκφραση, με εξαίρεση την αλκοολική ηπατίτιδα, όπου η έκφρασή του είναι μειωμένη. Στην αλκοολική ηπατίτιδα αυξημένα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν στο miR-223. Στην περίπτωση της αλκοολικής στεατοηπατίτιδας σε ζωικά μοντέλα παρατηρήθηκε αυξημένη ρύθμιση στην κυκλοφορία του αίματος για 25 microRNA και μειωμένη για 7 microRNA. Τα πιο χαρακτηριστικά όμως, που παρουσίασαν εξίσου μεταβολή της έκφρασης τόσο στον ηπατικό ιστό όσο και στην κυκλοφορία είναι τα: miR-185, miR199a-3p, miR-214 και miR-490. Άλλα microRNAs που παρουσίασαν αυξημένη έκφραση στην περίπτωση όλων των ALD είναι τα: miR-21, miR-34a και miR-320. Μειωμένη ρύθμιση αντίστοιχα έχει αναφερθεί στα: miR-199a, miR-200a και miR-181a.

Ως δείκτης για την κατάσταση του ήπατος πριν την ίνωση που προκαλείται από την κατανάλωση αλκοόλ, στα πρωτογενή αστροειδή κύτταρα, το miR-19b παρουσιάζει μειωμένη έκφραση, ενώ το pri-miR17-92 σημαντική αύξηση. Στο στάδιο που η αιθανόλη οδηγεί σε φλεγμονή, άλλη μελέτη έδειξε ότι η έκφραση του miRNA-155 και του miRNA-14 ήταν αυξημένη, καθώς επίσης και ότι η έκφραση miR-212 προκαλείται από την παρουσία αιθανόλης, η οποία θα μπορούσε να αυξήσει τη διαπερατότητα του εντέρου μέσω της μείωσης της πρωτεΐνης ZO-1. Τέλος, στη φάση που η ALD οδηγεί σε κυτταρική απόπτωση η έκφραση των miR-200a και miR-21 είναι αυξημένη.^[89,90]

Σύμφωνα με άλλη έρευνα, στο ήπαρ παρατηρείται αυξημένη έκφραση και σε άλλα miRNAs, όπως τα miR-132, miR-137, miR-214, miR-217, miR-486, miR-490, miR-705, miR-882 και miR-1224, στην κυκλοφορία του αίματος όμως, που είναι και το ζητούμενο, καταγράφονται μόνο τα miR-122, miR-155, miR-185, miR-199a-3p, miR-214 και miR-490. Στην ίδια εργασία, ως microRNAs με μειωμένη έκφραση στο ήπαρ αναφέρονται τα: Let-7a, Let-7b, Let-7g, miR-27b, miR-122, miR-127, miR-27b, miR-181a,b, miR-182 miR-183, miR-192 miR-199a-3p, miR-200a, miR-214, miR-322 και miR-871.^[91]

Στην κατηγορία των lncRNAs, το MALAT1 φαίνεται να εκφράζεται περισσότερο με την κατανάλωση αλκοόλ. Αυτή η αύξηση έχει συνδεθεί με την ωκυτοκίνη του πλάσματος, που επίσης εμφανίζεται αυξημένη στους αλκοολικούς. Όλα τα παραπάνω ncRNAs που αφορούν στις ALDs συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΤΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ NCRNAS ΠΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΟΥΝ ΑΥΞΗΣΗ Η ΜΕΙΩΣΗ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΙΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΕΣ ΗΠΑΤΙΚΕΣ ΝΟΣΟΥΣ (ALD) ΚΑΙ ΠΟΙΑ ΑΠΟ ΑΥΤΑ ΕΝΤΟΠΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Νόσος	Αυξημένη έκφραση	Μειωμένη έκφραση	Κυκλοφορούντα
ALD	miR-122, miR-30a miR-192, miR-185, miR199a-3p, miR-214, miR-132, miR-137, miR-214, miR-217, miR-486, miR-490, miR-705, miR-882 και miR-1224, miR-21, miR-34a, miR-320 MALAT1	Let-7a, Let-7b, Let-7g, miR-27b, miR-122, miR-127, miR-27b, miR-181a,b, miR-182 miR-183, miR-192 miR-199a-3p, miR- 200a, miR-214, miR- 322 και miR-871	miR-122 miR-155 miR-185 miR-199a-3p miR-214 miR-490
Αλκοολική στεατοηπατίτιδα/ Αλκοολική ηπατίτιδα	miR-182	miR-155	miR-30a miR-192

6.2 Για τις Μη αλκοολικές ηπατικές νόσους

Σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό, στο αίμα των ασθενών με NAFLD έχουν παρατηρηθεί σε υψηλή συγκέντρωση τα εξής miRNAs: miR-122, miR-34a και miR-16. Τα miR-122 και miR-34a θεωρούνται κατάλληλοι δείκτες για την εξέλιξη της NAFLD και σχετίζονται με τη στεάτωση. Φαίνεται ότι τα συγκεκριμένα miRNAs αυξάνονται αναλογικά με το βαθμό της στεάτωσης και εμφανίζουν μεγαλύτερη διαφορά στους ασθενείς με στεατοηπατίτιδα. Σε άλλη μελέτη αναφέρεται αυξημένο και το miR-21 στον ορό του αίματος, αλλά αμφισβητείται η ειδικότητά του, καθώς θα μπορούσε να συσχετιστεί και με άλλες

ασθένειες του ήπατος. Στην ίδια μελέτη αναφέρονται και κάποια εξωσωματικά miRNAs, ως πιο σταθερά στην κυκλοφορία του αίματος συγκριτικά με τα ελεύθερα. Ως πιο χαρακτηριστικά αναφέρονται τα: miR-128-3p, miR-192-5p, miR-223 και miR-155. Στα πλαίσια έρευνας που τα δείγματα ασθενών με NAFLD υπεβλήθησαν σε τεχνική αλληλούχισης, 6 miRNAs και πιο συγκεκριμένα τα miR-122-5p, miR-1290, miR-27b-3p, miR-192-5p, miR-148a-3p και miR-99a-5p, ρυθμίστηκαν προς τα πάνω. Επικύρωση έγινε για τα miR-122-5p, miR-1290, miR-27b-3p και miR-192-5p σε ένα ανεξάρτητο δείγμα, που περιλάμβανε 152 επιβεβαιωμένους ασθενείς με NAFLD και 90 υγιή δείγματα.^[92]

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Fang Z. et al., στην οποία καταγράφονται τα miRNAs με διαφορετική έκφραση στο ήπαρ των ασθενών με NAFLD σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό, καθώς και ποια από αυτά σημειώνουν μεταβολή των επιπέδων τους στην κυκλοφορία του αίματος. Όσον αφορά στα miRNAs που ρυθμίζουν το μεταβολισμό λιπιδίων στην NAFLD αύξηση στην έκφραση στο ήπαρ σημειώνουν τα: miR-21, miR-122, miR-34a, miR-125b, miR-29a, miR-132, miR-155, miR-378. Τα 5 πρώτα (miR-21, miR-122, miR-34a, miR-125b, miR-29a) έχουν την ίδια συμπεριφορά και στην κυκλοφορία του αίματος, ενώ για τα 3 τελευταία (miR-132, miR-155, miR-378) δεν υπάρχουν δεδομένα για τα επίπεδά τους στην κυκλοφορία. Αντίθετα, το miR-27a έχει μειωμένα επίπεδα έκφρασης στο ήπαρ, ενώ τα επίπεδά του είναι αυξημένα στην κυκλοφορία και το miR-192 αντίστροφα. Στην ρύθμιση στην αντίσταση στην ινσουλίνη των ασθενών με NAFLD, αυξημένα επίπεδα έκφρασης τόσο στο ήπαρ όσο και στην κυκλοφορία έχουν τα miR-15b και miR-30b. Τα miR-152, miR-499-5p, miR-26a και miR-206 αναφέρονται με μειωμένη έκφραση στο ήπαρ και άγνωστη στην κυκλοφορία του αίματος. Όταν η NAFLD οδηγεί σε απόπτωση των κυττάρων τα miR-223, miR-21 και miR-34a έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στην κυκλοφορία και στο ήπαρ, το miR-24 αυξημένη έκφραση στο ήπαρ και στο miR-296 μειωμένη έκφραση στο ήπαρ, με άγνωστη τη μεταβολή των επιπέδων τους στην κυκλοφορία. Κοινή συμπεριφορά εμφανίζει το miR-223 στη φλεγμονή και την ίνωση, καθώς αναφέρεται με αυξημένα επίπεδα έκφρασης και στην κυκλοφορία του αίματος και στο ήπαρ. Για τη φλεγμονή, επίσης, αύξηση στα επίπεδα έκφρασης στο ήπαρ έχουν τα miR-192-5p, miR-125b, miR-194, miR-378, με τα δύο πρώτα να είναι ανάλογα αυξημένα και στην κυκλοφορία του αίματος. Επιπλέον, τα πειράματα που πραγματοποίησαν σε ποντίκια έδειξαν αυξημένα επίπεδα στα miR-144-3p,

miR-23b-3p και miR-126a-5p, αλλά τα αποτελέσματα δεν έχουν επιβεβαιωθεί στους ανθρώπους.^[93]

