

**ΠΡΟΤΑΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ
ΠΡΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΗΠΑΤΟΣ**

1. ΤΙΤΛΟΣ: ΗΠΑΤΙΚΑ ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΕΠΙΘΗΛΙΟ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ: ΡΟΛΟΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΙΝΩΣΗΣ ΣΤΗ ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

2. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: Ντίνα Γ. Τηνιακού¹

Ιδιότητα-Θέση : Παθολογοανατόμος - Αναπλ. Καθηγήτρια Ιστολογίας-Εμβρυολογίας
Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών

Διεύθυνση : Μ. Ασίας 75, Γουδή 11527 Αθήνα

Τηλέφωνο : 210-7462362, 6937-662894

Φαξ : 210-7462340

e-mail : dtiniak@med.uoa.gr

ΣΥΝΕΡΕΥΝΗΤΕΣ

1. Ιωάννα Δελλαδέτσιμα, Αναπλ. Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών²
2. Γεώργιος Β. Παπαθεοδωρίδης, Αναπλ. Καθηγητής Παθολογίας-Γαστρεντερολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών³
3. Ειρήνη Βαφειάδη-Ζουμπούλη, Αναπλ. Καθηγήτρια Παθολογίας-Γαστρεντερολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών⁴
4. Ιωάννης Ελευσινιώτης, Επικ. Καθηγητής Παθολογίας, Τμήματος Νοσηλευτικής Πανεπιστημίου Αθηνών⁵
5. Πρόδρομος Χυτίρογλου, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης⁶
6. Ιωάννης Γουλής, Επικ. Καθηγητής Γαστρεντερολογίας Ιατρικής Σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης⁷
7. Σαββούλα Σαββίδου, ειδικ. Παθολόγος-Διδάκτορας Ιατρικής Σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης⁷

8. Μαρία Μελαχροινού, Αναπλ. Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Πατρών⁸
9. Φώτης Καλφαρέντζος, Καθηγητής Χειρουργικής - Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Πατρών⁹
10. Μαριάννα Αργέντου, Επιμελήτρια Β', Πανεπιστημιακή Χειρουργική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών⁹
11. Μαρίνα Παλαιολόγου, Βιολόγος- Διδάκτορας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών¹

ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ-ΚΛΙΝΙΚΕΣ

¹Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

²Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

³Β' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Γ.Ν. Αθηνών «Ιπποκράτειο»

⁴Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, «Λαϊκό» Γ.Ν. Αθηνών

⁵Παθολογική Κλινική Τμήματος Νοσηλευτικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Γ.Ο.Ν.Κ. «ΑΓΙΟΙ ΑΝΑΡΓΥΡΟΙ»

⁶Εργαστήριο Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

⁷Δ' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, «Ιπποκράτειο» Γ.Ν. Θεσσαλονίκης

⁸Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

⁹Μονάδα Τεχνητής Διατροφής και Κλινικά Σοβαρής Παχυσαρκίας, Χειρουργική Κλινική, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

α) Υπάρχουσες γνώσεις και σημαντικότητα του προτεινόμενου θέματος

Γενικά

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) είναι η πιο κοινή αιτία χρόνιας ηπατοπάθειας στο Δυτικό κόσμο με επιπολασμό 10%-30% στους ενήλικες (1). Η συχνότητα εμφάνισής της, όχι μόνο σε ενήλικες αλλά και σε παιδιά, αυξάνεται ταχύτατα καθώς σχετίζεται με τα αυξανόμενα ποσοστά παχυσαρκίας και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 παγκοσμίως (2). Η NAFLD είναι μια περίπλοκη μεταβολική νόσος η οποία συνδέεται αιτιολογικά με την αντίσταση στην ινσουλίνη και θεωρείται από πολλούς ως η ηπατική εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου (3).

Διάγνωση της NAFLD/NASH

Η διάγνωση της NAFLD είναι κλινικο-παθολογοανατομική: η ελάχιστη ιστολογική αλλοίωση είναι η ηπατοκυτταρική στεάτωση (λίπωση), δηλαδή η συσσώρευση τριγλυκεριδίων στα ηπατοκύτταρα σε ασθενείς που δεν καταναλώνουν σημαντική ποσότητα αλκοόλ (14 ποτά/εβδομάδα για τις γυναίκες, 21 ποτά/εβδομάδα για τους άνδρες) (2,4). Η NAFLD διαθέτει ευρύ ιστολογικό φάσμα το οποίο κυμαίνεται από την «απλή» στεάτωση, η οποία γενικά έχει καλοήγη πορεία και είναι παρούσα σε όλους τους ασθενείς, έως τη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (nonalcoholic steatohepatitis, NASH). Η NASH χαρακτηρίζεται ιστολογικά από την παρουσία στεάτωσης, λοβιακής και ενίοτε πυλαίας φλεγμονής, ηπατοκυτταρικής βλάβης, με τη μορφή ηπατοκυτταρικής διόγκωσης, αποπτωτικών σωματίων ή/και νέκρωσης, και ίνωσης (4-6). Η ίνωση στη NAFLD, χαρακτηριστικά ξεκινά στη ζώνη 3 (κεντρολοβιακή) και αρχικά είναι περικολποειδική/περικυτταρική (σαν «συρματόπλεγμα»-chickenwire). Στη συνέχεια, αναπτύσσεται πυλαία/περιπυλαία ίνωση, γεφυροποιός ίνωση και τελικά, κίρρωση (4-6). Προχωρημένη ίνωση παρατηρείται σε 10%-15% των ασθενών με NASH, ενώ εξέλιξη προς κίρρωση σε 15%-25% των περιπτώσεων. Συνολικά, 3%-5% ασθενών με NAFLD καταλήγουν σε κίρρωση (1,2). Ασθενείς με προχωρημένη ίνωση ή κίρρωση σε έδαφος NASH είναι δυνατόν να αναπτύξουν ηπατοκυτταρικό

καρκίνωμα (ΗΚΚ) (7). Η παρουσία μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας (NASH) σχετίζεται με ποσοστά 5ετούς και 10ετούς επιβίωσης που εκτιμώνται σε 67% και 59%, αντίστοιχα (8).

