

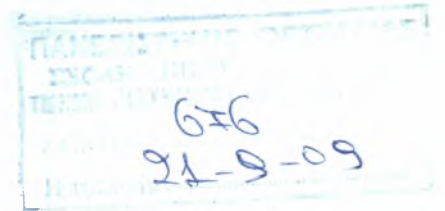
Unit of Biochemical Toxicology

Department of Biochemistry and Biophysics

Arrhenius Laboratories for the Natural Sciences

Stockholm University

Sweden



ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ
ΥΠΕΡΦΘΟΡΙΟΟΚΤΑΝΟΙΚΟΥ ΘΕΠΚΟΥ
ΟΞΕΟΣ (PFOS), ΕΝΟΣ ΕΥΡΕΩΣ
ΔΙΑΔΕΔΟΜΕΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΥ
ΡΥΠΟΥ, ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ
ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

Όνομα: Νάση Αικατερίνη

Επόπτες: Joe DePierre &
Manuchehr Abedi-Valugerdi

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:
Δημήτριος Κουρέτας

Joe DePierre

Καλλιόπη Λιαδάκη



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7873/1

Ημερ. Εισ.: 11-05-2010

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2009

ΝΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



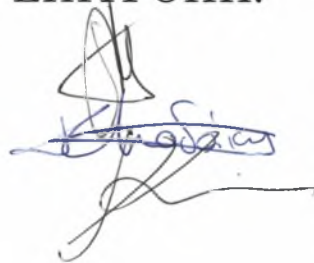
004000087074

ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ
ΥΠΕΡΦΘΟΡΙΟΟΚΤΑΝΟΙΚΟΥ ΘΕΙΚΟΥ
ΟΞΕΟΣ (PFOS) ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ
ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δημήτριος Κουρέτας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- Δημήτριος Κουρέτας
- Καλλιόπη Λιαδάκη
- Joseph W. DePierre



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεγάλη εμμονή των διαφόρων φθοριούχων χημικών στο περιβάλλον καθώς και ο μεγάλος χρόνος ημιζωής τους στο ανθρώπινο σώμα, έχουν παρακινήσει την έρευνα σχετικά την πιθανή τοξικότητα αυτών των ενώσεων στους ζωντανούς οργανισμούς. Μετά από έκθεση των ποντικών σε υψηλή δόση και για σύντομο χρονικό διάστημα, το υπερφθοριοοκτανικό θεικό οξύ (PFOS) καθώς και το υπερφθοριοοκτανικό οξύ (PFOA) προκαλούν ηπατομεγαλία, πολλαπλασιασμό των υπεροξειδισωμάτων του ήπατος και ανοσοξικότητα συμπεριλαμβανομένης της ατροφίας στον θύμο αδένα και στην σπλήνα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι περίπου 50% των μη παρεγχυματικών κυττάρων του ήπατος είναι ενδοηπατικά κύτταρα του ανοσοποιητικού καθώς και το ότι αυτό το όργανο επιτελεί μια πληθώρα απαραίτητων ανοσολογικών λειτουργιών η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε ώστε να καθορίσει τις πιθανές επιδράσεις του PFOS και PFOA στον αριθμό και στη λειτουργία των ενδοηπατικών ανοσοποιητικών κυττάρων ποντικών.

Αφού έλαβαν 0.005%(w/w) PFOS ή 0.002% (w/w) PFOA στη διαίτα τους για 10 ή 30 ημέρες, το αίμα προκειμένου να απομονωθεί ο ορός συλλέχτηκε από τους αρσενικούς C57BL/6 ποντικούς και στη συνέχεια θυσιάστηκαν, το ήπαρ τους απομονώθηκε και τα ενδοηπατικά κύτταρα του ανοσοποιητικού απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας μια νέα μέθοδο. Ο ολικός αριθμός των λευκοκυττάρων, των πρόδρομων ερυθροειδών και των μυελωδών κατασταλτικών κυττάρων στο ήπαρ ήταν σημαντικά αυξημένος μετά από τις 10 και 30 ημέρες χορήγησης με τη τροφή PFOA στους ποντικούς ενώ στους ποντικούς που είχαν λάβει PFOS μόνο ο ολικός αριθμός των λευκοκυττάρων ήταν αυξημένος και μόνο μετά από 30 μέρες έκθεσης.

Η *ex vivo* παραγωγή των φλεγμονωδών κυτοκινών TNF α που παράγεται από τα ηπατικά μακροφάγα, της ιντερφερόνης γ (IFN γ) που παράγεται από τα T λεμφοκύτταρα του ήπατος και τα φυσικά κυτταροκτόνα (NK) καθώς και των IgM αντισωμάτων που παράγονται από τα B λεμφοκύτταρα του ήπατος ήταν

σημαντικά αυξημένη μετά από τη διαίτα με το PFOS, και αυτό παρατηρήθηκε ύστερα αλλά και χωρίς διέγερση από λιπολυσακχαριτή για τα μακροφάγα και τα Β λεμφοκύτταρα, Concanavalin A για τα Τ λεμφοκύτταρα και α-γαλακτοσυλοκεραμίδιο για τα ΝΚΤ κύτταρα. Η παραγωγή των ίδιων κυτοκινών από τα Τ λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα ήταν επίσης αυξημένη μετά από διαίτα με το PFOA. Η αυξημένη παραγωγή των κυτοκινών IFN γ και TNF α από τα ενδοηπατικά κύτταρα του ανοσοποιητικού μετά από διαίτα των ποντίκων με PFOS ή PFOA σχετίζεται με εμφανή τοξικότητα στο ήπαρ όπως φαίνεται άλλωστε και από την αυξημένη ενζυμική δραστικότητα στον ορό της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) και της αλάνινο αμινοτρανσφεράσης (ALT) μετά από διαίτα 10 ημερών.

Έτσι, συμπεραίνουμε ότι ακόμα και σε αυτήν τη χαμηλή δόση, το PFOS και το PFOA επάγουν την παράγωγή των φλεγμονωδών κυτοκινών η οποία τελικά οδηγεί σε βλάβη του ήπατος.

1.Εισαγωγή.....	5
1.1Υπεροξειδιοσώματα και πολλαπλασιαστές υπεροξειδιοσωμάτων.....	5
1.2Υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πολλαπλασιαστές υπεροξειδιοσωμάτων (PPARs).....	6
1.2.1 Ο μηχανισμός με τον οποίο οι PPARs ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων.....	7
1.2.2Οι τρεις ισομορφές των PPAR.....	9
1.2.3Τα πλειοτροπικά αποτελέσματα που οι πολλαπλασιαστές υπεροξειδιοσωμάτων ασκούν στο ήπαρ	10
1.2.4 Γενική τοξικότητα των πολλαπλασιαστών υπεροξειδιοσωμάτων.....	11
1.3Το ανοσοποιητικό σύστημα	11
1.3.1 Ήπαρ: Λειτουργίες και κυτταρική σύνθεση.....	13
1.3.2 Αναγέννηση του ήπατος.....	14
1.3.3Το ήπαρ και ο ρόλος του σαν όργανο του ανοσοποιητικού.....	15
1.3.4 Ο ρόλος των PPARs στην ανοσία και στην φλεγμονή.....	19
2. Η παρούσα μελέτη	20
2.1Σκοπός.....	20
2.2 Υλικά και Μέθοδοι	20
2.2.1 Χημικά.....	20
2.2.2 Πειραματόζωα και Μεταχείριση.....	20
2.2.3 Προετοιμασία της τροφής.....	21
2.2.4 Συλλογή του αίματος, του θύμου, της σπλήνας και του επιδιδυμικού λίπους.....	22
2.2.5 Κυτταρικά εναιωρήματα.....	23

2.2.6 Εκτίμηση της βιωσιμότητας των θυμοκυττάρων, των σπληνοκυττάρων, των ενδοηπατικών κύτταρων και του αριθμού των λευκοκυττάρων του αίματος.....	24
2.2.7 Καθορισμός του αιματοκρίτη και της αιμοσφαιρίνης.....	24
2.2.8 Βιοχημικές αναλύσεις του ορού: αλκαλική φωσφατάση (ALP), τριγλυκερίδια, ασπαραγινική αμινοτρανσφεράση (AST), αλανινοαμινοτρανσφεράση (ALT) και χοληστερόλη.....	25
2.2.9 Κυτταρικές καλλιέργειες και υπερκείμενα καλλιιεργειών.....	26
2.2.10 Εκτίμηση της ικανότητας πολλαπλασιασμού των T, B και NKT κυττάρων.....	27
2.2.11 Ποσοτικοποίηση των παραγόμενων IgM από τα B λεμφοκύτταρα.....	27
2.2.12 Ποσοτικοποίηση της παραγωγής της IFN γ από τα T και NKT κύτταρα.....	28
2.2.13 Ποσοτικοποίηση του TNF α που παράγεται από τα μακροφάγα.....	28
2.2.14 Κυτταρομετρία ροής.....	29
2.2.15 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων.....	29
2.3 Αποτελέσματα.....	30
2.4 Συζήτηση & Συμπεράσματα.....	41
3. Ευχαριστίες.....	44
4.Βιβλιογραφικές αναφορές.....	45