Στους ασθενείς με NASH σημειώνεται ανοδική ρύθμιση των miR-122, miR-192 και miR-375, με τις τιμές, επίσης, να έχουν διαφορά σε σχέση με τους ασθενείς με απλή στεάτωση. Η ακρίβεια των miR-122, miR-192 και miR-375 είναι αρκετά καλή, σύμφωνα με την ανάλυση με καμπύλη ROC και για αυτό, τα συγκεκριμένα miRNAs θεωρούνται καλοί δείκτες διαβάθμισης της νόσου. Μάλιστα, η παρουσία του miR-122 στον ορό μαρτυρά με αρκετά μεγάλη ευαισθησία την προχωρημένη ίνωση στο ήπαρ και μαζί με το miR-192, παρουσιάζουν συγκεντρώσεις ανάλογες με τη συγκέντρωση CK18 στον ορό του ασθενούς, που συνδέεται άμεσα με την κυτταρική απόπτωση.

Σε ένα μικρό δείγμα ασθενών, που η NAFLD έχει επιβεβαιωθεί με βιοψία, έχουν αναφερθεί ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα στα miR-181d, miR-10b, miR-99a, miR-197 και miR-146b, συγκριτικά με υγιές δείγμα πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα, τα miR-10b και miR-197 είναι μειωμένα στους ασθενείς με υψηλούς δείκτες φλεγμονής στον ορό και τα miR-181d και miR-99a είχαν χαμηλές τιμές στους ασθενείς με NASH, των οποίων η γ-GT είναι σε υψηλά επίπεδα στον ορό. Σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια, το miR-15b έχει πολύ υψηλά επίπεδα όταν η κυτταρική απόπτωση έχει επέλθει με μεσολάβηση του παράγοντα νέκρωσης TNF.^[92] Σε άλλη μελέτη, τα miR-192, miR-27b, miR-22, miR-197 και miR-30c αναφέρθηκαν ότι έχουν καλύτερη εξειδίκευση για τη NAFLD σε σύγκριση με το τις ηπατοτοξικές νόσους που προκαλούν φαρμακευτικές ουσίες.^[95]

Σχετικά με τα circRNAs και τη NAFLD, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι το circRNA_0046366 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της στεάτωσης των στα ηπατοκύτταρα και ότι το circRNA_0046367 συμβάλλει στη βελτίωση του μεταβολισμού λιπιδίων για αποφυγή της στεάτωσης, καταργώντας τις ανασταλτικές επιδράσεις του miR-34a στο PPARα. Παρόλα αυτά, η χρησιμότητα των circRNAs ως διαγνωστικοί βιοδείκτες στην NAFLD και NASH είναι ακόμα υπό διερεύνηση.^[94] Όλα τα παραπάνω ncRNAs που αφορούν στις μη-αλκοολικές ηπατικές νόσους συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΤΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ NCRNAS ΠΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΟΥΝ ΑΥΞΗΣΗ Η ΜΕΙΩΣΗ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΙΣ ΜΗ-ΑΛΚΟΟΛΙΚΕΣ ΗΠΑΤΙΚΕΣ ΝΟΣΟΥΣ (NAFLD ΚΑΙ NASH) ΚΑΙ ΠΟΙΑ ΑΠΟ ΑΥΤΑ ΕΝΤΟΠΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Νόσος	Αυξημένη έκφραση	Μειωμένη έκφραση	Κυκλοφορούντα
NAFLD	miR-122, miR-34a, miR-16, miR-128-3p, miR-192-5p, miR-223, miR-155, miR-1290, miR-27b-3p, miR-192-5p, miR-148a-3p, miR-99a-5p, miR-21, miR-125b, miR-29a, miR-132, miR-155, miR-378, miR-15b, miR-30b, miR-21, miR-24, miR-223, miR-192-5p, miR-125b, miR-194, miR-378, miR-144-3p, miR-23b-3p, miR-126a-5p, miR-15b	miR-152, miR-499-5p, miR-26a, miR-206, miR-296, miR-181d, miR-10b, miR-99a, miR-197, miR-146b	Στον ορό: miR-34a miR-122 miR-21 miR-192
NASH	miR-21, miR-122, miR-192, miR-375	miR-181d, miR-99a	

6.3 Για τις ιογενείς ηπατίτιδες

Η επιβεβαίωση ότι ένας άνθρωπος νοσεί από ιογενή ηπατίτιδα είναι πολύ εύκολη και πραγματοποιείται με την ανίχνευση του κατάλληλου αντιγόνου στον οργανισμό, μέσω αιματολογικών εξετάσεων. Η βασικότερη ανάγκη στις συνηθέστερες μορφές ηπατίτιδας, όπως η HBV και HCV, είναι να προσδιοριστεί η έκταση της μόλυνσης και η χρονιότητα. Οι Iacob DG. et al. αναφέρουν ότι το επιφανειακό αντιγόνο HBsAg της ηπατίτιδας B

φέρει σωματίδια κατάλληλα για να προσδεθούν με τις πρωτεΐνες Ago2 και με αρκετά miRNAs, όπως τα miR-27a, miR-30b, miR-122, miR-126, miR-145, miR-106b, και miR-223. Επειδή η Ago2 αλληλεπιδρά με το αντιγόνο του πυρήνα της ηπατίτιδας Β και το HBsAg σε διάφορα διαμερίσματα μολυσμένων κυττάρων, φαίνεται ότι ο ιός HBV τελικά προωθεί την πρόσδεση miRNAs σε εξωκυτταρικά σωματίδια.^[99]

Το miR-122, όπως σε όλες τις ηπατικές ασθένειες, κυρίως τις χρόνιες, μπορεί να δώσει μία εικόνα για τη σοβαρότητα της μόλυνσης, καθώς είναι το κυριότερο miRNA στο ήπαρ. Στην περίπτωση μόλυνσης από HBV και HCV, μάλιστα, παρατηρούνται προβλήματα στη ρύθμισή του, με τη μεγαλύτερη προς τα πάνω ρύθμιση να παρατηρείται στους θετικούς στο αντιγόνο HBeAg ασθενείς.

Στη διάγνωση και την επίπτωση της χρόνιας HBV τα ικανότερα miRNAs θεωρούνται τα miR-122, miR-572, miR-575, miR-638 και miR-744, τα οποία εντοπίζονται στον ορό των ασθενών και έχουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης σε σχέση με υγιή δείγματα. Τα παραπάνω miRNAs θεωρούνται πολύ χρήσιμα στη διάγνωση της χρόνιας HBV, ιδιαίτερα αφού σε πολλούς ασθενείς τα επίπεδα της ήδη επικυρωμένης ALT δεν παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές. Ακόμα, σύμφωνα με παλιότερες μελέτες, εκτός από το miR-122, τα let-7c, miR-23b και miR-150 μπορούν να φανούν χρήσιμα εργαλεία για τη διάγνωση της κρυφής λοίμωξης από HBV.