Τα υπάρχοντα κλινικά σκορς για τη διάγνωση της NASH στερούνται ευαισθησίας και ειδικότητας, ενώ οι συνήθεις απεικονιστικές μέθοδοι (υπερηχογράφημα, αξονική/μαγνητική τομογραφία) δεν μπορούν να διακρίνουν μεταξύ NAFLD και NASH (9). Οι μη επεμβατικές μέθοδοι για τη διάγνωση της ηπατικής ίνωσης στη NAFLD (ορολογικοί βιοδείκτες, συνδυασμοί βιοδεικτών με κλινικά και βιοχημικά στοιχεία, ελαστογραφία-Fibroscan®) έχουν στην καλύτερη περίπτωση έως 80% ακρίβεια για την ανάδειξη απουσίας ίνωσης ή προχωρημένης ίνωσης, ενώ δεν είναι κατάλληλες για την εκτίμηση ενδιάμεσων σταδίων ίνωσης (9,10). Σήμερα, βρίσκονται υπό διερεύνηση ορολογικοί δείκτες οξειδωτικού στρες, φλεγμονής, ηπατοκυτταρικής απόπτωσης και ίνωσης, όμως δεν χρησιμοποιούνται ακόμα στην κλινική πράξη (9,10). Προς το παρόν, η NASH και η παρουσία αρχόμενης ίνωσης διαγιγνώσκονται μόνο με βιοψία ήπατος, η οποία παραμένει ακόμα απαραίτητη για την εξακρίβωση ή τον αποκλεισμό της διάγνωσης NASH σε ασθενείς με απεικονιστικά ευρήματα ηπατικής στεάτωσης, συμβατά κλινικά χαρακτηριστικά, κυρίως σχετιζόμενα με την παρουσία μεταβολικού συνδρόμου και χρόνια ανεξήγητη αύξηση τρανσαμινασών στον ορό (2). Ασθενείς στους οποίους η ηπατική βιοψία έχει συνήθως ένδειξη είναι αυτοί που έχουν αναγνωρισμένους παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης NASH με σημαντική ίνωση, όπως η προχωρημένη ηλικία, η παχυσαρκία ή ο διαβήτης (2,11).

Παθογένεια ηπατικής ίνωσης στη NAFLD/NASH

Οποιαδήποτε βλάβη στο ηπατικό παρέγχυμα και/ή στο χοληφόρο δένδρο έχει ως αποτέλεσμα μια στερεότυπη απάντηση από τα μακροφάγα (κύτταρα Kupffer και πυλαία μακροφάγα) και τα ινοπαραγωγά κύτταρα του ήπατος, τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα και τους πυλαίους μυοϊνοβλάστες, που οδηγεί στην ανώμαλη εναπόθεση στοιχείων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, στην ανάπτυξη ινώδους (ουλώδους) ιστού και ως συνέπεια αυτών σε αναδόμηση (remodeling) του αγγειακού δικτύου και της παρεγχυματικής αρχιτεκτονικής. Η κίρρωση αποτελεί το τελικό στάδιο της ίνωσης και

αναδόμησης, μπορεί να οδηγήσει σε ηπατική ανεπάρκεια και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΗΚΚ (12).

Η ηπατική ίνωση και η εξέλιξή της σε κίρρωση, φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα αποτυχίας συγκεκριμένων μηχανισμών προσαρμογής και επανόρθωσης. Πρόσφατα, υποστηρίζεται ότι η απώλεια της φυσιολογικής αναγεννητικής ικανότητας των ηπατοκυττάρων και η επακόλουθη ενεργοποίηση των **ηπατικών προγονικών κυττάρων** (hepatic progenitor cells) παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ίνωσης στη χρόνια ιογενή ηπατίτιδα C και στη NAFLD (13-15). Τελικά, αυτές οι πολύπλοκες διεργασίες προκαλούν ενεργοποίηση των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων και των πυλαίων μυοϊνοβλαστών με αποτέλεσμα την ανώμαλη εναπόθεση ινώδους ιστού (12).

Η **επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή** (epithelial-mesenchymal transition, EMM) είναι μια άλλη πιθανή διεργασία μέσω της οποίας είναι δυνατόν να εναποτεθούν συστατικά εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας στο ήπαρ (16). Η EMM είναι (παθο)φυσιολογικός μηχανισμός μέσω του οποίου αλλαγές στο τοπικό μικροπεριβάλλον των επιθηλιακών κυττάρων προκαλούν τη διαφοροποίησή τους σε κύτταρα με μεσεγχυματικό φαινότυπο και λειτουργίες (16), ικανές να παράγουν στοιχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Η EMM λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυογένεση, την επούλωση τραύματος/ιστική αναγέννηση/ίνωση και τη νεοπλασία (16).