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

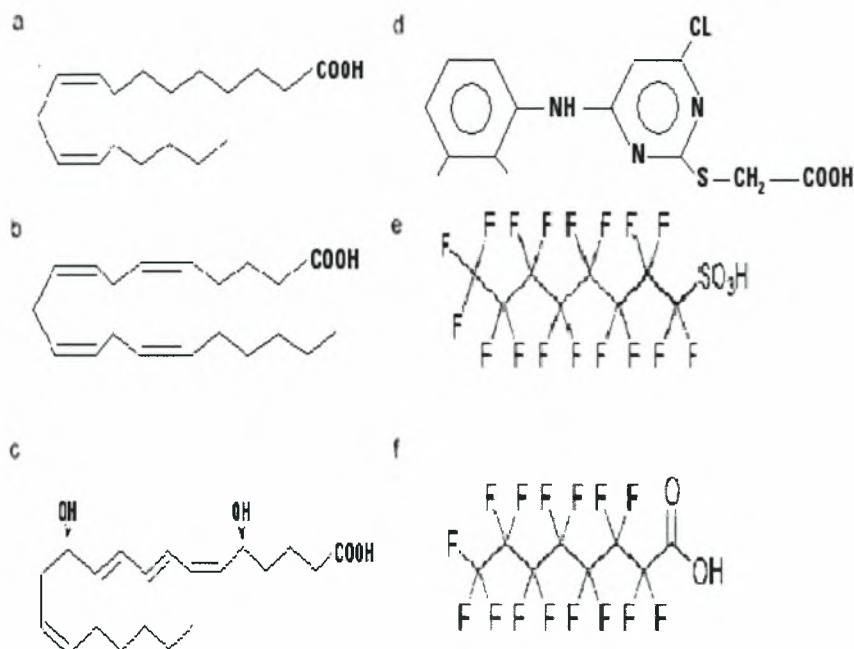
1.1 ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΕΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΩΣΩΜΑΤΩΝ

Τα υπερφθοριοαλκυλικά οξέα όπως το PFOA και το PFOS χρησιμοποιούνται σε μια πληθώρα εφαρμογών στην βιομηχανία εξαιτίας των επιφανειοδραστικών τους χαρακτηριστικών. Χρησιμοποιούνται κυρίως στην παραγωγή φθοριοπολυμερών και φθοριοελαστομερών στις βιομηχανίες παραγωγής αυτοκινήτων και ημιαγωγών αλλά μπορούν επίσης να βρεθούν σε προϊόντα όπως καλύμματα φαγητού, καλλυντικά, σε αντικολλητικά σκεύη μαγειρικής, σε αφρούς πυρόσβεσης αλλά και σε διάφορα φυτοφάρμακα(7,8) . Εξαιτίας της μεγάλης εμμονής τους στο περιβάλλον και της βιοσυσσωρευσιμότητάς τους στους ζωντανούς οργανισμούς, είναι ευρέως διανεμημένα στο περιβάλλον και έχουν βρεθεί τόσο σε υδροφόρα συστήματα, όσο και στην άγρια πανίδα αλλά ακόμα και σε ανθρώπινα δείγματα αίματος(8,9,10,11).Ο χρόνος ημιζώης των PFOA και PFOS είναι της τάξης αρκετών ετών(12).

Τα υπεροξειδισώματα είναι κυτταρικά οργανίδια που περικλείονται από μια απλή λιπιδιακή μεμβράνη και είναι παρόντα στα ευκαρυωτικά κύτταρα (1). Περιέχουν πάνω από 60 πρωτεΐνες συμπεριλαμβανόμενων μιας ποικιλίας οξειδασών όπως η άκυλο-CoA οξειδάση, η ουρική οξειδάση ,η D-αμινοοξυ οξειδάση, η οξειδάση των πολυαμινών και πολλές ακόμα(2).Τα οργανίδια αυτά είναι υπεύθυνα για μεγάλο αριθμό μεταβολικών λειτουργιών όπως η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, η γλυκονεογένεση, ο καταβολισμός των πολυαμινών και η κυτταρική αναπνοή (3, 4).

Οι πολλαπλασιαστές υπεροξειδισωμάτων συγκροτούν μια μεγάλη και ανομοιογενή ομάδα ξενοβιοτικών η οποία συμπεριλαμβάνει βιομηχανικούς πλαστικοποιητές, φυτοφάρμακα και υπολιπιδαιμικά φάρμακα (5 , 6). Στην εικόνα 1 φαίνονται οι χημικές δομές ορισμένων

ουσιών -φυσιολογικές και ξενοβιοτικά- που δρουν ως προσδέτες των υποδοχέων των πολλαπλασιαστών υπεροξειδισωμάτων.



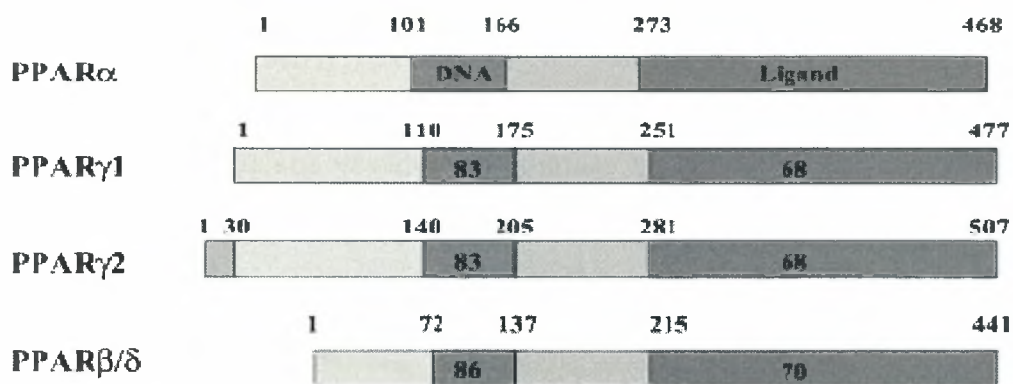
Εικόνα 1: Δομική ποικιλομορφία των χημικών ουσιών που δρουν ως προσδέτες των Υποδοχέων Πολλαπλασιαστών Υπεροξειδισωμάτων. α) Λινολεϊκό οξύ β) Αραχιδονικό οξύ γ) Λευκοτριένιο B4 δ) Wy 14.643 ε) Υπερφθοροοκτανικό Θεικό οξύ (PFOS) ς) Υπερφθοροοκτανικό οξύ (PFOA) (4,67).

1.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΕΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΣΩΜΑΤΩΝ (PPARs)

Οι PPARs είναι υποδοχείς της οικογένειας των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες και ενεργοποιούνται μετά από τη σύνδεση συγκεκριμένων προσδετών. Οι υποδοχείς αυτοί μετά από τη σύνδεση τους με ενδογενείς αλλά και εξωγενείς παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με

τον μεταβολισμό των λιπιδίων και τη κυτταρική διαφοροποίηση(18,19,20,21).Υπάρχουν 3 ισομορφές των PPARs, ο PPAR-α, ο PPAR-β/δ και ο PPAR-γ. Οι τρεις ισομορφές εκφράζονται διαφορεικά σε ποικίλους ιστούς όπου και διαδραματίζουν συγκεκριμένους ρόλους (22).

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) family



PPARα: Energy Combustion; Peroxisome Proliferator-Induced pleiotropic response

PPARγ: Energy Conservation; Adipogenesis

PPARβ/δ: Widespread fat burning; Macrophage VLDL sensor; Other functions?

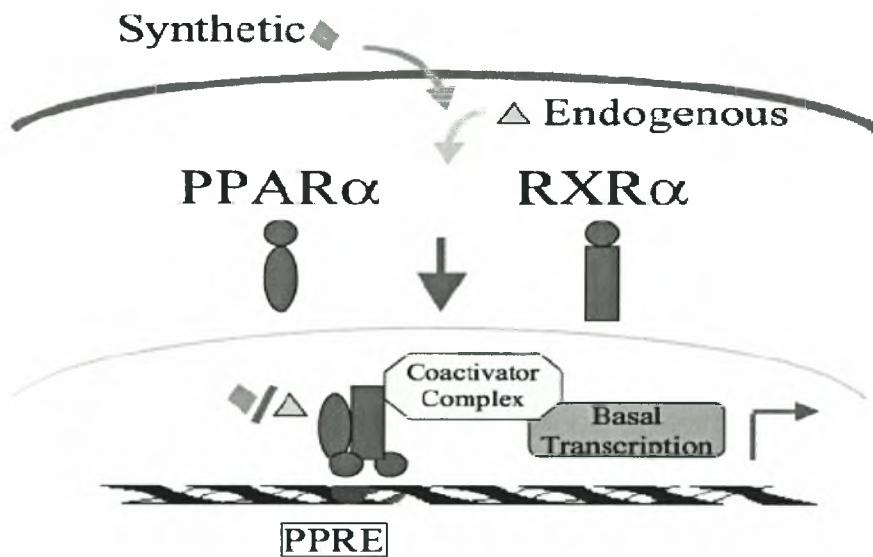
Εικόνα 2: Η οικογένεια των υποδοχέων των πολλαπλασιαστών υπεροξειδισωμάτων αποτελείται από 3 μέλη (53).

1.2.1 Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΜΕ ΤΟΝ ΟΠΟΙΟ ΟΙ PPARS ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ

Η μεταγραφική δραστηριότητα των PPARs ρυθμίζεται από τη δέσμευση συνθετικών ή ενδογενών προσδετών αλλά και από τη στρατολόγηση διαφόρων συμπαραγόντων. Σε απάντηση της δέσμευσης τους στους προσδέτες, οι PPARs σχηματίζουν διμερή με τον πυρηνικό υποδοχέα RXR και αφού στρατολογηθούν και άλλοι συμπαραγόντες ,δεσμεύονται στο

μεταγραφικό στοιχείο των πολλαπλασιαστών υπεροξειδισωμάτων(PPRE) στο DNA και επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων. Ο ρόλος των συμπαραγόντων σε αυτήν τη περίπτωση είναι να συνδέσουν τον υποδοχέα με τη βασική μεταγραφική μηχανή(Εικόνα 3). Απουσία των προσδετών τους, τα διμερή δεσμεύουν συνκαταστολείς και ένζυμα όπως αποακετυλάσες των ιστονών αλλά και ένζυμα που τροποποιούν την δομή της χρωματίνης οδηγώντας έτσι στην καταστολή ή αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων (23,24,25)

Οι PPARs ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στη β και ω-οξείδωση των λιπαρών οξέων συμπεριλαμβανόμενων των CYP4A, αφυδρογονασών του άκυλο-CoA,οξειδασών αλλά και γονίδια των οποίων τα προϊόντα συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις όπως το γονίδιο του παραγοντα NF-kB(21).