Στους ασθενείς με HCV παρατηρείται υπερέκφραση των miR-122, miR-134, miR-424-3p και miR-629-5p, ανιχνεύσιμη επίσης στον ορό του αίματος.^[95, 96] Επιπλέον τα ηπατοκύτταρα των ασθενών με HCV απελευθερώνουν εξωκυτταρικά κυστίδια που φέρουν τα miR-192 και miR-19a, τα οποία με τη σειρά τους προάγουν τη δράση του παράγοντα TGFβ και ενεργοποιούν τα αστροειδή κύτταρα. Τα αστροειδή κύτταρα που παραμένουν αδρανή απελευθερώνουν εξωκυτταρικά κυστίδια που περιέχουν miR-214 και miR-199a-5p προκειμένου να μειώσουν την έκφραση παραγόντων που οδηγούν σε ίνωση στα ηπατοκύτταρα, αλλά και τα γειτονικά ενεργοποιημένα αστροειδή κύτταρα. Κυκλοφορούντα miRNAs που παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα στους ασθενείς με HCV είναι επίσης τα: miR-155, miR-34a, miR-21, miR-146a και miR-125b.^[88]

Στην κατηγορία των lncRNAs, ενδιαφέρον παρουσιάζει το lncRNA-ATB, διότι η αύξηση στα επίπεδά του συνδέεται με την αύξηση στα επίπεδα του αυξητικού παράγοντα TGF-β, που προάγει τη φλεγμονή, την ίνωση και κατ' επέκταση, την κίρρωση του ήπατος.^[97]

Σχετικά με τα circRNAs, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα ρύθμισης σε κάποια από αυτά και καθώς μπορούν να ανταγωνιστούν διάφορα miRNAs, σχετίζονται με την ενεργοποίηση γονιδίων που οδηγούν σε χρόνια HBV. Συγκεκριμένα, το Hsa_circ_0000038 συσχετίζεται αρνητικά με το miR-370 και το miR-939, ενώ το Hsa_circ_0000650 αλληλεπιδρά με τον παράγοντα TGFβ2 με τη μεσολάβηση του miR-6873-3p.^[98]

Εξίσου σημαντική είναι η παρουσία κάποιων miRNAs στο πλάσμα με σκοπό τη επιλογή θεραπείας και την πρόγνωση. Σε κάποιες έρευνες που οι ασθενείς ήταν αρνητικοί στο HBsAg, αξιολογήθηκαν τα miR-301a-3p και miR-145-5p, ενώ σε αυτές που στόχος ήταν η καταπολέμηση του HBsAg, μελετήθηκαν τα miR-3960 και miR-126-3p. Αντίστοιχα, στους ασθενείς που λαμβάνουν ιντερφερόνη ως αντική θεραπεία, η πρόγνωση της απόκρισης έγινε από τα miR-122, miR-99 του ορού, miR-192, miR-335, miR-126 και miR-320.^[99] Στον Πίνακα 3 συνοψίζονται τα ncRNAs που συναντάμε στις ηπατίτιδες HBV και HCV.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: ΤΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ NCRNAS ΠΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΟΥΝ ΑΥΞΗΣΗ Η ΜΕΙΩΣΗ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΙΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΕΣ HBV ΚΑΙ HCV ΚΑΙ ΠΟΙΑ ΑΠΟ ΑΥΤΑ ΕΝΤΟΠΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Νόσος	Αυξημένη έκφραση	Μειωμένη έκφραση	Κυκλοφορούντα
HBV	miR-122, miR-29, miR-192, miR-210, miR-638, miR-74, let-7c, miR-23b, miR-150 lncRNA-ATB Hsa_circ_0000038 Hsa_circ_0000650	miR-122, miR-572, miR-575, miR-638, miR-744	Στον ορό: miR-122-5p miR-99a-5p miR192-5p miR-122 miR-29a miR-29b miR-29c miR-210 miR-29 miR-572 miR-575 miR-638 miR-744 Στο πλάσμα: miR-23b miR-122 miR-150 miR-122-5p miR-192-5p miR-101 miR-106b miR-195
HCV	miR-122, miR-134, miR-424-3p και miR-629-5p, miR-155, miR-34a, miR-21, miR-146a, miR-125b, miR-192 και miR-19a		Στον ορό: miR-122 miR-21 miR-134 miR-424-3p miR-629-5p Στο πλάσμα: miR-122 miR-143 miR-21

6.4 Για την ίνωση και την κίρρωση του ήπατος

Μέχρι σήμερα, η πιο έγκυρη μέθοδος επιβεβαίωσης της ίνωσης και της κίρρωσης του ήπατος, είναι η βιοψία. Καθότι επεμβατική μέθοδος, τα κυκλοφορούντα ncRNAs θα

μπορούσαν να αποτελέσουν ιδανικό διαγνωστικό και προγνωστικό βιοδείκτη. Είναι γνωστό ότι τα αστροειδή κύτταρα συμμετέχουν ενεργά στην εξέλιξη της ηπατικής ίνωσης και έχει αποδειχθεί ότι η διαταραχή στη ρύθμιση κάποιων miRNAs, όπως το miR-29, προάγει την ενεργοποίησή τους. Συγκεκριμένα, στον ορό των ασθενών με ίνωση, το miR-29a είναι σε χαμηλά επίπεδα. Επιπροσθέτως, στην περίπτωση της ηπατικής ίνωσης, σημειώνεται αύξηση των επιπέδων του miR-571 στον ορό. Στην περίπτωση των miR-199 και miR-200b καταγράφεται υπερέκφραση. Αντίθετα, οι ασθενείς με κίρρωση έχουν στο ορό μειωμένα επίπεδα miR-542, miR-652 και miR-181b. Το miR-122 είναι και πάλι κατάλληλο για την διάγνωση της ηπατικής βλάβης.^[88, 95, 100] Έχει παρατηρηθεί ότι το miR-122 μειώνεται σταδιακά στον ορό των ασθενών με μη αντιρροπούμενη ηπατική κίρρωση. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα επίπεδά του στους ασθενείς με NAFLD, καθώς τα επίπεδα έκφρασής του είναι μεν αυξημένα στο ήπαρ, αλλά μειωμένα στον ορό. Επίσης, το miR-34 είναι δείκτης του βαθμού της πυλαίας υπέρτασης, που χαρακτηρίζει τους ασθενείς με κίρρωση του ήπατος.^[99] Τόσο στο ήπαρ όσο και στην κυκλοφορία του αίματος ασθενών με NAFLD αυξημένα επίπεδα έκφρασης έχουν τα miR-21, miR-223 και μειωμένα το miR-29a.^[93]

Όσον αφορά στην ίνωση που προκαλείται έπειτα από μόλυνση με HBV παρατηρούνται ιδιαίτερες μεταβολές στη ρύθμιση και έκφραση τόσο των miRNAs εντός του ήπατος όσο και των κυκλοφορούντων miRNAs. Πιο αναλυτικά, τα miR-34a, miR-221, miR-222, miR-27a/b, miR-181a/b και miR-125 παρουσιάζονται αυξημένα στο πλάσμα και στο ήπαρ των ασθενών με HBV, ενώ το miR-199a/b είναι μειωμένο στο πλάσμα και το miR-223 αυξημένο στον ορό του αίματος. Για την σταδιοποίηση της ίνωσης που επέρχεται λόγω της HBV παρατηρούνται τα miR-2861, miR-345-3p, miR-3620, miR-3656, miR-371a-5p, miR-4646-5p, miR-4651, miR-4695, miR-4800-5p και miR-638, τα οποία έχουν μεταβολή στην έκφρασή τους στο πλάσμα του αίματος ανάλογη του σταδίου της ίνωσης. Τα miR-1, miR-10b-5p, miR-20b-5p, miR-96b-5p, miR-133b, miR-455-p και miR-671-5p καταγράφουν αυξανόμενη έκφραση στον ορό του αίματος κυρίως στα τελευταία στάδια της ίνωσης, ενώ το miR-499-5p αυξάνεται στο ορό κατά τα πρώτα στάδια της ίνωσης. Τα miR-223, miR-21, miR-143 και miR-374 έχουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης, τα οποία μειώνονται επιπλέον όσο εξελίσσεται η ίνωση. Το miR-1227-3p έχει, επίσης, μειωμένη έκφραση στον ορό του αίματος στα πρώτα στάδια της ίνωσης και τα miR-486-3p, miR-497-5p σημειώνει μείωση στο πλάσμα μετά το πρώτο στάδιο της ίνωσης. Το miR-185

είναι κατάλληλο για να προσδιορισμό του σταδίου της ίνωσης, αφού η έκφρασή του δεν επηρεάζεται από το DNA του ιού HBV στο πλάσμα. Τέλος, τα miR-106b, miR-181b δείχνουν κατάλληλα για τη διάγνωση της κίρρωσης του ήπατος. Μειωμένη έκφραση σημειώνει το miR-29 στην κίρρωση του ήπατος σε σχέση με υγιή δείγματα.^[99]