Στο αναπτυσσόμενο ήπαρ ή στο ήπαρ που έχει υποστεί βλάβη, σύμφωνα με τη θεωρία της EMM, ορισμένα επιθηλιακά κύτταρα υφίστανται EMM και εμφανίζουν ινοβλαστικό φαινότυπο. Μερικά από αυτά τα, προερχόμενα από επιθηλιακά κύτταρα, μεσεγχυματικά κύτταρα είναι δυνατόν να υποστούν την ανάστροφη διεργασία, δηλαδή μεσεγχυματο-επιθηλιακή μετατροπή (MEM), και να μετατραπούν εκ νέου σε επιθηλιακά κύτταρα που θα διαφοροποιηθούν σε ηπατοκύτταρα ή χολαγγειοκύτταρα (16). Η ισορροπία μεταξύ EMM και MEM τροποποιεί το αποτέλεσμα της χρόνιας ηπατικής βλάβης. Όταν η EMM υπερτερεί της MEM, τότε κυριαρχούν οι ινογόνοι μηχανισμοί επανόρθωσης της ηπατικής βλάβης, προκαλώντας ηπατική ίνωση (16). Πρόσφατα αποτελέσματα πειραματικών μελετών σε απόφραξη χοληφόρων (17) και κίρρωση προκαλούμενη από τετραχλωράνθρακα (18) καθώς και μελετών σε ασθενείς με χολική ή αλκοολική κίρρωση (19),

συνηγορούν υπέρ της πρόκλησης EMM ως απάντησης σε ινογόνο ηπατική βλάβη. Αντίθετα, άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι η EMM δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ηπατικής ίνωσης (20) και τα έγκυρα δεδομένα στο σύγχρονο αυτό πεδίο έρευνας της ηπατολογίας είναι αντικρουόμενα και λιγοστά.

Ηπατικά προγονικά κύτταρα και ίνωση στη NAFLD

Στο φυσιολογικό ήπαρ, η απώλεια ηπατικού παρεγχύματος αποκαθίσταται μέσω αναγέννησης των υπό φυσιολογικές συνθήκες αδρανών, γειτονικών ώριμων ηπατοκυττάρων. Όμως, προϋπάρχουσες ηπατικές νόσοι, που σχετίζονται με οξειδωτικό στρες, όπως ιογενής ηπατίτιδα, λιπώδης νόσος ήπατος, αιμοχρωμάτωση και άλλες, ελαττώνουν σημαντικά την αναγεννητική ικανότητα των ηπατοκυττάρων, προάγοντας την ενεργοποίηση ενός δευτέρου επικουρικού μηχανισμού ηπατικής αναγέννησης, αυτού του πολλαπλασιασμού των ηπατικών προγονικών κυττάρων (ΗΠΚ) (121).

Τα ΗΠΚ, τα οποία καλούνται ωοειδή κύτταρα (oval cells) στα τρωκτικά, εδράζονται στους πόρους του Hering στην περιπυλαία ζώνη, είναι τουλάχιστον διδύναμα και ικανά να διαφοροποιηθούν προς ηπατοκύτταρα και χολαγγειοκύτταρα. Τυπικά, επί ενεργοποίησής τους, τα ΗΠΚ σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα από σωληνίσκους και αλύσους μεμονωμένων μικρών κυττάρων στο όριο πυλαίου διαστήματος-ηπατοκυτταρικού παρεγχύματος, το οποίο είναι γνωστό ως χολαγγειολική αντίδραση (ductular reaction) (22,23).

Κατά την ινογένεση, μελέτες σε λιπώδες ήπαρ τρωκτικών (24-26) και ασθενών με ιογενή ηπατίτιδα C (13,15), ALD (24) και NAFLD (14, 24) έχουν δείξει ότι υπάρχει στενή σχέση μεταξύ χολαγγειολικής αντίδρασης, βαρύτητας της νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας και σταδίου ίνωσης. Ειδικότερα, στη NAFLD, στη μοναδική μέχρι σήμερα μελέτη σε ικανό αριθμό ενηλίκων ασθενών (n=107, controls=11) (14), η έντονη χολαγγειολική αντίδραση σχετίστηκε με εντονότερη νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα της NASH, προχωρημένη ίνωση και ανεπάρκεια ηπατοκυτταρικής αναγέννησης. Διαφάνηκε ότι στη NASH, ένας εναλλακτικός μηχανισμός ηπατικής αναγέννησης προάγει την ενεργοποίηση των ΗΠΚ και κατά συνέπεια την περιπυλαία χολαγγειολική αντίδραση, η οποία θεωρείται υπεύθυνη για την ανάπτυξη της περιπυλαίας ίνωσης (15,27). Μόλις προ εξαμήνου σε μικρό

αριθμό παιδιών (n=30) με NAFLD, καταδείχθηκε ανοσοϊστοχημικά ότι τα ΗΠΚ εκφράζουν αντιποκίνες και ότι η ενεργοποίηση τους παίζει ρόλο στην απάντηση του ήπατος στο οξειδωτικό στρες και σχετίζεται με την ανάπτυξη ίνωσης και εξέλιξης σε NASH (28).

Επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή και ίνωση στη NAFLD

Στη NAFLD, τα στοιχεία σχετικά με το ρόλο της EMM είναι περιορισμένα. Μελέτη σε κυτταροκαλλιέργειες και πειραματικά μοντέλα ηπατικής βλάβης σε ποντίκια, κατέδειξε ότι η EMM των ΗΠΚ στη NAFLD συμβάλλει στην ανάπτυξη της ίνωσης και διαμεσολαβείται μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Hedgehog (Hh) (25,29). Το μονοπάτι Hh εμπλέκεται στην EMM κατά την εμβρυογένεση και την καρκινική μετάσταση (16). Πρόσφατη ανοσοϊστοχημική μελέτη κατέδειξε ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Hh στη NAFLD (n=90) σχετίζεται με τη βαρύτητα της ηπατικής βλάβης και το στάδιο της ίνωσης στην παθογένεια της ίνωσης (30). Σε περιορισμένο υλικό NAFLD (n=16) παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των ηπατοκυττάρων που εξέφραζαν Shh (συνδέτης του Hh), και ο αριθμός των ανοσοθετικών χολαγγειολικών κυττάρων (ΗΠΚ) για το προϊόν του γονιδίου Gli2 (στόχος του Hh) και το δείκτη S100A4 (δείκτης EMM) αυξάνεται παράλληλα με τη βαρύτητα της ηπατικής ίνωσης (31). Επιπλέον, στη NASH η ενεργοποίηση του μονοπατιού Hh επάγει την έκφραση οστεοποντίνης (μιας προ-ινωτικής πρωτεΐνης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και γνωστής κυτοκίνης) στα ΗΠΚ. Σε βιοψίες ήπατος ασθενών με NASH, η αύξηση της έκφρασης της οστεοποντίνης στα ΗΠΚ συσχετίστηκε με το στάδιο ίνωσης, ενώ σε κυτταροκαλλιέργειες η οστεοποντίνη προήγαγε την ινογόνο δράση των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων (31).

Πρόσφατα, σε ανοσοϊστοχημική μελέτη βιοψιών ήπατος από ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (n=78), παρατηρήθηκε ότι η παρουσία αντίστασης στην ινουλίνη συμβάλλει στην ανάπτυξη της ηπατικής ίνωσης μέσω ενεργοποίησης ΗΠΚ που εκφράζουν δείκτες EMM (32).

Ηπατικά προγονικά κύτταρα και επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή στη NAFLD

Στη NAFLD, έως σήμερα δεν έχει μελετηθεί εμπειριστατωμένα ο ακριβής ρόλος των ΗΠΚ και της EMM στην ανάπτυξη της ίνωσης. Επίσης, δεν έχει διερευνηθεί η σχέση της χολαγγειολικής αντίδρασης, ως δείκτης ενεργοποίησης ΗΠΚ, σε συνδυασμό με στοιχεία EMM, με τα δημογραφικά, ανθρωπομετρικά και βιοχημικά δεδομένα των ασθενών, με δείκτες μεταβολικού συνδρόμου και με τη βαρύτητα των ιστολογικών αλλοιώσεων της NASH. Η μελέτη ΗΠΚ με δείκτες EMM μέσω συνεστιακού μικροσκοπίου (confocal microscope) δεν έχει έως σήμερα περιγραφεί στη NAFLD.

Η διευκρίνιση της σημασίας της ενεργοποίησης των ΗΠΚ και της EMM στην παθογένεια της ίνωσης στη NAFLD αποτελεί σήμερα πεδίο εντατικής έρευνας διεθνώς. Τα αποτελέσματα αναμένεται να αναδείξουν νέους μεσολαβητές της ίνωσης στη NAFLD/NASH και ελκυστικούς στόχους για την ανάπτυξη αντι-ινωτικών θεραπειών.

β) Εμπειρία-Τεχνογνωσία του Επιστημονικού Υπεύθυνου και των συνεργυνητών επί του προτεινόμενου θέματος

Το Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας (Ντ. Τηνιακού), το Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών (Ι. Δελλαδέτσιμα) και το Εργαστήριο Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Π. Χυτίρογλου), αποτελούν διεθνώς γνωστά κέντρα στο χώρο της Παθολογικής Ανατομικής γενικότερα, και των ηπατικών νοσημάτων ειδικότερα. Η ερευνητική μας δραστηριότητα στο χώρο της NAFLD και των ΗΠΚ εκφράζεται άμεσα από τις διεθνείς δημοσιεύσεις σε σημαντικά περιοδικά (4-6,15,33-40), ελληνικές δημοσιεύσεις (11), ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια, προσκλήσεις σε σχετικές ομιλίες κλπ.

Στις Α' και Β' Πανεπιστημιακές Παθολογικές Κλινικές της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών (Ειρ. Βαφειάδη-Ζουμπούλη και Γ. Παπαθεοδωρίδης, αντίστοιχα), στη Δ' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Ι. Γουλής, Σ. Σαββίδου) και στην Παθολογική Κλινική Τμήματος Νοσηλευτικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Γ.Ο.Ν.Κ. «ΑΓΙΟΙ ΑΝΑΡΓΥΡΟΙ (Ι. Ελευσινιώτης) παρακολουθείται ένας

σημαντικός αριθμός ασθενών με NAFLD, σε αρκετούς από τους οποίους η νόσος έχει επιβεβαιωθεί ιστολογικά με διαδερμική βιοψία ήπατος, που θα αποτελέσει μια πηγή άντλησης ασθενών. Ειδικότερα, στη Β' Πανεπιστημιακή Κλινική της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών υπάρχει από ετών έντονο ενδιαφέρον για τη NAFLD, που έχει εκφραστεί με πληθώρα ανακοινώσεων σε ελληνικά και διεθνή συνέδρια και αρκετών πλήρων δημοσιεύσεων σε διεθνή περιοδικά (11,41-45).