Εικόνα 3:Το μονοπάτι ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων μέσω των PPARs (24).

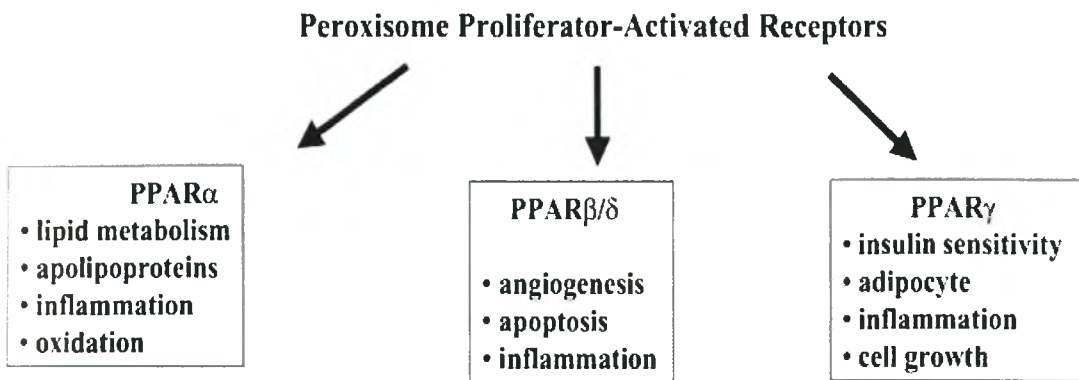
1.2.2 ΟΙ ΤΡΕΙΣ PPAR ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ

Οι PPARs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς αλλά με διαφορετικά σχετικά επίπεδα έκφρασης σε κάθε ιστό κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κάθε ισομορφή επιτελεί διαφορετικές λειτουργίες (26). Ο PPAR-α εκφράζεται στο ήπαρ, στον νεφρό, στο έντερο, στο πλακούντα, στη καρδιά, στο πάγκρεας και στον λιπώδη ιστό (4,27,28) και είναι η ισομορφή μέσω της οποίας οι πολλαπλασιαστές υπεροξειδισωμάτων ασκούν τα πλειοτροπικά τους αποτελέσματα στο ήπαρ (29). Είναι επίσης η ισομορφή η όποια ρυθμίζει τον μεταβολισμό των λιπιδίων στο ήπαρ, την ομοιόσταση της γλυκόζης, τον καταβολισμό των τριγλυκεριδίων και την φλεγμονή. Στους προσδέτες αυτής της ισομορφής ανήκουν συνθετικοί πολλαπλασιαστές υπεροξειδισωμάτων όπως η ουσία Wy-14,643 και εντομοκτόνα αλλά και ενδογενείς ουσίες όπως τα εικοσανοειδή και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (26).

Η PPARβ/δ ισομορφή φαίνεται πως συμμετέχει στην αύξηση και ανάπτυξη του οργανισμού αλλά και στην ρύθμιση της ενεργειακής ομοιόστασης σε εξωηπατικούς ιστούς (30,31). Σε PPAR-α knock out ποντικούς, η έκφραση του PPAR β/δ δεν μπορεί να επάγει τα πλειοτροπικά αποτελέσματα στο ήπαρ που αποδίδονται στην έκφραση της PPAR-α ισομορφής (29).

Η PPARγ ισομορφή η οποία ρυθμίζει την αποθήκευση της ενέργειας μέσω της σύνθεσης λιπώδους ιστού αποτελείται από δυο μέλη τους PPARγ2 και PPARγ1. Η PPARγ2 ισομορφή εκφράζεται κυρίως στον λιπώδη ιστό ενώ η PPARγ1 ισομορφή εκφράζεται σε πολλούς ιστούς σε χαμηλά επίπεδα. Η ενεργοποίηση των PPARγ ισομορφών από τους προσδέτες τους οδηγούν σε αύξηση της έκφρασης γονιδίων των λιποκυττάρων κάτι που τελικά οδηγεί στην διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και στην αποθήκευση της περίσσειας ενέργειας στο σώμα με τη μορφή τριακυλογλυκερολών (26, 32). Δυο από τους συνθετικούς προσδέτες αυτής της ισομορφής είναι τα αντιδιαβητικά φάρμακα Rosiglitazone και Pioglitazone (26). Επίσης, υπάρχουν στοιχεία που συνδέουν αυτή την ισομορφή με την έναρξη της

Λιπώδους ηπατικής στεάτωσης(33).



Εικόνα 4: Οι τρεις PPAR ισομορφές και οι μεταβολικές επιδράσεις τους(Τροποποιημένη εικόνα από 68).

1.2.3 ΤΑ ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΩΝ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΣΩΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΗΠΑΡ

Οι επιδράσεις που οι πολλαπλασιαστές υπεροξειδισωμάτων ασκούν στο ήπαρ περιλαμβάνουν υπερτροφία των ηπατοκυττάρων, πολλαπλασιασμό των υπεροξειδισωμάτων αλλά και αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων (34).Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι πολλαπλασιαστές των υπεροξειδισωμάτων μπορούν να επάγουν ενζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων όπως το σύστημα της β-οξείδωσης των λιπιδίων στα υπεροξειδισώματα κάτι που οδηγεί σε παραγωγή H_2O_2 . Ύστερα από έκθεση σε πολλαπλασιαστές υπεροξειδισωμάτων, η δραστηριότητα της άκυλο-CoA οξειδάσης, η οποία είναι υπεύθυνη για τη παραγωγή H_2O_2 , αυξάνεται 20-φορες ενώ η δραστηριότητα των ενζύμων όπως η καταλάση, που είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση του H_2O_2 αυξάνεται μόνο 3-φορές. Επιπλέον, κάποιοι πολλαπλασιαστές υπεροξειδισωμάτων έχουν την δυνατότητα να καταστέλλουν τα ενζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για την αποτοξικοποίηση των δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS).Έτσι, η αυξημένη παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες στο DNA αλλά και σε τροποποιήσεις της δομής και λειτουργίας και των υπολοίπων μακρομορίων. Επιπλέον, οι πολλαπλασιαστές

υπεροξειδιοσωμάτων δρουν ως μιτογόνα προάγοντας την σύνθεση DNA στα ηπατοκύτταρα *in vivo* και *in vitro*. Αυτά τα δεδομένα επιδεικνύουν ότι οι πολλαπλασιαστές υπεροξειδιοσωμάτων μπορεί να συνεισφέρουν και στην ανάπτυξη όγκων στο ήπαρ (6,35).

1.2.5 ΓΕΝΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΩΝ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΣΩΜΑΤΩΝ

Ένας αυξημένος αριθμός δεδομένων υποστηρίζει ότι η συσσώρευση αυτών των χημικών ουσιών στο ανθρώπινο σώμα μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στην υγεία. Πολλές μελέτες έχουν αποκαλύψει τις επιδράσεις που οι πολλαπλασιαστές υπεροξειδιοσωμάτων ασκούν στα τροκτικά, μερικές από αυτές είναι αλλαγές στο ενδοκρινικό και ανοσοποιητικό σύστημα, νευροτοξικότητα και ηπατομεγαλία, προβλήματα στην εμβρυική ανάπτυξη και βιωσιμότητα αλλά και όγκους στο ήπαρ και στους όρχεις ύστερα από μακροχρόνια έκθεση (13-17). Για παράδειγμα, η έκθεση των ποντικών με τη διαίτα στο PFOA ή στο PFOS σε υψηλές δόσεις όπως 0.02% (w/w) έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ατροφίας στον θύμο και στη σπλήνα και σημαντική μείωση του ολικού αριθμού των σπληνοκυττάρων και θυμοκυττάρων, ηπατομεγαλία, και μείωση του επιδυμικού λίπους, όλες αυτές οι αλλαγές είναι ακόμα πιο εμφανείς στην περίπτωση του PFOA(60). Όλα αυτά τα δεδομένα έχουν τραβήξει την προσοχή τόσο των ρυθμιστικών αρχών όσο και του γενικότερου κοινωνικού συνόλου.

1.3 ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το ανοσοποιητικό σύστημα χωρίζεται σε δυο κλάδους, την επίκτητη και την φυσική ανοσία. Η φυσική ανοσία είναι υπεύθυνη για την αντίσταση στην μόλυνση σε αρχικά στάδια, εμποδίζοντας την είσοδο των παθογόνων διαμέσου των φυσικών φραγμών του δέρματος και των επιθηλίων που προστατεύουν το σώμα. Οι βασικοί μηχανισμοί δράσης της φυσικής ανοσίας

είναι μέσω της έκκρισης αντιμικροβιακών πεπτιδίων, φαγοκυττάρων όπως τα μακροφάγα και μέσω του εναλλακτικού μονοπατιού του συμπληρώματος οι οποίοι ενεργοποιούνται άμεσα μετά την μόλυνση και προσπαθούν να ελέγξουν την έκταση της. Η φυσική ανοσία βασίζεται στην ύπαρξη υποδοχέων οι οποίοι αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μοριακά μοτίβα και η έκφραση αυτών των υποδοχέων από τα δραστικά κύτταρα είναι μη κλωνική.