Το lincRNA-p21, είναι ένα lncRNA που σχετίζεται με το στάδιο ηπατικής ίνωσης σε ασθενείς με HBV. Άλλα lncRNAs που συνδέονται με κίρρωση του ήπατος προερχόμενη από ALD είναι τα AK128652 και AK054921, τα αυξημένα επίπεδα των οποίων στο πλάσμα συνδέονται με αρνητική πρόγνωση επιβίωσης. Το MALAT1, επίσης, παρουσιάζει σημαντική αύξηση σε ασθενείς που, από στεάτωση κατέληξε σε ίνωση και έπειτα σε κίρρωση λόγω NASH. Από ευρήματα σε ζώα για την ηπατική ίνωση, εκτός από το MALAT1, το MEG3 και το APTR, το HOTAIR και το NEAT1 υπερεκφράζονται και μάλιστα τα αποτελέσματα φαίνεται να συνάδουν και με τον άνθρωπο. Ακόμα, το PVT1 και το lncRNAs-COX2 υπερεκφράζονται, αλλά δεν έχουν συσχετιστεί ακόμα με την ίνωση στο ανθρώπινο ήπαρ. Το NR_002155.1 σημειώνει μειωμένη έκφραση στα ζώα με ίνωση, ενώ το lnc-LFAR1 παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στα αστροειδή κύτταρα και μειωμένη στα ηπατοκύτταρα.^[101] Στον Πίνακα 4 συνοψίζονται τα ncRNAs που συναντάμε στην ίνωση και την κίρρωση του ήπατος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: ΤΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ NCRNAS ΠΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΟΥΝ ΑΥΞΗΣΗ Η ΜΕΙΩΣΗ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΙΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΙΡΡΩΣΗ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ ΚΑΙ ΠΟΙΑ ΑΠΟ ΑΥΤΑ ΕΝΤΟΠΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Νόσος	Αυξημένη έκφραση	Μειωμένη έκφραση	Κυκλοφορούντα
Ίνωση (γενικά)	miR-571, miR-199, miR-200b, MEG3, APTR, HOTAIR, NEAT1, PVT1, lncRNA-COX2	miR-29 NR_002155.1	Στον ορό: miR-18a miR-221 miR-222 miR-19a
Ίνωση από NAFLD	miR-122 (στο ήπαρ) miR-21, miR-223	miR-122 (στον ορό)	miR-296

Ίνωση από HBV	miR-34a, miR-221, miR-222, miR-27a/b, miR-181a/b, miR-125, miR-223, miR-2861, miR-345-3p, miR-3620, miR-3656, miR-371a-5p, miR-4646-5p, miR-4651, miR-4695, miR-4800-5p και miR-638, miR-1, miR-10b-5p, miR-20b-5p, miR-96b-5p, miR-133b, miR-455-ep, miR-671-5p, miR-499-5p, miR-185 lincRNA-p21	miR-199a/b, miR-223, miR-21, miR-143, miR-374, miR-1227-3p, miR-486-3p, miR-497-5p	miR-130a miR-195 miR-192 miR-34a, miR-146 miR-122 miR-99a miR-125b miR-720 miR-22 miR-34a
Κίρρωση	miR-21, miR-223, miR-106b, miR-181b AK128652, AK054921 MALAT1	miR-29a, miR-542, miR-652, miR-181b, miR-122	miR-16 miR-2 miR-29 Στο πλάσμα: miR-1 miR-451a miR-18a-5p miR-29c-3p miR-106b-5p miR-185-5p

6.5 Για το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα είναι το συνηθέστερο τελικό στάδιο εξέλιξης της κίρρωσης του ήπατος. Αυτό σημαίνει ότι, πολλά από τα ncRNAs που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, όπως το MALAT1, που παρουσιάζει ακόμα πιο αυξημένα επίπεδα στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα σε σχέση με την κίρρωση του ήπατος που προκαλεί η HCV, αποτελούν πιθανούς δείκτες για διάγνωση και πρόγνωση της κατάστασης του ασθενούς.

Ο στόχος είναι, πέρα από τη διάγνωση και σταδιοποίηση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, τα ncRNAs να παρέχουν τη δυνατότητα προσδιορισμού της αιτίας που οδήγησε στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Στην περίπτωση που το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα έχει προέλθει από HBV, παραδείγματος χάριν, παρατηρείται η έκφραση των miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a και miR-92a-1, που συνδέονται με την καρκινοποίηση των ηπατοκυττάρων. Η ενεργοποίηση της έκφρασής τους συνδέεται με την πρωτεΐνη HBV X (HBx), που καθορίζει τον κύκλο ζωής του ιού HBV. Σε άλλες έρευνες, παρατηρήθηκε υπερέκφραση των miR-96, miR-375 και miR-92a σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα προερχόμενο από HBV και αυξημένη ρύθμιση των miR-244 και miR155. Μειωμένη ρύθμιση παρουσίασαν τα miR-145 και miR-199b. Στον ορό του αίματος, τα υψηλά επίπεδα του miR-324-3p θα μπορούσαν να αποτελέσουν διαγνωστικό και προγνωστικό βιοδείκτη για ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα που σχετίζεται με τον HBV.^[96]

Στους ασθενείς που το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα προήλθε από HCV έχουν εντοπιστεί τα let-7a-5p, -16-5p, -18a-5p, -21-5p, -22-3p, -34a-5p, -103a-3p, -122-5p, -221-3p και -222-3p. Στο σάλιο βρέθηκαν τα miR-21-5p, 122-5p και 2213p, ενώ τα υπόλοιπα ανιχνεύθηκαν στο πλάσμα του αίματος. Το miR-21 παρουσιάζεται ως ικανοποιητικός προγνωστικός βιοδείκτης. Εφόσον έχει τιμή μικρότερη από 1,4468, υποδεικνύει αυξημένες πιθανότητες- έως και 5 φορές περισσότερες πιθανότητες- οι ασθενείς χωρίς κίρρωση του ήπατος, να εμφανίσουν ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.^[102]

Όπως αναφέρεται στην μελέτη των Musaddaq G. et al., από ανασκόπηση άλλων ερευνών προκύπτει η αυξημένη ρύθμιση των miR21, miR-221 και miR-222 και η μειωμένη ρύθμιση των miR-122a, miR-145, miR-199a και miR-223 στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό. Τα miR-199a-5p, miR-195, miR-214,

miR-199a-3p, miR125a-5p, miR-139-5p, miR-130a, miR-199b-3p, miR-139-3p, miR-224-3p, miR-452, miR-497, miRNA-1269 και miR-424-3p θα μπορούσαν να είναι πιθανοί βιοδείκτες για τη διάγνωση του HCC.^[95]

Στην κατηγορία των lncRNAs που είναι ανιχνεύσιμα στο πλάσμα του αίματος, τα RP11-160H22.5, XLOC014172, και LOC149086 σχετίζονται με την δημιουργία καρκινωμάτων, ενώ η αύξηση στα XLOC014172 και LOC149086 με τις μεταστάσεις. Σε άλλες μελέτες αναφέρονται τα: HULC, LINC00152, UCA1 και MALAT1, όπως προαναφέρθηκε. Από τα αυξημένα επίπεδα του HULC, που ανιχνεύεται στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, προκύπτει ότι το HULC είναι πιθανός διαγνωστικός βιοδείκτης. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι, στην καμπύλη ROC που προκύπτει από τα δεδομένα μελετών, το εμβαδόν AUC είναι περίπου 0,8. Το LINC00152 στο αίμα παρουσιάζει αύξουσα τιμή ανάμεσα σε ασθενείς με χρόνια HBV, κίρρωση του ήπατος και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και φαίνεται να υπερτερεί σε ευαισθησία και εξειδίκευση σε σχέση με το HULC. Το UCA1 συνδέεται με το μέγεθος του όγκου, τη μετάσταση και τη συνολική επιβίωση και παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στον ορό των ασθενών. Το MALAT1 θεωρείται προγνωστικός δείκτης και συνδέεται με τη μεταστατικότητα και τον υψηλό κίνδυνο εμφάνισης ηπατοκυτταρικού καρκίνου μετά από μεταμόσχευση ήπατος. Στον ορό του αίματος των ασθενών τα επίπεδα του MALAT1 θα μπορούσαν να διαχωρίσουν τους ασθενείς με καρκίνο του ήπατος από τους υγιείς και από αυτούς που νοσούσαν από χρόνια HBV. Άλλα lncRNAs υπό εξέταση είναι τα TSIX, UBE2CP3, SNHG1, uc003wbd, AF085935, CTBP, uc001ncr, AX800134, WRAP53 και JPXSPRY4.^[101]