Στη Μονάδα Τεχνητής Διατροφής και Κλινικά Σοβαρής Παχυσαρκίας της Χειρουργικής Κλινικής του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών (Φ. Καλφαρέτζος, Μ. Αργέντου), έχουν χειρουργηθεί επιτυχώς και παρακολουθούνται πολυάριθμοι ασθενείς με κλινικά σοβαρή παχυσαρκία και ιστολογικά τεκμηριωμένη NAFLD (32,46-48). Οι χειρουργικές βιοψίες ήπατος αυτών των ασθενών θα αποτελέσουν τη δεύτερη πηγή άντλησης υλικού για την προτεινόμενη μελέτη. Το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών (Μ. Μελαχροινού), αποτελεί γνωστό κέντρο στο χώρο της Παθολογικής Ανατομικής με διεθνώς αναγνωρισμένο διαγνωστικό και ερευνητικό έργο. Προηγούμενη συνεργασία του Επιστημονικού Υπεύθυνου με τους συνεργευητές του Πανεπιστημίου Πατρών απέδωσε σημαντικά δημοσιευμένα αποτελέσματα σχετικά με το ρόλο των λιποκινών και την εκτίμηση της μεμονωμένης πυλαίας ίνωσης στη NAFLD σε ασθενείς με κλινικά σοβαρή παχυσαρκία (32,48).

Στην ερευνητική μας ομάδα συμμετέχουν εξειδικευμένα εργαστήρια (Εργαστήρια Ιστολογίας-Εμβρυολογίας και Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Πατρών) που διαθέτουν την υλικοτεχνική υποδομή αλλά και έμπειρο και με σημαντική ερευνητική δραστηριότητα ιατρικό και παραϊατρικό προσωπικό, που είναι απολύτως απαραίτητα για την αξιόπιστη εργαστηριακή κάλυψη του προτεινόμενου ερευνητικού πρωτοκόλλου.

Ειδικότερα, η συν-έκφραση δεικτών ΗΠΚ και δεικτών EMM στον ηπατικό ιστό θα εκτιμηθεί με το υπερσύγχρονο συνεστιακό μικροσκόπιο που λειτουργεί στο Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών.

4. ΣΚΟΠΟΣ

Κύριος σκοπός της παρούσας ερευνητικής προτάσεως είναι η εκτίμηση του ρόλου των ηπατικών προγονικών κυττάρων (ΗΠΚ) και της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής (EMM) στην ανάπτυξη της ίνωσης στη NAFLD.

Ειδικότερα, θα διενεργηθούν:

- Ποσοτική και τοπογραφική εκτίμηση της ενεργοποίησης των ΗΠΚ σε ιστολογικό υλικό διαδερμικών και χειρουργικών βιοψιών ήπατος ασθενών με NAFLD
- Ποσοτική και τοπογραφική εκτίμηση της EMM σε ηπατικά προγονικά ή άλλα κύτταρα με τη χρήση διπλών ανοσοϊστοχημικών χρώσεων με ειδικούς δείκτες και εκτίμηση με συνεστιακό μικροσκόπιο
- Συσχέτιση της ενεργοποίησης των ΗΠΚ και της EMM με κλινικά, βιοχημικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών και ιδιαίτερα με κριτήρια μεταβολικού συνδρόμου, ιστολογικές διαγνωστικές παραμέτρους στεατοηπατίτιδας, στάδιο ηπατικής ίνωσης και αριθμό ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων.

Η ερευνητική μας πρόταση, εφόσον χρηματοδοτηθεί και πραγματοποιηθεί εγκαίρως, θα είναι μεταξύ των πρώτων μελετών διεθνώς που θα συμβάλλουν στη διαφώτιση της σχέσης ΗΠΚ και EMM και, κατά συνέπεια, στην κατανόηση της παθογένειας της ίνωσης στη NAFLD/NASH στον άνθρωπο. Η ανάδειξη νέων μεσολαβητών της ίνωσης στη NAFLD/NASH προβλέπεται να ανοίξει πεδίο έρευνας για την ανάπτυξη ειδικών αντι-ινωτικών θεραπευτικών παραγόντων.

.

5. ΛΕΠΤΟΜΕΡΗΣ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟΥ ΕΡΓΟΥ

Ασθενείς

Στη μελέτη θα συμπεριληφθούν 100 ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένη NAFLD, οι οποίοι:

α) παρακολουθούνται στα Εξωτερικά Ηπατολογικά Ιατρεία των συνεργαζομένων Παθολογικών Κλινικών και έχουν υποβληθεί σε διαδερμική βιοψία ήπατος ή

β) έχουν χειρουργηθεί λόγω κλινικά σοβαρής παχυσαρκίας στη

συνεργαζόμενη Χειρουργική Κλινική και έχουν υποβληθεί σε διεγχειρητική βιοψία ήπατος.

Κριτήρια εισόδου για τους ασθενείς της μελέτης θα είναι

1. Ηλικία 18 - 75 ετών
2. Ιστολογικά επιβεβαιωμένη διάγνωση NAFLD. Η διάγνωση θα τίθεται σε άτομα που πληρούν όλα τα παρακάτω κριτήρια α) έχουν παθολογικές τιμές βασικών τρανσαμινασών και/ή γGT, β) έχουν ένδειξη λιπώδους διήθησης ήπατος σε υπερηχογράφημα, γ) έχουν αρνητικά HBsAg, anti-HCV και anti-HIV, δ) δεν καταναλώνουν αλκοόλ σε ποσότητα >210 g για άνδρες ή >140 g για γυναίκες ανά εβδομάδα, ε) δεν λαμβάνουν ηπατοτοξικά φάρμακα ή δυνητικά ηπατοτοξικούς παράγοντες, στ) δεν έχουν γνωστό συστηματικό νόσημα με δυνητικά ηπατική συμμετοχή και ζ) έχουν βιοψία ήπατος συμβατή με NAFLD.
3. Απουσία νεοπλάσματος ήπατος.
4. Διαθέσιμο βιοπτικό υλικό κατάλληλο για την παρούσα μελέτη.