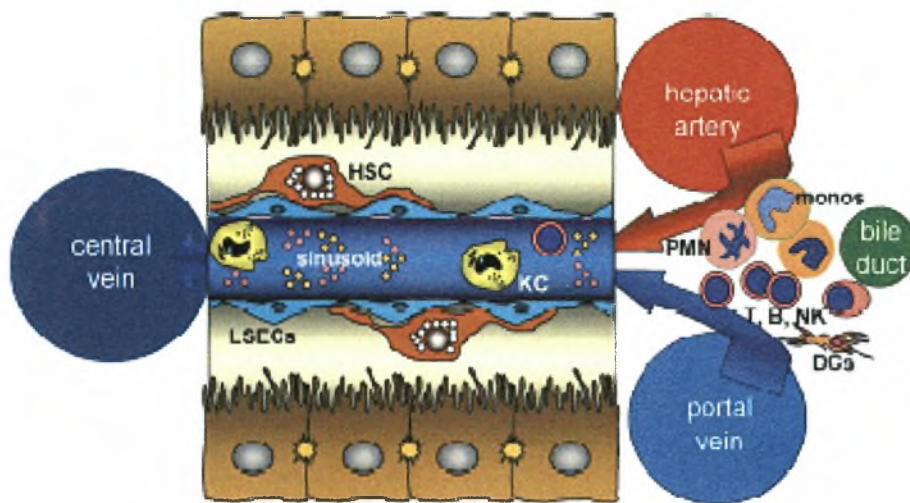
Από την άλλη πλευρά, η επίκτητη ανοσία περιλαμβάνει δυο κυρίως τύπους λεμφοκυττάρων τα T και τα B λεμφοκύτταρα τα οποία φέρουν στην επιφάνεια τους υποδοχείς αντιγόνων των οποίων η έκφραση είναι κλωνική. Η ενεργοποίηση των κυττάρων της επίκτητης ανοσίας εξαρτάται από την φυσική ανοσία, αφού για την ενεργοποίηση και την ωρίμανση των T λεμφοκυττάρων είναι απαραίτητη η διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης η οποία επιτελείται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) όπως τα δενδριτικά και τα μακροφάγα.

Η αρχική φαγοκύτωση των μικροβίων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα διευκολύνεται από υποδοχείς όπως οι Toll Like Receptors (TLR), οι οποίοι αναγνωρίζουν μικροβιακά μοριακά μοτίβα. Το τελικό βήμα στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων είναι η παρουσίαση συγκεκριμένων επιτόπων συγκεκριμένων μορίων των παθογόνων στη κυτταρική επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων μέσω σύνδεσης τους στο μείζων σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC). Οι υποδοχείς των T λεμφοκυττάρων μπορούν να αναγνωρίσουν μόνο τα αντιγόνα που είναι δεσμευμένα στο MHC και έχουν επίσης την ικανότητα να διακρίνουν «εαυτό» από «μη εαυτό». Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της επίκτητης ανοσίας είναι η ύπαρξη ανοσολογικής μνήμης που επιτελείται από έναν συγκεκριμένο υποπληθισμό των T λεμφοκυττάρων τα T λεμφοκύτταρα μνήμης (36,37,38,39,40, 41).

Η συντονισμένη λειτουργία αλλά και η διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ των δυο αυτών κλαδών του ανοσοποιητικού συστήματος εξασφαλίζει την επιτυχή εξάλειψη των παθογόνων.

1.3.1 ΤΟ ΗΠΑΡ: ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Το ήπαρ είναι ένα μοναδικό όργανο λαμβάνοντας υπόψη την ανατομική του θέση και την ανοσολογική του λειτουργία, βρίσκεται στη δεξιά πλευρά της άνω κοιλιακής χώρας, δεξιά του στομάχου. Αποτελείται από αριστερούς και δεξιούς λοβούς και ο δεξιός λοβός είναι μεγαλύτερος από τον αριστερό, κάθε λοβός διαιρείται περαιτέρω σε πολλά μικρότερα λοβίδια(48,69). Όσον αφορά τις λειτουργίες του, το ήπαρ ρυθμίζει το μεταβολισμό των λιπιδίων και των υδατανθράκων, το μεταβολισμό των βιταμινών D και K, τη σύνθεση των πρωτεϊνών του αίματος και είναι επίσης το όργανο το οποίο είναι υπεύθυνο για το μεταβολισμό των ξενοβιοτικών (42). Τα αγγεία αίματος του ήπατος είναι η ηπατική αρτηρία η οποία παρέχει το οξυγονωμένο αίμα από την αορτή στο ήπαρ, στον πυλωρό, στο δωδεκαδάκτυλο και το πάγκρεας, η πυλαία φλέβα η οποία παρέχει μη οξυγονωμένο αίμα στο ήπαρ όπου και καθαρίζεται και στη συνέχεια ρέει προς άλλες φλέβες και τα ηπατικά τριχοειδή τα οποία είναι θέσεις για οξυγονωμένο αίμα από την ηπατική αρτηρία αλλά και για το πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά αίμα από την πυλαία φλέβα. Περίπου 30% του συνολικού όγκου του αίματος περνά από το ήπαρ κάθε λεπτό και αίμα πλούσιο σε αντιγόνα από τον γαστρεντερικό σωλήνα πιέζεται μέσα στα αιμοφόρα τριχοειδή του ήπατος όπου τα αντιγόνα εξετάζονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα (43 , 44). Στην εικόνα 5 παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο το αίμα εισέρχεται μέσα στα ηπατικά τριχοειδή καθώς και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού τα οποία είναι παρόντα στο ήπαρ. Το ήπαρ αποτελείται περίπου από 70-80% από ηπατοκύτταρα και 20% από μη ηπατοκύτταρα (Εικόνα 6)(42 και 46). Το ήπαρ είναι υπεύθυνο για την ανοσολογική ανοχή έναντι αντιγόνων που λαμβάνονται μέσω του γαστρεντερικού κάτι που επιτυγχάνεται με την παραγωγή ιντερλευκίνης-10 (IL-10),προσταγλανδίνης 2(PGE 2) και άλλων κυτοκινών από τα μη παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος(45).



Εικόνα 5: Κύτταρα του ανοσοποιητικού στο υγιές ήπαρ και είσοδος του αίματος στο ήπαρ.Φαίνονται τα ηπατικά τριχοειδή,η ηπατική αρτηρία και η πυλαία φλέβα.KC:κύτταρα Kupffer,LSECs:Liver sinusoidal endothelial cells, DCs:Δενδριτικά κύτταρα, T και B λεμφοκύτταρα, NK κύτταρα,μονοπύρηννα κύτταρα,πολυμορφοπύρηννα και αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα(48).

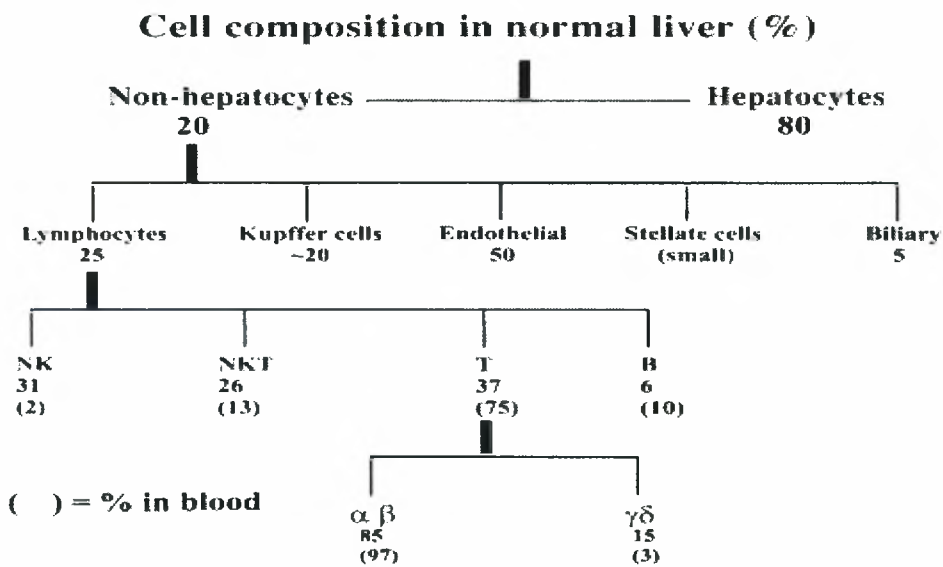
1.3.2ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

Ένα από τα χαρακτηριστικά που καθορίζουν το ήπαρ είναι η ικανότητα του να διατηρεί μόνιμα σταθερό μέγεθος παρά τους τραυματισμούς που υφίσταται.Για παράδειγμα τα θηλαστικά μπορούν να επιβιώσουν ακόμη και μετά από 75% απώλειας της ηπατικής μάζας μετά από χειρουργική αφαίρεση.Επιπλέον, η υπερανάπτυξη του ήπατος επάγεται από μια πληθώρα σημάτων όπως ο αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων και οι πολλαπλασιαστές υπεροξειδισωμάτων.Μετά από μερική ηπατεκτομή, οι λοβοί που έχουν αφαιρεθεί δεν μεγαλώνουν ξανά αλλά οι λοβοί που παραμένουν αυξάνονται μέσω πολλαπλασιασμού των ώριμων ηπατοκυττάρων προκειμένου να αντισταθμίσουν την απώλεια της ηπατικής μάζας. Η αναγεννητική απάντηση του ήπατος μετά από μερική ηπατεκτομή μεσολαβείται από έναν μεγάλο αριθμό παραγόντων όπως ο TNFα, ο TGFβ και ο EGF.Επίσης μη πεπτιδικές ορμόνες ,όπως η νορεπινεφρίνη και η τριωδιοθυροθυρονίνη μπορούν να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων *in vivo*. Αν και η ικανότητα πολλαπλασιασμού των ηπατοκυττάρων είναι αξιοσημείωτη,στις περιπτώσεις που η ικανότητα αυτή είναι ελλιπής στην αναγέννηση του ήπατος συνεισφέρουν τα πρόδρομα

ηπατικά κύτταρα τα οποία πολλαπλασιάζονται έντονα και μετά από μετακίνηση στα λοβίδια του ήπατος διαφοροποιούνται σε ηπατοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από ηπατοπαγκρεατικά βλαστικά κύτταρα. Επιπλέον ένας αριθμός εξωηπατικών πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων έχουν απομονωθεί, τα οποία έχει βρεθεί ότι *in vitro* έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε ηπατοκύτταρα, χωρίς όμως να είναι πιθανό ότι συμμετέχουν στην ανεγέννηση του ήπατος *in vivo* (69).