Στην κατηγορία των circRNAs, η οποία είναι ακόμα εκκολαπτόμενη κατηγορία βιοδεικτών για τις ηπατικές νόσους, τα αυξημένα επίπεδα του circ-ZEB1.33 στον ορό υποδηλώνουν ότι είναι ένας πιθανός διαγνωστικός βιοδείκτης. Αυξημένα είναι και τα επίπεδα του hsa_circ_0003998 στο πλάσμα των ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, ιδιαίτερα συγκριτικά με τους ασθενείς με HBV και τον υγιή πληθυσμό. Τα υψηλά επίπεδα του hsa_circ_0003998 συσχετίστηκαν και με το επίπεδο της AFP στον ορό των ασθενών. Το circSMARCA5 εμφανίζεται μειωμένο στους όγκους και έχει συσχετιστεί με την διαφοροποίηση και τη σταδιοποίηση του όγκου. Σε άλλη έρευνα παρουσιάστηκαν circRNA (τα hsa_circ_0077930, hsa_circ_0027089, hsa_circ_0001818 και hsa_circ_0026337) τα οποία ήταν ρυθμισμένα σε μεγάλο βαθμό και εκφράζονταν

διαφορετικά ανάμεσα στους ασθενείς με κίρρωση και τους ασθενείς με καρκίνο του ήπατος. Αντιθέτως, τα hsa_circ_0011883 and hsa_circ_0001070 παρουσίαζαν μικρότερα επίπεδα ρύθμισης. Τέλος το hsa_circ_0027089 φαίνεται να έχει καλές προοπτικές για να διαχωρίσει τους ασθενείς με κίρρωση από τους ασθενείς με καρκίνο του ήπατος.^[103] Στον Πίνακα 5 συνοψίζονται τα ncRNAs που συναντάμε στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5: ΤΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ NCRNAS ΠΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΟΥΝ ΑΥΞΗΣΗ Η ΜΕΙΩΣΗ ΣΤΗΝ
ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΙΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΙΡΡΩΣΗ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ ΚΑΙ ΠΟΙΑ ΑΠΟ ΑΥΤΑ
ΕΝΤΟΠΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ**

Νόσος	Αυξημένη έκφραση	Μειωμένη έκφραση	Κυκλοφορούντα
HCC	<p>miR-96, miR-375, miR-92a, miR-244, miR155 miR21, miR-221, miR-222 miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-92a-1,</p> <p>let-7a-5p, -16-5p, -18a-5p, -21-5p, -22-3p, -34a-5p, -103a-3p, -122-5p, -221-3p, -222-3p,</p> <p>HULC, LINC00152, UCA1, MALAT1,</p> <p>circ-ZEB1.33</p> <p>hsa_circ_0003998</p> <p>hsa_circ_0077930, hsa_circ_0027089, hsa_circ_0001818 και hsa_circ_0026337</p>	<p>miR-145, miR-199b miR-122a, miR-145, miR-199a, miR-223, hsa_circ_0011883, hsa_circ_0001070</p>	<p>Στον ορό: miR-19a miR-296 miR-130a miR-195 miR-192 miR-34a miR-146 miR-122 miR-99a miR-125b miR-720 miR-22 miR-34a miR-16, miR-2 miR-25 miR-375 let-7f</p> <p>Στο πλάσμα: miR-224 miR-122 miR-192 miR-21 miR-223 miR-26a miR-27 miR-801 miR-20a-5p miR-25-3p miR-30a-5p miR-92a-3p miR-132-3p miR-185-5p miR-320a miR-324-3p RP11-160H22.5, XLOC014172, LOC149086</p>

7. Συμπεράσματα

Τα μη κωδικοποιητικά RNAs, αν και για πολλές δεκαετίες αντιμετωπιζόνταν ως περιττές αλληλουχίες ριβονουκλεοτιδίων, έχουν βρει τη θέση τους στη διαγνωστική, προγνωστική και θεραπευτική ιατρική. Στην περίπτωση των ηπατικών ασθενειών, τα ncRNAs που εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος, θεωρούνται αξιόπιστοι βιοδείκτες, καθώς χαρακτηρίζονται από σταθερότητα και ευαισθησία. Ιδιαίτερα τα miRNAs, ως πιο ευρέως μελετημένη κατηγορία, παρέχουν έναν ασφαλή και μη επεμβατικό τρόπο για τη διάγνωση και πρόγνωση των ηπατικών νόσων. Τα lncRNAs και τα circRNAs επιδέχονται περαιτέρω διερεύνησης. Μέχρι σήμερα δεν έχουν επικυρωθεί ncRNAs ως βιοδείκτες στις ηπατικές νόσους, στηριζόμενοι όμως σε έρευνες, τα miRNAs αποτελούν ένα αξιόπιστο εργαλείο για μελλοντική χρήση στην κλινική πρακτική.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στις ALD τα miRNAs με διαγνωστική αξία είναι τα miR-122, miR-30a και miR-192. Έπειτα από στατιστική ανάλυση με καμπύλες ROC αυτών των βιοδεικτών, το miR-192 αποδείχτηκε το καλύτερο σε διαγνωστική αξία για την ALD, χωρίς να έχουν αποκλειστεί τα άλλα δύο ως πιθανοί βιοδείκτες.

Στην περίπτωση της NAFLD, χαρακτηριστική είναι η παρουσία miR-21 στον ορό του αίματος ανδρών που η νόσος επιβεβαιώθηκε με χρήση υπερήχων. Το miR-122 παρουσίασε τις σημαντικότερες αλλαγές, στους ασθενείς με NASH, όταν τα επίπεδά του συγκρίθηκαν με υγιή δείγματα ελέγχου, καθιστώντας το πιθανό βιοδείκτη με υψηλή ευαισθησία. Για τη NASH, επίσης, τα miR-192 και miR-375 έδωσαν στις καμπύλες ROC μίας έρευνας AUC περίπου ίσο με 0,7. Είναι μία οριακά αποδεκτή τιμή για να θεωρηθούν ακριβείς βιοδείκτες στον προσδιορισμό της έκτασης της ηπατικής βλάβης που προκαλείται από NASH. Επιπλέον, τα miR-34a, miR-122 και miR-192 μπορεί να είναι κατάλληλα για χρήση ως βιοδείκτες για τον προσδιορισμό της νοσηρότητας των NAFLD και NASH.

Όσον αφορά στις ιογενείς ηπατικές νόσους, τα ncRNAs στοχεύουν όχι στη διάγνωση, αλλά στον προσδιορισμό της χρονιότητας και η εξέλιξη της νόσου. Η ίνωση που προέρχεται από χρόνια HBV έχει συνδεθεί με τον miR-29 με τις καμπύλες ROC να έχουν AUC μεταξύ του 0,6 και 0,8. Ωστόσο, ιδιαίτερα υποσχόμενο είναι το lncRNA-ATB, που μέσω της καμπύλης ROC οριακά παρουσιάζει ευαισθησία στη διάγνωση των μη-κίρρωτικών ασθενών με χρόνια HBV, αλλά έχει καλύτερη εξειδίκευση στη διάγνωση της

κίρρωσης που προέρχεται από HBV. Στην ίνωση και την κίρρωση του ήπατος το πιο ενδεικτικό είναι το miR-29.

Για το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα το miR-21 έχει AUC περίπου 0,71 και παρέχει 70% ευαισθησία και 68% εξειδίκευση στη διαφοροποίηση των ασθενών που έχουν ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ή HCV χωρίς κίρρωση του ήπατος. Πιο αξιόπιστο είναι το εξωσωμικό miR-21 με AUC περίπου 0,86. Σχετικά με τα lncRNAs, ο MALAT1 καθώς εμφανίζεται σε πολλές μορφές καρκίνου, μπορεί να αποτελέσει βιοδείκτη και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Μεγαλύτερη ευαισθησία, όμως, παρουσιάζουν τα HULC και LINC00152, όπως έδειξαν οι συγκριτικές έρευνες. Τα παραπάνω πιθανά ncRNAs ως πιθανοί βιοδείκτες στις ηπατικές νόσους συνοψίζονται στον Πίνακα 6.