Σε όλους τους ασθενείς της μελέτης θα υπάρχουν βασικά επιδημιολογικά και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά (ύψος, βάρος, περιφέρεια μέσης), ατομικό αναμνηστικό (σακχαρώδης διαβήτης, υπέρταση, χρόνια λήψη φαρμάκων) και εργαστηριακός έλεγχος μετά από νηστεία τουλάχιστον 8 ωρών, ο οποίος θα περιλαμβάνει:

- Ηπατική βιοχημεία (ALT/AST, χολερυθρίνη, αλκαλική φωσφατάση, γGT, λευκώματα, ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών)
- Λιπιδαιμικό προφίλ (χοληστερίνη-ολική/HDL/LDL, τριγλυκερίδια)
- Διαβητικό προφίλ για μη διαβητικούς (σάκχαρο, ινσουλίνη, δείκτης HOMA-IR)
- Γενική αίματος
- Χρόνος προθρομβίνης
- Ουρία, κρεατινίνη

Ιστολογική εκτίμηση

Τα παρασκευάσματα των διαδερμικών και χειρουργικών βιοψιών ήπατος θα είναι μονιμοποιημένα σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10% και εγκλεισμένα σε παραφίνη. Ιστολογικές τομές κύβων παραφίνης θα χρωσθούν με χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης, PAS-διασάση, τριχρωμική Masson και Κυανού Βερολίνου. Η ιστολογική εκτίμηση της NAFLD θα γίνει με βάση καθιερωμένα κριτήρια (49,50) και θα βαθμολογηθούν χωριστά η στεάτωση, η λοβιακή και πυλαία φλεγμονή, η ηπατοκυτταρική διόγκωση, η χολαγγειολική αντίδραση, το στάδιο ίνωσης και άλλα ιστολογικά χαρακτηριστικά (παρουσία σωματίων Mallory-Denk, λιποφαγοκοκκιώματα, μικροκοκκιώματα, αποπτωτικά σωματίδια κ.α.). Οι συνεργαζόμενοι παθολογοανατόμοι θα συμφωνήσουν για τις λεπτομέρειες της ιστολογικής και ανοσοϊστοχημικής εκτίμησης σε κοινή συνεδρία.

Ανοσοϊστοχημική μελέτη

Η χρήση ανοσοϊστοχημικών τεχνικών επιτρέπει τη μελέτη των ΗΠΚ in situ στον ηπατικό ιστό ασθενών με NAFLD και είναι ο μόνος τρόπος να καταδειχθεί με διπλές ανοσοχρώσεις η έκφραση δεικτών EMM από τα ΗΠΚ στον άνθρωπο. Πλεονεκτούν έναντι των μοριακών τεχνικών διότι λόγω της διατήρησης της αρχιτεκτονικής του ιστού εκτιμώνται τα ΗΠΚ και η ενεργοποίησή τους (χολαγγειολική αντίδραση) σε σχέση με το μικροπεριβάλλον τους, ενώ υπάρχει η δυνατότητα τοπογραφικής εκτίμησης της έκφρασης των δεικτών EMM.

Θα χρησιμοποιηθούν τομές παραφίνης πάχους 4μm και θα εφαρμοσθούν απλές ή διπλές ανοσοϊστοχημικές τεχνικές με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων ή/και πολυκλωνικών αντιορών για την ανάδειξη μεμονωμένα ή σε συνδυασμούς:

α) Δεικτών ηπατικών προγονικών κυττάρων (ΗΠΚ)

- κερατίνη 7 (εκτίμηση ΗΠΚ, ενδιάμεσων κυττάρων [intermediate cells], κερατίνη 7- (+) ηπατοκυττάρων)
- κερατίνη 19
- EpCAM (epithelial cell adhesion molecule)

β) Δεικτών Επιθηλιο-Μεσεγχυματικής Μετατροπής (EMM)

- Βιμεντίνη (κλασσικός δείκτης μεσεγχυματικών κυττάρων)
- e-cadherin (μόριο προσκόλλησης επιθηλιακών κυττάρων, ελάττωση έκφρασης του οποίου θεωρείται δείκτης EMM)
- αSMA (ακτίνη λείων μυϊκών ινών, δείκτης μεσεγχυματικής προέλευσης και δείκτης ενεργοποιημένων ηπατικών αστεροειδών κυττάρων)
- Shh (συνδέτης του Hh που παίζει σημαντικό ρόλο στην EMM)
- Gli2 (προϊόν γονιδίου-στόχου του Hh)
- Snail (μεταγραφικός παράγοντας που παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμεσολαβούμενη από τον TGFβ EMM και ελαττώνει την έκφραση e-cadherin)
- FSP-1 (fibroblast specific protein-1, δείκτης αρχόμενης EMM)

Μάρτυρες

Ως μάρτυρες για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις θα χρησιμοποιηθούν ιστολογικές τομές φυσιολογικού ήπατος ενηλίκων (n=5) από χειρουργικά παρασκευάσματα ηπατεκτομής για όγκους ή ογκόμορφες εξεργασίες ήπατος (τομές μακράν της εστιακής αλλοίωσης) ή άλλων κατάλληλων ιστών ανάλογα με τις οδηγίες χρήσης (data sheets) των αντισωμάτων.