1.3.3 ΤΟ ΗΠΑΡ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΑΝ ΟΡΓΑΝΟ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ

Το ήπαρ αποτελείται εκτός από ηπατοκύτταρα και παρεγχυματικά κύτταρα και από λεμφοκύτταρα, κύτταρα Kupffer, ενδοθηλιακά κύτταρα, stellate κύτταρα, χολικά κύτταρα σε ποσοστά διαφορετικά από αυτά που υπάρχουν στο αίμα και στα λεμφικά γάγγλια (Εικόνα 6) (42,46,47).



Εικόνα 6: Σχετικές αναλογίες των διαφόρων κυτταρικών τύπων του ήπατος σε σύγκριση με τις αντίστοιχες αναλογίες στο αίμα (46,47).

ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ KUPFFER

Αποτελούν το 20% των μη παρεγχυματικών κυττάρων του ήπατος και είναι εξειδικευμένα μακροφάγα που εντοπίζονται στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα του ήπατος. Προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών και βρίσκονται μέσα στα αγγειακά τριχοειδή του ήπατος. Ο ρόλος τους περιλαμβάνει την ανακύκλωση γερασμένων ερυθροκυττάρων, τον καθαρισμό του αίματος από βακτηριακές ενδοτοξίνες και την φαγοκυττάρωση μικροοργανισμών(42,48). Μετά από την ενεργοποίηση τους για παράδειγμα από λιπολυσασακχαριτή (LPS) ή υπεραντιγόνα, τα κύτταρα αυτά ελευθερώνουν πρωτεΐνες οξείας φάσης, λευκοτριένια και φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως TNFα οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να ενεργοποιήσουν τα NK, NKT κύτταρα που βρίσκονται στο ήπαρ καθώς και τα T λεμφοκύτταρα του ήπατος με αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης των ηπατοκυττάρων και την ενεργοποίηση των ινωδών ηπατικών stellate κυττάρων (42,48-50).

ΗΠΑΤΙΚΑ ΤΡΙΧΟΕΙΔΙΚΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (LSEC)

Το μεγαλύτερο ποσοστό των μη παρεγχυματικών κυττάρων του ήπατος, περίπου 50% αποτελείται από τα LSECs τα οποία είναι επίσης αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που βρίσκονται στο ήπαρ. Έχουν την ικανότητα για ενδοκυττάρωση και φαγοκυττάρωση των παθογόνων και στην συνέχεια για αντιγονοπαρουσίασή τους. Επίσης εκκρίνουν κυτοκίνες όπως τον μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα (TGF-β) (42).

ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ (DCs)

Προέρχονται από τον μυελό των οστών και στο ήπαρ περίπου το 50% των δενδριτικών κυττάρων είναι ανωριμα κύτταρα με τη ικανότητα να δεσμεύουν, επεξεργάζονται και να παρουσιάζουν τα αντιγόνα (44).

STELLATE ΚΥΤΤΑΡΑ

Βρίσκονται στο διάστημα του Disse, δηλαδή στην περιοχή μεταξύ των τριχοειδών αγγείων και των ηπατοκυττάρων. Στο υγιές ήπαρ τα κύτταρα αυτά βρίσκονται σε ηρεμία και αποθηκεύουν βιταμίνη Α στο κυτταρικό τους σώμα. Μετά από τραυματισμό του ήπατος ενεργοποιούνται και χαρακτηρίζονται από πολλαπλασιασμό, συσταλτικότητα και χημειοτακτισμό με σταδιακή μείωση της αποθηκευμένης βιταμίνης Α. Η ενεργοποίηση τους οδηγεί τελικά στην ηπατική ίνωση και είναι επίσης υπεύθυνα για την έκκριση κολλαγόνου κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε κίρρωση του ήπατος.

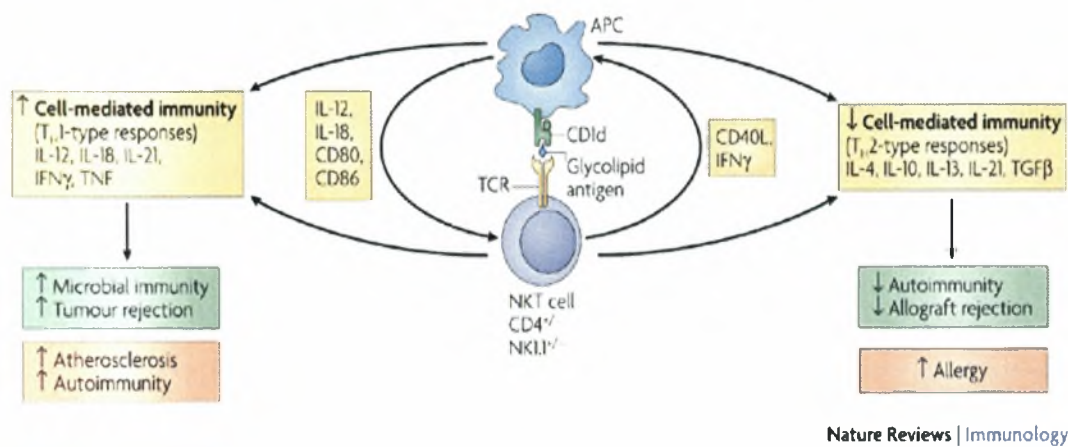
ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Το ήπαρ είναι εμπλουτισμένο με κύτταρα της φυσικής ανοσίας όπως τα κύτταρα Kupffer, τα NK και NKT κύτταρα. Τα NK κύτταρα, εμφανίζουν κυτταρολυτική δραστηριότητα ενάντια σε καρκινικά κύτταρα ή κύτταρα μολυσμένα με ιούς. Τα κύτταρα Kupffer, ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των NK κυττάρων μέσω της έκκρισης κυτοκινών όπως η ιντερλευκίνη-12(IL-12) και η ιντερλευκίνη-18(IL-18). Μετά από την διέγερση τους, τα NK κύτταρα παράγουν ταχύτατα IFN γ η οποία ελέγχει την έκκριση χημοκινών από τα ηπατοκύτταρα και τα LSECs η οποία τελικά οδηγεί στην στρατολόγηση των ηπατικών T λεμφοκυττάρων στην περιοχή (42,44,51).

Τα NKT κύτταρα είναι ένας περίεργος κυτταρικός υποπληθυσμός τα οποία εκφράζουν στην επιφανείά τους δείκτες τόσο των NK όσο και των T κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται σε σημαντικούς αριθμούς στο ήπαρ. Ο ρόλος τους έγκειται στην αναγνώριση μη πεπτιδικών αντιγόνων όπως λιπίδια και γλυκολιπίδια τα οποία θα πρέπει να παρουσιάζονται προκειμένου να αναγνωριστούν από τα NKT μετά από σύνδεση τους στα μόρια Cluster of Differentiation (CD1) στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων ή των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων όπως τα δενδριτικά και τα

μακροφάγα. Στις περισσότερες των περιπτώσεων η παρουσία της IL-12 η οποία παράγεται από τα δενδριτικά ή τα μακροφάγα είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική ενεργοποίηση των NKT κυττάρων. Μετά από την ενεργοποίησή τους τα NKT παράγουν μεγάλες ποσότητες IFN γ ή IL-4, οι οποίες μπορούν να ρυθμίσουν τις επίκτητες αποκρίσεις σε ένα προφλεγμονώδες ή σε ένα αντιφλεγμονώδες μονοπάτι, αντίστοιχα (Εικόνα 7) (42,44,51,52,66).

Επιπλέον το ήπαρ περιέχει T και B λεμφοκύτταρα της επίκτητης ανοσίας και η δραστηριότητα των T λεμφοκυττάρων είτε προς την ανάπτυξη ανοσίας είτε προς την ανάπτυξη ανοσολογικής ανοχής μετά από την αντιγονοπαρουσίαση, βασίζεται κυρίως από τις προφλεγμονώδεις ή αντιφλεγμονώδεις συνθήκες που επικρατούν στον οργανισμό.



Εικόνα 7: Ενεργοποίηση των NKT κυττάρων μετά από αντιγονοπαρουσίαση γλυκολιπιδικού αντιγόνου και κατεύθυνση ανάλογα με τις κυτοκίνες που παράγουν είτε προς αυξημένη ή μειωμένη κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία.

1.3.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ PPARs ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Οι PPARs εκφράζονται σε υψηλό επίπεδα σε πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του ανοσοποιητικού. Ο PPAR α εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα μακροφάγα όπου και ελέγχει την εκροή της χοληστερόλης (53). Οι αγωνιστές του PPAR α ασκούν αντιφλεγμονώδη

δράση στα αγγειακά κυτταρα αναστέλλοντας την έκφραση των μορίων προσκόλλησης και επάγοντας στην έκφραση της ενδοθηλιακής NO συνθετάσης (eNOS)(53). Όμως κάποιες *in vivo* μελέτες έχουν αποδώσει προφλεγμονώδη δράση στους συνδέτες του PPARα (54).