Το μειονέκτημα, μέχρι σήμερα, των ncRNAs είναι η έλλειψη εξειδίκευσης σε πολλές περιπτώσεις. Το miR-122, για παράδειγμα, είναι το πιο διαδεδομένο miRNA, που απαντάται στις περισσότερες ηπατικές νόσους και υποδεικνύει την ύπαρξη ηπατικής βλάβης, αδυνατεί όμως να προσδιορίσει την προέλευση αυτής της βλάβης. Με τα σημερινά δεδομένα, λοιπόν, ασφαλής διάγνωση πραγματοποιείται με συνεκτίμηση των κυκλοφορούντων RNAs και των ήδη επικυρωμένων βιοδεικτών. Στην περίπτωση των ασθενών με NAFLD, τα επίπεδα miR-122 στον ορό πρέπει να συσχετίζονται με τα επίπεδα ALT για τον προσδιορισμό του σταδίου της ίνωσης. Το ίδιο ισχύει και για το miR-21, που καταγράφεται αυξημένο τόσο στην NAFLD, όσο στην ALD και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Αντίθετα, σε πολλές περιπτώσεις ασθενών με χρόνια HBV, τα επίπεδα ALT παρέμειναν αμετάβλητα σε φυσιολογικές τιμές στον ορό του αίματος, ενώ τα miRNAs παρουσίασαν μεταβολές που αντιπροσώπευαν την κατάσταση του ασθενούς. Σε αυτή την περίπτωση, τα miRNAs θεωρούνται καλοί βιοδείκτες για τον προσδιορισμό των χρόνιων ηπατικών νόσων. Τέλος, τα circRNAs, τα οποία μεταφέρονται στην κυκλοφορία του αίματος μέσω εξωσωμάτων, θα μπορούσαν να αποτελέσουν στο μέλλον βιοδείκτη για τις μεταβολικές ασθένειες, εν προκειμένω για τις NAFLDs, αφού τα εξωσώματα τους παρέχουν μεγάλο χρόνο ζωής και σταθερότητα.

Εν κατακλείδι, τα κυκλοφορούντα ncRNAs έχουν προοπτικές να αποτελέσουν διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες των ηπατικών νόσων, λόγω του μη επεμβατικού τους χαρακτήρα, του χαμηλού κόστους, της σταθερότητας και της ευαισθησίας που παρουσιάζουν. Η εξειδίκευση είναι ο στόχος για την εδραίωσή τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: ΤΑ NCRNAS ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΙΣ ΗΠΑΤΙΚΕΣ ΝΟΣΟΥΣ

Νόσος	ncRNAs
ALD	miR-122, miR-30a, miR-192
NAFL/NASH	miR-21, miR-34a, miR-122, miR-192, miR-375
HBV	miR-21, miR-122, miR-34a, miR-192, miR-572, miR-575, miR-638, miR-744
Ήνωση/ Κίρρωση	miR-29, miR-122
HCC	miR-21, MALAT1, HULC, LINC00152

Βιβλιογραφία

- [1] Juza RM, Pauli EM. (2014). Clinical and surgical anatomy of the liver: a review for clinicians. Clin Anat., 27(5):764-9. doi: 10.1002/ca.22350.
- [2] Gordillo M, Evans T, Gouon V. (2015) Orchestrating liver development. Development, 142(12):2094-108. doi: 10.1242/dev.114215
- [3] Ishibashi H, et al. (2009). Liver architecture, cell function, and disease. Semin Immunopathol, 31:399–409. doi: 10.1007/s00281-009-0155-6.
- [4] Adeva-Andany MM, et al. (2016). Liver glucose metabolism in humans. Biosci Rep., 36(6): e00416. doi: 10.1042/BSR20160385
- [5] Ginsberg HN. (2001). New perspectives on atherogenesis: role of abnormal triglyceride-rich lipoprotein metabolism. Circulation. 106(16):2137–2142. doi: 10.1161/01.cir.0000035280.64322.31.
- [6] Miller, M., et al. (2011). Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. Circulation. 123(20):2292–2333. doi: 10.1161/CIR.0b013e3182160726
- [7] Carvalho JR, Machado MV. New Insights About Albumin and Liver Disease. Ann Hepatol., 17(4):547-560. doi: 10.5604/01.3001.0012.0916.
- [8] Paulusma CC, Lamers WH, Broer S, van de Graaf SFJ. (2022). Amino acid metabolism, transport and signalling in the liver revisited. Biochem Pharmacol., 201:115074. doi: 10.1016/j.bcp.2022.115074.
- [9] Kubes P, Jenne C. (2018) Immune Responses in the Liver. Annu Rev Immunol., 26;36:247-277. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052415.
- [10] Krenkel O, Tacke F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. Nat Rev Immunol., 17(5):306-321. doi: 10.1038/nri.2017.11.
- [11] Pimpin L, Cortez-Pinto H, Negro F, Corbould E, Lazarus JV, Webber L, Sheron N. (2018). Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. J Hepatol., 69(3):718-735. doi: 10.1016/j.jhep.2018.05.011.
- [12] Liu SY, Tsai IT, Hsu YC. (2021). Alcohol-Related Liver Disease: Basic Mechanisms and Clinical Perspectives. Int J Mol Sci., 22(10):5170. doi: 10.3390/ijms22105170.

- [13] Risi R, Tuccinardi D, Mariani S, Lubrano C, Manfrini S, Donini LM, Watanabe M. (2021). Liver disease in obesity and underweight: the two sides of the coin. A narrative review. *Eat Weight Disord.*, 26(7):2097-2107. doi: 10.1007/s40519-020-01060-w.
- [14] Andrade RJ, Chalasani N, Björnsson ES, Suzuki A, Kullak-Ublick GA, Watkins PB, Devarbhavi H, Merz M, Lucena MI, Kaplowitz N, Aithal GP. (2019). Drug-induced liver injury. *Nat Rev Dis Primers.*, 5(1):58. doi: 10.1038/s41572-019-0105-0.
- [15] Jefferies M, Rauff B, Rashid H, Lam T, Rafiq S. (2018). Update on global epidemiology of viral hepatitis and preventive strategies. *World J Clin Cases.*, 6(13): 589–599. doi: 10.12998/wjcc.v6.i13.589
- [16] Mitra S, De A, Chowdhury A. (2020). Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Transl Gastroenterol Hepatol.* doi: 10.21037/tgh.2019.09.08
- [17] Namachivayam A, Valsala Gopalakrishnan A. (2021). A review on molecular mechanism of alcoholic liver disease. *Life Sci.* 274:119328. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119328
- [18] Louvet A, Mathurin P. (2015). Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 12(4):231-42. doi: 10.1038/nrgastro.2015.35.
- [19] Ceni E, et al. (2014). Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol.* 20(47): 17756–17772. doi: 10.3748/wjg.v20.i47.17756
- [20] Kourkoumpetis T, Sood G. (2019). Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease: An Update. *Clin Liver Dis.* 23(1):71-80. doi: 10.1016/j.cld.2018.09.006
- [21] Jeon S, Carr R. (2020). Alcohol effects on hepatic lipid metabolism. *J Lipid Res.* 61(4):470-479. doi: 10.1194/jlr.R119000547
- [22] Pohl K, Moodley P, Dhanda AD. (2021). Alcohol's Impact on the Gut and Liver. *Nutrients.* 13(9):3170. doi: 10.3390/nu13093170
- [23] Méndez-Sánchez N, Almeda-Valdés P, Uribe M. (2005). Alcoholic liver disease. An update. *Annals of Hepatology.* doi:10.1016/S1665-2681(19)32083-6