Εκτίμηση με συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope)

Τα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα των διπλών ανοσοχρώσεων για δείκτες ΗΠΚ και EMM θα εκτιμηθούν με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου (confocal microscope).

6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η επεξεργασία των δεδομένων θα γίνει με το στατιστικό πακέτο SPSS v. 17 (SPSS Inc, Chicago, IL). Για την εκτίμηση της κανονικότητας της κατανομής των δεδομένων θα χρησιμοποιηθεί το Kolmogorov Smirnov test. Για τις ποιοτικές μεταβλητές θα χρησιμοποιηθούν οι δοκιμασίες χ^2 ή/και Fisher's exact test, ενώ για τις ποσοτικές μεταβλητές οι δοκιμασίες t-test ή/και Mann-Whitney. Η πιθανή συσχέτιση ποσοτικών μεταβλητών θα εξετασθεί με τη δοκιμασία συσχέτισης κατά Spearman. Για τη διερεύνηση τυχόν ανεξάρτητων συσχετίσεων θα γίνουν πολυπαραγοντικές αναλύσεις με τη μέθοδο της πολλαπλής ή λογιστικής εξάρτησης. Όλες οι στατιστικές συσχετίσεις θα θεωρηθούν σημαντικές για τιμές $p < 0.05$.

7. ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΟΣ ΠΡΟΫΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ

	ΕΥΡΩ
Αμοιβές επιστημονικού προσωπικού	0
Αμοιβές τεχνικού προσωπικού	
- Τεχνολόγος (κοπή ιστολογικών τομών)	500
- Βιολόγος (ανοσοϊστοχημικές χρώσεις)	2500
Κόστος αναλωσίμων υλικών	
Αντισώματα	7.000
Ανοσοϊστοχημικά κιτς	4.000
Αντικειμενοφόρα πλακίδια/άλλα αντιδραστήρια	1.000
Συνολικό κόστος μελέτης	15.000

8. ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ

Δηλώνω υπεύθυνα ότι το προτεινόμενο ερευνητικό πρωτόκολλο δεν χρηματοδοτείται από άλλο φορέα ούτε έχει υποβληθεί αλλού προς χρηματοδότηση.

Ο Επιστημονικός Υπεύθυνος



Ντίνα Γ. Τηνιακού

27 Σεπτεμβρίου 2012

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 274-285
2. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* 2012; 142:1592-609
3. Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16(4):421-427.
4. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16:1-11.
5. Brunt EM, Tiniakos DG. Alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. In: Odze RD, Goldblum JR, and Crawford JM, eds. *Pathology of the GI tract, liver, biliary tract, and pancreas*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009:1087-1114.
6. Tiniakos DG. Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: histological diagnostic criteria and scoring systems. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22:643-650.
7. Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol* 2012; 56:1384-91
8. Neuschwander-Tetri BA, Clark JM, Bass NM, Van Natta ML, Unalp-Arida A, Tonascia J, et al. Clinical, laboratory and histological associations in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 52:913-924.
9. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med* 2011; 43:617-49
10. Mato JM, Lu SC. Where we are in the search for noninvasive nonalcoholic steatohepatitis biomarkers. *Hepatology* 2011; 54:115-7.
11. Τηνιακού Ντ, Τσομίδου Χρ, Παπαθεοδωρίδης Γ. Χρόνια ηπατίτιδα: Ο ρόλος της βιοψίας ήπατος στους κλινικούς αλγόριθμους. *Ιατρική* 2008; 93:363-368.

12. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25:195-206.
13. Clouston AD, Powell EE, Walsh MJ, Richardson MM, Demetris AJ, Jonsson JR. Fibrosis correlates with a ductular reaction in chronic hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology* 2005; 41:809-818.
14. Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE. Progressive fibrosis in NASH-altered regeneration and the ductular reaction. *Gastroenterology* 2007; 133:80-90.
15. Delladetsima J, Alexandrou P, Giaslakitou K, Psychogiou M, Hatzis G, Sypsa V, Tiniakos D. Hepatic progenitor cells in chronic hepatitis C: a phenomenon of older age and advanced liver disease. *Virchows Arch* 2010; 457:457-466.
16. Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology* 2009; 50:2007-2013.
17. Choi SS, Omenetti A, Witek RP, Moylan CA, Syn WK, Jung Y, et al. Hedgehog pathway activation and epithelial-to-mesenchymal transitions during myofibroblastic transformation of rat hepatic cells in culture and cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297:G1093-106.
18. Nitta T, Kim JS, Mohuczy D, et al. Murine cirrhosis induces hepatocyte epithelial mesenchymal transition and alterations in survival signaling pathways. *Hepatology* 2008; 48:909-919.
19. Jung Y, Brown KD, Witek RP, et al. Accumulation of hedgehog-responsive progenitors parallels alcoholic liver disease severity in mice and humans. *Gastroenterology* 2008; 134:1532-1543.
20. Wells RG. The epithelial-to-mesenchymal transition in liver fibrosis: Here today, Gone tomorrow? *Hepatology* 2010; 51:737-740.
21. Clouston A, Jonsson JR, Powell EE. Hepatic progenitor cell-mediated regeneration and fibrosis: chicken or egg? *Hepatology* 2009; 49:1424-1425.
22. Roskams T. Different types of liver progenitor cells and their niches. *J Hepatol* 2006; 45:1-4.
23. Kuwahara R, Kofman AV, Landis CS, Swenson ES, Barendsward E, Theise ND. The hepatic stem cell niche: Identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* 2008; 47:1994-2002.

24. Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, DeVos R, Huang X, et al. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol* 2003; 163:1301-1311.
25. Fleig SV, Choi SS, Yang L, Jung Y, Omennetti A, VanDongen HM, et al. Hepatic accumulation of Hedgehog reactive progenitors increases with severity of fatty liver damage in mice. *Lab Invest* 2007; 87:1227-1239.
26. van Hul NKM, Abarca-Quinones J, Sempoux C, Horsmans Y, Leclercq IA. Relation between liver progenitor cell expansion and extracellular matrix deposition in CDE-induced murine model of chronic liver injury. *Hepatology* 2009; 49:1625-1635. .
27. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 2010; 5:145-171.
28. Nobili V, Carpino G, Alisi A, Franchitto A, Alpini G, De Vito R, et al. Hepatic progenitor cells activation, fibrosis and adipokines production in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012 Mar 29. doi: 10.1002/hep.25742.
29. Syn WK, Jung Y, Omenetti A, Abdelmalek M, Guy CD, Yang L, et al. Hedgehog-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and fibrogenic repair in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2009; 137:1478-1488.
30. Guy SD, Suzuki A, Zdanowicz M, Abdelmalek MF, Burchette J, Unalp A et al. Hedgehog pathway activation parallels histologic severity of injury and fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012; 55:1711-21.
31. Syn WK, Choi SS, Liaskou E, Karaka GF, Agboola KM, Oo YH, et al. Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010; in press (Epub ahead of print 20 September)
32. Svegliati-Baroni G, Faraci G, Fabris L, Saccomanno S, Casamuro M, et al. Insulin resistance and necroinflammation drives ductular reaction and epithelial-mesenchymal transition in chronic hepatitis C. *Gut* 2011; 60:108-115
33. Argentou M, Tiniakos DG, Karanikolas M, Melachrinou M, Makri M, Kittas Ch, Kalfarentzos F. Adipokine serum levels are related to liver histology in severely obese patients undergoing gastric bypass surgery. *Obes Surg* 2009; 19:1313-1323.

34. Delladetsima JK, Kyriakou V, Vafiadis I, Karakitsos P, Smyrnoff T, Tassopoulos NC. Ductular structures in acute hepatitis with panacinar necrosis. *J Pathol* 1995; 175:69-76.
35. Delladetsima JK, Vafiadis I, Tassopoulos NC, Kyriakou V, Apostolaki A, Smyrnoff T. HBcAg and HBsAg expression in ductular cells in chronic hepatitis B. *Liver*. 1994; 14:71-75.
36. Savvidou S, Hytioglou P, Orfanou-Koumerkeridou H, Panderis A, Frantzoulis P, Goulis J. Low serum adiponectin levels are predictive of advanced hepatic fibrosis in patients with NAFLD. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43:765-772.
37. Fotiadu A, Gagalis A, Akriviadis E, Kotoula V, Sinakos E, Karkavelas G, Hytioglou P. Clinicopathological correlations in a series of adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Pathol Int* 2010; 60:87-92.
38. Fotiadu A, Tzioufa V, Vrettou E, Koufogiannis D, Papadimitriou CS, Hytioglou P. Progenitor cell activation in chronic viral hepatitis. *Liver Int* 2004; 24:268-274.
39. Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Brunt EM, Crawford JM, Crosby HA, Desmet V, Finegold MJ, Geller SA, Gouw AS, Hytioglou P, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 2004; 39:1739-1745.
40. Yoon SM, Gerasimidou D, Kuwahara R, Hytioglou P, Yoo JE, Park YN, Theise ND. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans. *Hepatology* 2011; 53(3):964-73.
41. Papatheodoridis GV, Goulis J, Christodoulou D, Manolakopoulos S, Raptopoulou M, Andrioti E, et al. High prevalence of elevated liver enzymes in blood donors: associations with male gender and central adiposity. *Eur J Gastroenterol & Hepatol* 2007; 19:281-287.
42. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Manesis EK, Kafiri G, Tiniakos DG, Archimandritis AJ. Metabolic syndrome is associated with severe fibrosis in chronic viral hepatitis and non-alcoholic steatohepatitis. *Alim Pharmacol & Therap* 2008; 27:80-89.
43. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Hadziyannis E, Georgiou A, Kafiri G, Tiniakos DG, et al. Serum adipokine levels in chronic liver diseases: association of resistin levels with fibrosis severity. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43:1128-1136.

44. Papatheodoridis GV, Chrysanthos N, Cholongitas E, Pavlou E, Apergis G, Tiniakos DG, et al. Thrombotic risk factors and liver histological lesions in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2009; 51(5): 931-938.
45. Papatheodoridis GV, Hadziyannis E, Tsochatzis E, Georgiou A, Kafiri G, Tiniakos DG, et al. Serum apoptotic caspase activity in chronic hepatitis C and nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44:e87-95.
46. Alexandrides TK, Skroubis G, Kalfarentzos F. Resolution of diabetes mellitus and metabolic syndrome following Roux-en-Y gastric bypass and a variant of biliopancreatic diversion in patients with morbid obesity. *Obes Surg* 2007; 17:176-184.
47. Kakkos SK, Yarmenitis SD, Tsamandas AC, Gogos CA, Kalfarentzos F. Fatty liver in obesity: relation to Doppler perfusion index measurement of the liver. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35:976-980.
48. Tiniakos DG, Melachrinou M, Karanikolas M, Argentou MI, Makri MG, Kittas C, Kalfarentzos F. Is isolated portal fibrosis (IPF) a common histologic finding in severely obese patients undergoing gastric bypass surgery? *Lab Invest* 2007; 87 (suppl 1): 294A.
49. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2467-74
50. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41:1313-21