Ο PPARγ εκφράζεται στα μονοκύτταρα, στα μακροφάγα, στα δενδριτικά, στα NK κυτταρα και στα T λεμφοκύτταρα. Στα μακροφάγα αυτός ο υποδοχέας διαδραματίζει έναν σημαντικό ρολό στην ομοιόσταση των λιπιδίων. Οι αγωνιστές του ασκούν επίσης αντιφλεγμονώδη δράση σε διαφορά συστήματα φλεγμονής, όπου καταστέλλουν την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών γονιδίων ύστερα από ενεργοποίηση τους από LPS,IL-1β και IFN-γ (55,56).

Ο PPARδ εκφράζεται στα μυελώδη κυτταρα και η έκφραση του επάγεται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των ανθρώπινων μακροφάγων. Μετά την ενεργοποίηση του από τους προσδέτες του ο υποδοχέας αυτός μπορεί να αυξήσει την συσσώρευση των τριγλυκεριδίων στα μακροφάγα (57,58).

2. Η ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να καθοριστεί εάν ύστερα από μακρόχρονη και βραχυπρόθεσμη έκθεση των ποντικών σε χαμηλές συγκεντρώσεις του PFOA και του PFOS, που όμως ακόμα και σε αυτές τις χαμηλές δόσεις προκαλούν ηπατομεγαλία, επηρεάζει την λειτουργικότητα αλλά και τον φαινότυπο των διαφόρων κυτταρικών υποπληθυσμών του ανοσοποιητικού του ήπατος.

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 ΧΗΜΙΚΑ

Το PFOS (ως τετραβουτυλ-αμμωνιακό άλας, 98% καθαρότητα), το PFOA (ως ελεύθερο οξύ, 96% καθαρότητα) και τα χημικά για την προετοιμασία του phosphate buffered saline (PBS) και του Hanks Buffered Saline Solution (HBSS) συμπεριλαμβανομένων των NaCl, KCl, K₂HPO₄, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, της Bovine Serum Albumin (BSA) και το LPS αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich Sweden AB. Το Tween-20 για την προετοιμασία των διαλυμάτων επώασης και πλυσίματος που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική της ELISA αγοράστηκε από την εταιρεία USB (Cleveland, Ohio, USA) . Η Conavalin (ConA) και το Percoll αγοράστηκαν από την GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden) και το α-γαλακτοσυλοκεραμίδιο (αGalCer) από την Axxora , LLC (San Diego,CA,USA).

2.2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ

Αρσενικά C57BL/6 ποντίκια (7-8 εβδομάδων στην αρχή κάθε πειράματος) αποκτήθηκαν από την Scanbur (Solna,Stockholm,Sweden).Όλα τα πειραματόζωα τοποθετηθήκαν στις εγκαταστάσεις πειραματόζων του ινστιτούτου Wenner-Gren στο πανεπιστήμιο της Στοκχόλμης κάτω από συνθήκες 12 ωρών φωτισμού/12 ωρών σκοταδιού και με πρόσβαση σε νερό και την κατάλληλη διαίτα *ad libitum*. Όλα τα πειράματα που περιγράφονται ήταν προεγκεκριμένα από την Επιτροπή Ηθικής για Πειραματόζωα της βόρειας Στοκχόλμης με αριθμό N150/07.

2.2.3 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΡΟΦΗΣ

Για την προετοιμασία της τροφής που περιείχε το PFOS ή το PFOA, το PFOA ή το PFOS διαλυθήκαν σε 10ml νερό και στη συνέχεια

αναμιχτήκαν με 100g τροφής RMI (E) SQC η οποία περιέχει 2.71 % λίπος, 14.38% πρωτεΐνη και 61.73% υδατάνθρακες και αγοράστηκε από την (SDS,Essex, UK),στην συνέχεια προστέθηκε επιπλέον νερό περίπου 150ml .Η ποσότητα PFOA ή του PFOS που διαλύθηκε στο νερό ήταν τόση ώστε να παρασκευαστεί τροφή με περιεκτικότητα 0.002% (w/w) PFOA ή 0.005% (w/w) PFOS για τα πειράματα 10 ημερών και 0.00065% (w/w) PFOA ή 0.00165% (w/w) PFOS για τα πειράματα των 30 ημερών. Στην συνέχεια η τροφή τοποθετήθηκε σε απαγωγό προκειμένου να αποξηρανθεί για 48-72 ώρες. Η τροφή Control προετοιμάστηκε με την ίδια διαδικασία μόνο που σε αυτήν την περίπτωση δεν περιείχε ξενοβιοτικό. Η τροφή παρασκευάστηκε με αυτή τη μορφή (ξηρή) ώστε να μπορεί να γίνει πιο αξιόλογος καθορισμός της κατανάλωσης της από τα πειραματόζωα. Όλες οι τροφές αποθηκευτήκαν στους 4 °C πριν από την χρησιμοποίησή τους.

Σε αυτή τη μελέτη διεξήχθησαν ένα μακρόχρονο (30 ημέρες) και ένα βραχύχρονο πείραμα 10 ημερών και το καθένα επαναλήφθηκε δυο φορές. Στο πείραμα των 30 ημερών 3 ομάδες ποντικών χρησιμοποιήθηκαν που η καθεμία αποτελείτο από 5 ποντίκια, κάθε ομάδα έλαβε τροφή όπως φαίνεται παρακάτω:

- Ομάδα 1: τροφή χωρίς ξενοβιοτικό
- Ομάδα 2: τροφή που περιείχε 0.00065% (w/w) PFOA
- Ομάδα 3: τροφή που περιείχε 0.00165% (w/w) PFOS

Στην περίπτωση του βραχυπρόθεσμου πειράματος των 10 ημερών σχηματιστήκαν και πάλι 3 ομάδες πειραματόζωων που αυτή τη φορά κάθε ομάδα αποτελείτο από 4 ποντίκια και έλαβαν τροφή όπως φαίνεται παρακάτω:

- Ομάδα 1: τροφή χωρίς ξενοβιοτικό
- Ομάδα 2: τροφή που περιείχε 0.002% (w/w) PFOA
- Ομάδα 3: τροφή που περιείχε 0.005% (w/w) PFOS

Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιήσαμε διαφορετικές περιεκτικότητες σε ξενοβιοτικό στο μακρόχρονο και το βραχύχρονο πείραμα ήταν ότι μέσω

αυτής της διαδικασίας θέλαμε τα ποντίκια να έχουν λάβει και στα δυο πειράματα την ίδια ποσότητα ξενοβιοτικού στο τέλος των πειραμάτων. Κατά τη διάρκεια της περιόδου διατροφή τα ποντίκια ζυγίζονταν κάθε δυο ημέρες και η κατανάλωση τροφής επίσης καθοριζόταν αφαιρώντας την τροφή που είχε παραμείνει ύστερα από δυο ημέρες από την αρχική τροφή που τους είχαμε δώσει.

2.2.4 ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ, ΤΟΥ ΘΥΜΟΥ, ΤΗΣ ΣΠΛΗΝΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΠΙΔΥΔΙΜΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Μετά τη περίοδο διατροφής τους (10 ή 30 ημέρες), τα ποντίκια ύστερα από ελαφριά αναισθησία με isoflurane θυσιάστηκαν με αυχενική εξάρθρωση. Τα δείγματα αίματος που συλλέχτηκαν τοποθετηθήκαν στους 4 °C σε πάγο και στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν ώστε να απομονωθεί ο ορός του αίματος που αποθηκεύτηκε στους -20 °C. Στο ήπαρ αφού χρησιμοποιήθηκε PBS με το οποίο έγινε ένεση στην καρδιά και στην συνέχεια μεταφέρθηκε μέσω των φλεβών στην ήπαρ (liver perfusion), έγινε εκτομή, ζυγίστηκε και τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια από τα οποία μέσω μηχανικής τεχνικής που περιγράφεται παρακάτω απομονώθηκαν τα ενδοηπατικά κυτταρα του ανοσοποιητικού (Intra Hepatic Immune Cells, IHIC). Οι σπλήνες, το επιδυδικό λίπος και ο θύμος εκτμήθηκαν και ζυγίστηκαν. Στις περιπτώσεις όπου θέλαμε να προχωρήσουμε σε καλλιέργεια των ενδοηπατικών κυττάρων του ανοσοποιητικού, η όλη διαδικασία έγινε κάτω από αποστειρωμένες συνθήκες.

2.2.5 ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΑ

Το ήπαρ αφού τεμαχίστηκε σε μικρά τμήματα πιέστηκε απαλά με τη χρήση εμβόλου, δια μέσου ενός ανοξειδωτού σιδερένιου πλέγματος και το μίγμα που δημιουργήθηκε διαλύθηκε σε 50ml RPMI-1640 μέσο

καλλιέργειας το οποίο περιείχε Glutamax-1.25mM HEPES και 10% Fetal Calf Serum(FCS).Στη συνέχεια έγιναν δυο φυγοκεντρήσεις και το ίζημα που δημιουργήθηκε επαναδιαλύθηκε σε 10 ml 37.5% Percoll σε HBSS που περιείχε 100U/ml ηπαρίνη και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε. Το ίζημα που προέκυψε επαναδιαλύθηκε σε 2ml χλωριούχο αμμώνιο με 1% FCS το οποίο λύει τα ερυθροκύτταρα και φυγοκεντρήθηκε για ακόμη μια φορά. Το τελικό ίζημα που προέκυψε επαναδιαλύθηκε είτε σε 250μl πλήρους μέσου κυτταρικής καλλιέργειας είτε στο διάλυμα προκειμένου να αναλυθεί με κυτταρόμετρο ροής (FACS buffer),το οποίο περιείχε PBS,1% FCS και 0.1% NaN₃ (59).Στην περίπτωση που τα κύτταρα που απομονώσαμε προορίζονταν για κυτταρική καλλιέργεια η όλη διαδικασία γινόταν κάτω από αποστειρωμένες συνθήκες.