- [24] Chacko K R, Reinus J. (2016). Spectrum of Alcoholic Liver Disease. Clin Liver Dis. 20(3):419-27. doi: 10.1016/j.cld.2016.02.002.
- [25] Scott E, et al. (2018). Genetics of alcoholic liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. Clin Med (Lond). 18(Suppl 2): s54–s59. doi: 10.7861/clinmedicine.18-2s-s54
- [26] Moreno C, Mueller S, Szabo G. (2019). Non-invasive diagnosis and biomarkers in alcohol-related liver disease. J Hepatol. 70(2):273-283. doi: 10.1016/j.jhep.2018.11.025
- [27] Dugum M, McCullough A. (2015). Diagnosis and Management of Alcoholic Liver Disease. J Clin Transl Hepatol. 3(2):109-16. doi: 10.14218/JCTH.2015.00008
- [28] Hannele Yki-Järvinen.(2014). Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. Lancet Diabetes Endocrinol.2(11):901-10. doi: 10.1016/S2213-8587(14)70032-4
- [29] Lee CH, Lui DT, Lam KS. (2022).Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes: An update. J Diabetes Investig.13(6):930-940. doi: 10.1111/jdi.13756
- [30] Byrne CD, Targher G. (2015). NAFLD: a multisystem disease. J Hepatol. 62(1 Suppl):S47-64. doi: 10.1016/j.jhep.2014.12.012
- [31] Buyco DG, Martin J, Jeon S, Hooks R, Lin C, Carr R. (2021). Experimental models of metabolic and alcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 27(1):1-18. doi: 10.3748/wjg.v27.i1.1.
- [32] Harjumäki R, Pridgeon C, Ingelman-Sundberg M. (2021). CYP2E1 in Alcoholic and Non-Alcoholic Liver Injury. Roles of ROS, Reactive Intermediates and Lipid Overload. Int J Mol Sci. 22(15):8221. doi: 10.3390/ijms22158221
- [33] Juanola O, Martínez-López S, Francés R, Gómez-Hurtado I. (2021). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic, Genetic, Epigenetic and Environmental Risk Factors. Int J Environ Res Public Health. 18(10):5227. doi: 10.3390/ijerph18105227
- [34] Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. (2020). Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. 323(12):1175-1183. doi: 10.1001/jama.2020.2298

- [35] Araújo AR, Rosso N, Bedogni G, Tiribelli C, Bellentani S. (2018). Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. *Liver Int.* 38 Suppl 1:47-51. doi: 10.1111/liv.13643
- [36] Miguères M, Lhomme S, Izopet J. (2021). Hepatitis A: Epidemiology, High-Risk Groups, Prevention and Research on Antiviral Treatment. *Viruses.* 13(10):1900. doi: 10.3390/v13101900.
- [37] Abutaleb A, Kottilil S. (2020). Hepatitis A: Epidemiology, Natural History, Unusual Clinical Manifestations, and Prevention. *Gastroenterol Clin North Am.* 49(2):191-199. doi: 10.1016/j.gtc.2020.01.002
- [38] Castaneda D, Gonzalez AJ, Alomari M, Tandon K, Zervos XB. (2021). From hepatitis A to E: A critical review of viral hepatitis. *World J Gastroenterol.* 27(16): 1691–1715. doi: 10.3748/wjg.v27.i16.169
- [39] Pisano MB, Giadans CG, Flichman DM, Ré VE, Preciado MV, Valva P. (2021). Viral hepatitis update: Progress and perspectives. *World J Gastroenterol.* 27(26):4018-4044. doi: 10.3748/wjg.v27.i26.4018.
- [40] Odenwald MA, Paul S. (2022). Viral hepatitis: Past, present, and future. *World J Gastroenterol.* 28(14):1405-1429. doi: 10.3748/wjg.v28.i14.1405.
- [41] Bunchorntavakul C, Reddy KR. (2020). Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus Infections of the Liver. *Gastroenterol Clin North Am.* 49(2):331-346. doi: 10.1016/j.gtc.2020.01.008.
- [42] Sucher E, Sucher R, Gradistanac T, Brandacher G, Schneeberger S, Berg T. (2019). Autoimmune Hepatitis-Immunologically Triggered Liver Pathogenesis-Diagnostic and Therapeutic Strategies. *J Immunol Res.* 2019:9437043. doi: 10.1155/2019/9437043
- [43] Sarcognato S, Sacchi D, Grillo F, Cazzagon N, Fabris L, Cadamuro M, Cataldo I, Covelli C, Mangia A, Guido M. (2021). Autoimmune biliary diseases: primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis. *Pathologica.* 113(3):170-184. doi: 10.32074/1591-951X-245.
- [44] Carbone M, Neuberger JM. (2014). Autoimmune liver disease, autoimmunity and liver transplantation. *J Hepatol.* 60(1):210-23. doi: 10.1016/j.jhep.2013.09.020.

- [45] Ferreira CR, Cassiman D, Blau N. (2019). Clinical and biochemical footprints of inherited metabolic diseases. II. Metabolic liver diseases. *Mol Genet Metab.* 127(2):117-121. doi: 10.1016/j.ymgme.2019.04.002.
- [46] Zarrilli F, Elce A, Scorza M, Giordano S, Amato F, Castaldo G. (2013). An Update on Laboratory Diagnosis of Liver Inherited Diseases. *Biomed Res Int.* 2013:697940. doi: 10.1155/2013/697940
- [47] Mulligan C, Bronstein JM. (2020). Wilson Disease: An Overview and Approach to Management. *Neurol Clin.* 38(2):417-432. doi: 10.1016/j.ncl.2020.01.005.
- [48] de Serres F, Blanco I. (2014). Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *J Intern Med.* 276(4):311-35. doi: 10.1111/joim.12239
- [49] Kowdley KV, Brown KE, Ahn J, Sundaram V. (2019). ACG Clinical Guideline: Hereditary Hemochromatosis. *Am J Gastroenterol.* 114(8):1202-1218. doi: 10.14309/ajg.0000000000000315.
- [50] Schonfeld EA, Brown RS Jr. (2019). Genetic Causes of Liver Disease: When to Suspect a Genetic Etiology, Initial Lab Testing, and the Basics of Management. *Med Clin North Am.* 103(6):991-1003. doi: 10.1016/j.mcna.2019.07.003
- [51] Kisseleva T, Brenner D. (2021). Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 18(3):151-166. doi: 10.1038/s41575-020-00372-7.
- [52] Venkatesh SK, Torbenson MS. (2022). Liver fibrosis quantification. *Abdom Radiol (NY).* 47(3):1032-1052. doi: 10.1007/s00261-021-03396-y
- [53] Parola M, Pinzani M. (2019). Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Mol Aspects Med.* 65:37-55. doi: 10.1016/j.mam.2018.09.002.
- [54] Chidambaranathan-Reghupaty S, Fisher PB, Sarkar D. (2021). Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. *Adv Cancer Res.* 149:1-61. doi: 10.1016/bs.acr.2020.10.001
- [55] De Stefano F, Chacon E, Turcios L, Marti F, Gedaly R. (2018). Novel biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis.* 50(11):1115-1123. doi: 10.1016/j.dld.2018.08.019.

- [56] FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); Bethesda (MD): National Institutes of Health (US), www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/.
- [57] Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 69(3):89-95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989
- [58] Aronson JK, Ferner RE. (2017). Biomarkers-A General Review. *Curr Protoc Pharmacol.* 76:9.23.1-9.23.17. doi: 10.1002/cpph.19
- [59] Califf RM. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med* (Maywood). 243(3):213-221. doi: 10.1177/1535370217750088
- [60] Lesko LJ, Atkinson AJ. (2001). Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41:347-66. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.347
- [61] Ray P, Le Manach Y, Riou B, Houle TT. (2010). Statistical evaluation of a biomarker. *Anesthesiology.* 112(4):1023-40. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181d47604.
- [62] Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok A. (2003). A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. 38(2):518-26. doi: 10.1053/jhep.2003.50346
- [63] Micheel CM, Ball JR. (2010). Evaluation of Biomarkers and Surrogate Endpoints in Chronic Disease. Institute of Medicine (US) Committee on Qualification of Biomarkers and Surrogate Endpoints in Chronic Disease. doi: 10.17226/12869
- [64] Pennello GA. (2013). Analytical and clinical evaluation of biomarkers assays: when are biomarkers ready for prime time?. *Clin Trials.* 10(5):666-76. doi: 10.1177/1740774513497541
- [65] Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations. (2004). *NeuroRx.* 1(2):182-8. doi: 10.1602/neurorx.1.2.182.
- [66] Huang B, Zhang R. (2014). Regulatory non-coding RNAs: revolutionizing the RNA world. *Mol Biol Rep.* 41(6):3915-23. doi: 10.1007/s11033-014-3259-6