Οι σπλήνες μετά την εκτομή τους πιέζονταν απαλά με σιδερένιες λαβίδες σε RPMI-1640 μέσο το οποίο περιείχε Glutamax-1 και 15mM HEPES, 100 IU πενικιλίνη, 100μg/ml στρεπτομυκίνη και 0.02% διττανθρακικό νάτριο. Τα σπληνοκύτταρα που αποκτήθηκαν με αυτόν το τρόπο φυγοκεντρήθηκαν δυο φορές και τελικά το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 5 ml μέσο καλλιέργειας, ο αριθμός των κύτταρων στην συνέχεια μετρήθηκε όπως περιγράφεται παρακάτω και χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό control στις λειτουργικές αναλύσεις των ενδοηπατικών κύτταρων του ανοσοποιητικού. Στην περίπτωση των αναλύσεων του φαινοτύπου τα σπληνοκύτταρα που απομονώθηκαν όπως αναφέρεται παραπάνω επαναδιαλύθηκαν σε PBS και όχι σε μέσο καλλιέργειας.

Ο θύμος μετά την εκτομή του, πιέστηκε απαλά με τις λαβίδες σε PBS και τα θυμοκύτταρα που αποκτήθηκαν αφού φυγοκεντρήθηκαν δυο φορές επαναδιαλύθηκαν σε 5 ml PBS και στη συνέχεια μετρήθηκε ο αριθμός τους.

2.2.6 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΘΥΜΟΚΥΤΤΑΡΩΝ, ΤΩΝ ΣΠΛΗΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ, ΤΩΝ ΕΝΔΟΗΠΙΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων προσδιορίστηκε με βάση τον χρωματισμό και αποκλεισμό των νεκρών κυττάρων μετά από χρωματισμό τους με τη χρωστική Turk Blue και μέτρηση τους με τη βοήθεια μικροσκοπίου, η βιωσιμότητα των κυττάρων ήταν πάντοτε μεγαλύτερη από 90%.

2.2.7 ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΚΡΙΤΗ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Η αιμοσφαιρίνη προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το μηχάνημα Hemocue 201+(Hemocue AB, Angelholm, Sweden) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο αιματοκρίτης προσδιορίστηκε μετά από φυγοκέντρηση του ηπαρινισμένου αίματος στις 10,000rpm για 5min και διαιρώντας τον όγκο των ερυθρών αιμοσφαιρίων μετά την φυγοκέντρηση με τον αρχικό όγκο αίματος που φυγοκεντρήθηκε.

2.2.8 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ: ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ (ALP), ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ, ΑΣΠΑΡΑΓΙΝΙΚΗ ΑΜΙΝΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ (AST), ΑΛΑΝΙΝΟΑΜΙΝΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ (ALT) ΚΑΙ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της ALP έγινε μέσω ηλεκτροχημικής ανίχνευσης του προϊόντος (φαινύλιο) που παράγεται ύστερα από τη διάσπαση του υποστρώματος της φωσφορικό φαινύλιο.

Η ALAT καταλύει την μεταφορά την αμινομάδας από την L-αλανίνη στο α-Κετογλουταρικό με τελικό σχηματισμό πυροσταφυλλικού και γλουταμικού. Παρουσία της γαλακτικής αφυδρογονάσης το πυροσταφυλλικό αντιδρά με NADH και σχηματίζει NAD⁺. Έτσι, ο ρυθμός οξειδωσης του

NADH σε NAD⁺ μπορεί να μετρηθεί ως μείωση στην απορρόφηση στα 340nm η οποία είναι ανάλογη της ενζυμικής δραστηριότητας της ALAT.

Η ASAT καταλύει τη μεταφορά αμινοομάδας από το L-ασπαρτικό στο α-Κετογλουταρικό με αποτέλεσμα τον σχηματισμό οξαλοξικού και γλουταμικού. Το οξαλοξικό που σχηματίζεται αντιδρά παρουσία της μηλικής αφυδρογονάσης με το NADH και σχηματίζει NAD⁺. Έτσι ο ρυθμός οξείδωσης του NADH σε NAD⁺ μετράται ως μια μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 340nm η οποία είναι ανάλογη της δραστηριότητας της ASAT η οποία είναι παρούσα στο δείγμα.

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση υδρολύει τα τριγλυκερίδια σε γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η γλυκερόλη που παράγεται παρουσία ATP μετατρέπεται σε 3-φωσφορική γλυκερόλη παρουσία του ενζύμου κινάση της γλυκερόλης, στην συνέχεια η 3-φωσφορική γλυκερόλη οξειδώνεται από το ένζυμο οξειδάση της φωσφορικής γλυκερόλης και παράγει υπεροξειδίο του υδρογόνου. Στη συνέχεια το υπεροξειδίο του υδρογόνου αντιδρά με φαινολικές ουσίες και 4 αμινοαντιπυρίνη παρουσία της υπεροξειδάσης ώστε τελικά παράγεται το κοκκινόχρωμο προϊόν κινονεμίνη. Η ένταση του χρώματος του προϊόντος είναι ανάλογη του ποσοστού των τριγλυκεριδίων που βρίσκονται στο δείγμα.

Το πρώτο βήμα στον προσδιορισμό της χοληστερόλης του ορού ήταν η διάσπαση των λιποπρωτεϊνών ώστε να ελευθερωθεί η χοληστερόλη και οι εστέρες της που δημιουργούν σύμπλοκα με τις λιποπρωτεϊνες με την χρησιμοποίηση του απορρυπαντικού Triton-X. Στη συνέχεια η χοληστερόλη ελευθερώνεται από τους εστέρες της με τη χρήση του ενζύμου υδρολάση εστέρων της χοληστερόλης. Τελικά η χοληστερόλη οξειδώνεται από το ατμοσφαιρικό O₂ παρουσία του ενζύμου οξειδάση της χοληστερόλης και παράγεται H₂O₂ και 4-χολεστ-4-εν-3-ονη. Το H₂O₂ στη συνέχεια αντιδρά με φαινόλη και 4-αμινοφαιναζονη παρουσία του ενζύμου υπεροξειδάση και παράγεται το χρωμογόνο προϊόν κινονεμίνη το οποίο απορροφά μέγιστα στα 500nm.

2.2.9 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Τα ενδοηπατικά κυτταρα του ανοσοποιητικού που απομονώθηκαν όπως αναφέρεται παραπάνω και τα σπληνοκύτταρα από τα ποντίκια της ομάδας control, επαναδιαλύθηκαν σε πλήρες μέσο καλλιέργειας RPMI-1640 που περιείχε Glutamax-1, 25Mm HEPES, 15% FCS, 100 IU πενικιλίνη, 100 μg/ml στρεπτομυκίνη, 0.5 μg/ml fungizone, 0.02% διττανθρακικό νάτριο, 5×10^{-5} M μερκαπτοαιθανόλη και 10 mM πυροσταφυλικό νάτριο. Η συγκέντρωση των κυττάρων προσαρμόστηκε σε 5×10^6 κυτταρα ανά ml και στη συνέχεια τα κυτταρα καλλιεργήθηκαν εις τριπλούν, σε πλακίδιο κυτταρικής καλλιέργειας με 96 πηγαδάκια. Τα κυτταρα στη συνέχεια διεγέρθηκαν για να παράγουν κυτοκίνες προσθέτοντας το κατάλληλο αντιγόνο προκειμένου να διεγείρουμε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο. Έτσι προσθέσαμε 50μl πλήρες μέσο καλλιέργειας που περιείχε 25μg/ml LPS για την διέγερση των μακροφάγων και των B κυττάρων για παραγωγή TNFα και IgM αντίστοιχα, 50μl πλήρες μέσο καλλιέργειας που περιείχε ConA(3μg/ml) για την διέγερση παραγωγής IFNγ από τα T λεμφοκύτταρα και αGalCer (100ng/ml) για την διέγερση των NKT κυττάρων και παραγωγή από αυτά IFNγ. Μετά την προσθήκη του κατάλληλου αντιγόνου τα πλακίδια καλλιέργειας επωαστήκαν για 24 και 72 ώρες (οι οποίες είναι το ιδανικό χρονικό διάστημα για την ενεργοποίηση των μακροφάγων και τον πολλαπλασιασμό των T, B και NKT κυττάρων αντίστοιχα) στους 37 °C και κάτω από συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρας με παροχή 5% CO₂.

2.2.10 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ T, B ΚΑΙ NKT ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας την ανάλυση με methyl tetrazolium (MTT) το οποίο αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma Aldrich Sweden AB. Μετά την επώαση των κυττάρων με τον συγκεκριμένο αντιγονικό διεγέρτη, το υπερκείμενο από τις καλλιέργειες συλλέχτηκε από τα πηγαδάκια του πλακιδίου καλλιέργειας και στα κυτταρα

τα οποία παρέμειναν προσκολλημένα στον πάτο του πλακιδίου προστέθηκε 20μl MTT. Η επώαση με το MTT συνεχίστηκε για ακόμα 4 ώρες στους 37 °C κάτω από συνθήκες υγρασίας και με παροχή 5% CO₂. Μετα το τέλος της επώασης, οι κρύσταλλοι φορμαζίνης που σχηματιστήκαν με τη δράση της μιτοχονδριακής αφυδρογονάσης των κυττάρων διαλυτοποιήθηκαν και μετά από 15 λεπτά, η διαφορά στην οπτική απορρόφηση στα 570nm και 690nm καθορίστηκε χρησιμοποιώντας το κατάλληλο μηχάνημα (microplate reader)(Molecular Devices Corporation Orleans Drive, Sunnyvale, CA, USA). Το αποτέλεσμα της διέγερσης του πολλαπλασιασμού (SI) υπολογίστηκε διαιρώντας την οπτική απορρόφηση από τις διεγερμένες με αντιγόνο καλλιέργειες με την οπτική απορρόφηση των αντιστοιχών μη διεγερμένων καλλιεργειών.