- [67] Inamura K. (2017). Major Tumor Suppressor and Oncogenic Non-Coding RNAs: Clinical Relevance in Lung Cancer. *Cells*. 6(2):12. doi: 10.3390/cells6020012
- [68] Mattick JS, Makunin IV. (2006). Non-coding RNA. *Hum Mol Genet*. 15 Spec No 1:R17-29. doi: 10.1093/hmg/ddl046.
- [69] Hombach S, Kretz M. (2016). Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Adv Exp Med Biol*. 937:3-17. doi: 10.1007/978-3-319-42059-2_1.
- [70] Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*. 234(5):5451-5465. doi: 10.1002/jcp.27486
- [71] Bartoszewski R, Sikorski AF. (2018). Editorial focus: entering into the non-coding RNA era. *Cell Mol Biol Lett*. 23:45. doi: 10.1186/s11658-018-0111-3.
- [72] Michlewski G, Caceres JF. (2019). Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA*. 25(1):1-16. doi: 10.1261/rna.068692.118.
- [73] Panni S, Lovering RC, Porras P, Orchard S. (2020). Non-coding RNA regulatory networks. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 1863(6):194417. doi: 10.1016/j.bbagr.2019.194417.
- [74] Carthew RW, Sontheimer EJ. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 136(4):642-55. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.035
- [75] Bartel DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116(2):281-97. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
- [76] Czech B, Munafo M, Ciabrelli F, Eastwood EL, Fabry MH, Kneuss E, Hannon GJ. (2018). piRNA-Guided Genome Defense: From Biogenesis to Silencing. *Annu Rev Genet*. 52:131-157. doi: 10.1146/annurev-genet-120417-031441.
- [77] Iwasaki YW, Siomi MC, Siomi H. *Annu Rev Biochem*. (2015). PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. 84:405-33. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034258.
- [78] Matera AG, Terns RM, Terns MP. (2007). Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(3):209-20. doi: 10.1038/nrm2124.

- [79] Wajahat M, Bracken CP, Orang A. (2021). Emerging Functions for snoRNAs and snoRNA-Derived Fragments. *Int J Mol Sci.* 22(19):10193. doi: 10.3390/ijms221910193.
- [80] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell.* 136(4):629-41. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.006.
- [81] Kashi K, Henderson L, Bonetti A, Carninci P. (2016). Discovery and functional analysis of lncRNAs: Methodologies to investigate an uncharacterized transcriptome. *Biochim Biophys Acta.* 1859(1):3-15. doi: 10.1016/j.bbagr.2015.10.010.
- [82] Chen LL.(2016). Linking Long Noncoding RNA Localization and Function. *Trends Biochem Sci.* 41(9):761-772. doi: 10.1016/j.tibs.2016.07.003
- [83] Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, Ebbesen KK, Hansen TB, Kjems J. (2019). The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat Rev Genet.* 20(11):675-691. doi: 10.1038/s4.
- [84] Wilusz JE. (2018). A 360° view of circular RNAs: From biogenesis to functions. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 9(4):e1478. doi: 10.1002/wrna.1478
- [85] Ebbesen KK, Kjems J, Hansen TB. (2016). *Biochim Biophys Acta.* 1859(1):163-8. doi: 10.1016/j.bbagr.2015.07.007.
- [86] Enache LS, Enache EL, Ramiere C, Diaz O, Bancu L, Sin A, Andre P. (2014). Circulating RNA molecules as biomarkers in liver disease. *Int J Mol Sci.* 15(10):17644-66. doi: 10.3390/ijms151017644.
- [87] Sukowati CHC, Cabral LKD, Tiribelli C, Pascut D. (2021). Circulating Long and Circular Noncoding RNA as Non-Invasive Diagnostic Tools of Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines.* 9(1):90. doi: 10.3390/biomedicines9010090.
- [88] Szabo G, Bala S. (2013). MicroRNAs in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 10(9):542-52. doi: 10.1038/nrgastro.2013.87
- [89] Xu T, Li L, Hu HQ, Meng XM, Huang C, Zhang L, Qin J, Li J. (2018). MicroRNAs in alcoholic liver disease: Recent advances and future applications. *J Cell Physiol.* 234(1):382-394. doi: 10.1002/jcp.26938.

- [90] Pant K, Venugopal SK. (2017). Circulating microRNAs: Possible role as non-invasive diagnostic biomarkers in liver disease. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 41(4):370-377. doi: 10.1016/j.clinre.2016.11.001
- [91] Natarajan SK, Pachunka JM, Mott JL. (2015). Role of microRNAs in Alcohol-Induced Multi-Organ Injury. Biomolecules. 5(4):3309-38. doi: 10.3390/biom5043309
- [92] DiStefano JK, Gerhard GS. (2016). Circulating microRNAs in nonalcoholic fatty liver disease. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 10(2):161-3. doi: 10.1586/17474124.2016.1125290.
- [93] Fang Z, Dou G, Wang L. (2021). MicroRNAs in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Int J Biol Sci. 17(7):1851-1863. doi: 10.7150/ijbs.59588
- [94] Wang T, Pan W, Hu J, Zhang Z, Li G, Liang Y. (2018). Circular RNAs in Metabolic Diseases. Adv Exp Med Biol. 1087:275-285. doi: 10.1007/978-981-13-1426-1_22
- [95] Musaddaq G, Shahzad N, Ashraf MA, Arshad MI. (2019). Circulating liver-specific microRNAs as noninvasive diagnostic biomarkers of hepatic diseases in human. Biomarkers. 24(2):103-109. doi: 10.1080/1354750X.2018.1528631
- [96] Megahed F, Tabll A, Atta S, Ragheb A, Smolic R, Petrovic A, Smolic M. (2023). MicroRNAs: Small Molecules with Significant Functions, Particularly in the Context of Viral Hepatitis B and C Infection. Medicina (Kaunas). 2023. 59(1):173. doi: 10.3390/medicina59010173
- [97] Shoraka S, Mohebbi SR, Hosseini SM, Aghdaei HA, Zali MR. (2021). Identification of plasma lncRNA-ATB levels in hepatitis B virus-related cirrhosis and non-cirrhotic chronic hepatitis B patients. Virus Res. 303:198503. doi: 10.1016/j.virusres.2021.198503
- [98] Zhou TC, Li X, Chen LJ, Fan JH, Lai X, Tang Y, Zhang L, Wei J. (2018). Differential expression profile of hepatic circular RNAs in chronic hepatitis B. J Viral Hepat. 25(11):1341-1351. doi: 10.1111/jvh.12944.
- [99] Iacob DG, Rosca A, Ruta SM. (2020). Circulating microRNAs as non-invasive biomarkers for hepatitis B virus liver fibrosis. World J Gastroenterol. 26(11): 1113–1127. doi: 10.3748/wjg.v26.i11.1113

- [100] Schueller F, Roy S, Vucur M, Trautwein C, Luedde T, Roderburg C. (2018). The Role of miRNAs in the Pathophysiology of Liver Diseases and Toxicity. *Int J Mol Sci.* 19(1):261. doi: 10.3390/ijms19010261.
- [101] Hanson A, Wilhelmsen D, DiStefano JK. (2018). The Role of Long Non-Coding RNAs (lncRNAs) in the Development and Progression of Fibrosis Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Noncoding RNA.* 4(3):18. doi: 10.3390/ncrna4030018
- [102] Abdelkhalek ZS, Abdalla MS, Fathy MM, Elbaz TM, Abdelaziz AO, Nabeel MM, Shousha HI, Kamel AH, Kamel MH. (2021). Role of circulating microRNA-21 and microRNA-215 in the diagnosis of hepatitis C related hepatocellular carcinoma. *J Infect Dev Ctries.* 15(7):997-1003. doi: 10.3855/jidc.12230
- [103] Sukowati CHC, Cabral LKD, Tiribelli C, Pascut D. (2021). Circulating Long and Circular Noncoding RNA as Non-Invasive Diagnostic Tools of Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines.* 9(1):90. doi: 10.3390/biomedicines9010090.
- [104] Mohankumar S, Patel T. (2016). Extracellular vesicle long noncoding RNA as potential biomarkers of liver cancer. *Brief Funct Genomics.* 15(3):249-56. doi: 10.1093/bfpg/elv058
- [105] Dhamija S, Menon MB. (2021). Measuring lncRNA Expression by Real-Time PCR. *Methods Mol Biol.* 2348:93-111. doi: 10.1007/978-1-0716-1581-2_6.

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.