2.2.11 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ IgM ΑΠΟ ΤΑ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα υπερκείμενα των κυτταρικών καλλιεργειών οι οποίες είχαν διεγερθεί με LPS μετά την επώαση συλλέχτηκαν και το περιεχόμενο τους σε IgM προσδιορίστηκε μέσω sandwich ELISA. Κάθε ένα πηγαδάκι από το μικροπλακίδιο (με 96 πηγαδάκια) της ELISA καλύφθηκε με αντισώματα αντι- IgM έναντι των IgM αντισωμάτων ποντικού (2μg/ml) και επώαστηκε για όλη τη διάρκεια της νύχτας στους 4 °C, στη συνέχεια οι ελεύθερες περιοχές δέσμευσης πάνω στο μικροπλακίδιο αποκλείστηκαν μετά από επώαση για 2 ώρες με PBS που περιείχε BSA 1%. Μετά από πλύσιμο των μικροπλακιδίων (3 φορές) 10μl του του υπερκειμένου της καλλιέργειας και 90 μl PBS προστεθήκαν σε κάθε πηγαδάκι και το μικροπλακίδιο επώαστηκε για 3 ώρες στους 37 °C. Στη συνέχεια το μικροπλακίδιο πλύθηκε 5 φορές με PBS-Tween και επώαστηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με αντισώμα αντι-IgM έναντι των IgM του ποντικού σημασμένο με αλκαλική φωσφατάση. Τελικά προστέθηκε διάλυμα που περιείχε το υπόστρωμα π-νιτροφαινυλφωσφορικό και επώαστηκε για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και η οπτική απορρόφηση του παραγόμενου έγχρωμου προϊόντος προσδιορίστηκε στα 405nm.

2.2.12 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ IFN γ ΑΠΟ ΤΑ T ΚΑΙ NKT ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα υπερκείμενα που συλλέχτηκαν ύστερα από 72 ώρες επώασης από τις κυτταρικές καλλιέργειες που είχαν διεγερθεί είτε με ConA(Τ λεμφοκύτταρα) είτε με α GalCer (NKT κυτταρα) χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ποσότητας IFN γ που περιείχαν μέσω ELISA.Για τον προσδιορισμό αυτό χρησιμοποιήθηκε το kit για προσδιορισμό IFN γ ποντικού (Mabtech AB,Stockholm, Sweden) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 405nm.Οι συγκεντρώσεις IFN γ προσδιορίστηκαν μέσω standard καμπύλης που κατασκευάστηκε σε συμφωνία με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.13 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ TNF α ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

Τα υπερκείμενα που συλλέχτηκαν μετά από 24 ώρες επώασης από τις κυτταρικές καλλιέργειες που είχαν διεγερθεί με LPS προσδιορίστηκαν για με τη χρησιμοποίηση ELISA kit(eBIOSCIENCE) για τον TNF α ,και η οπτική απορρόφηση προσδιορίστηκε μέσω της διαφοράς απορρόφησης στα 450nm και 570nm.

2.2.14 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Ο φαινότυπος των ενδοηπατικών κυττάρων του ανοσοποιητικού καθορίστηκε χρησιμοποιώντας ένα σύνολο αντισωμάτων έναντι ειδικών αντιγόνων επιφανείας των κυττάρων. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα: αντι-CD45 σημασμένο με FITC(fluorescein isothiocyanate),αντι-CD44-FITC,αντι-CD4-FITC,αντι-CD19-FITC,αντι-CD11b-FITC,αντι- γ δT-FITC,αντι-CD138 σημασμένο με φυκοερυθρίνη(PE), αντι-TER119-PE,αντι-NK1.1-PE,αντι-Gr1-PE και αντι-CD8 σημασμένο με

peridinin chlorophyll protein(PerCP).Τα ενδοηπατικά κύτταρα του ανοσοποιητικού επαναδιαλύθηκαν σε 50μl διαλύματος για κυτταρομετρία ροής(FACS buffer) και στη συνέχεια επώαστηκαν με τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων επιφανείας στον πάγο και στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα πλύθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 200 g,επαναδιαλύθηκαν σε 400μl FACS buffer και αναλύθηκαν με τη χρησιμοποίηση κυτταρομέτρου ροής μονού laser (Becton Dickinson,San Jose,CA,USA).Το σήμα εκπομπής από τα FITC,PE και PerCP ανιχνευτήκαν στα 530, 575 και 670nm αντίστοιχα. Τα δεδομένα που αποκτήθηκαν αναλύθηκαν με το λογισμικό CellQuest.

2.2.15 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

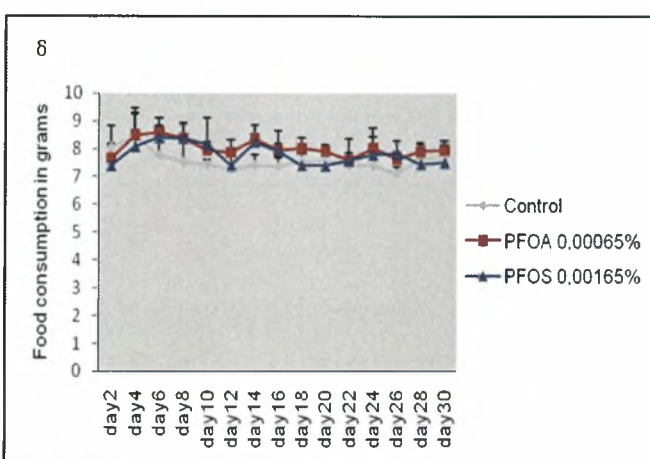
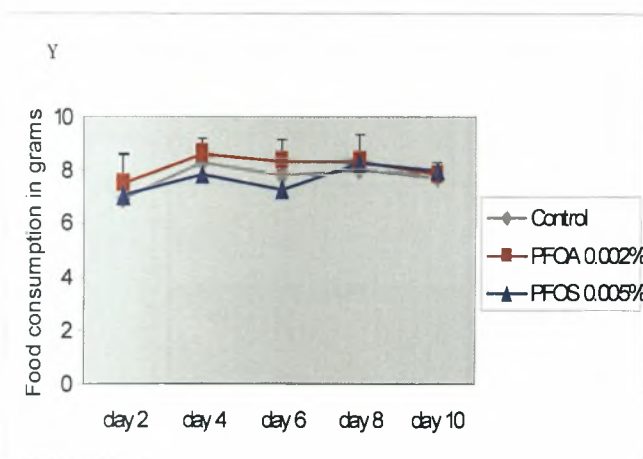
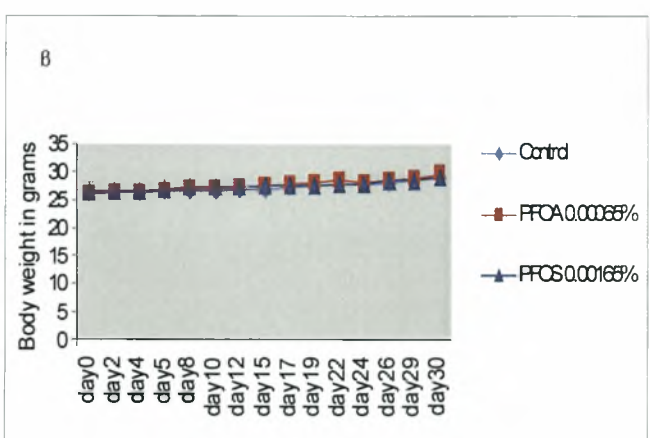
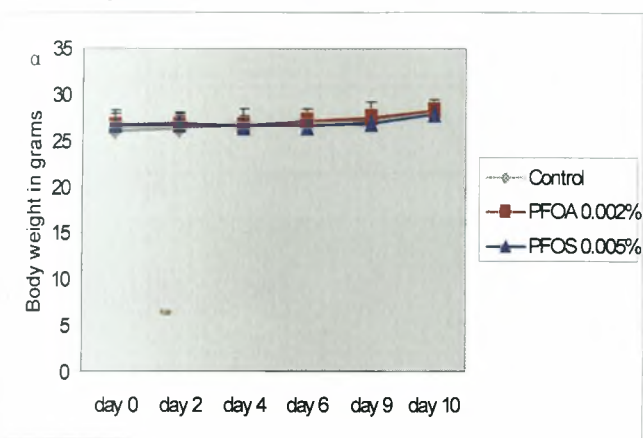
Όλα τα δεδομένα εκφράζονται σαν μέση τιμη±τυπικο σφάλμα έκτος από την περίπτωση του βάρους των ποντικών και της κατανάλωσης τροφής όπου εκφαραζονται ως μεση τιμη± τυπικη αποκλιση. Οι διαφορές ανάμεσα στις τρεις ομάδες ποντικών αναλύθηκαν για στατιστική σημαντικότητα χρησιμοποιώντας είτε με analysis of variance (ANOVA) είτε το Mann-Whitney U test.

2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΟΙ ΧΑΜΗΛΕΣ ΔΟΣΕΙΣ ΡΦΟΑ ΚΑΙ ΡΦΟΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΔΕΝ ΕΙΧΑ ΚΑΜΙΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΒΑΡΟΣ ΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΡΟΦΗΣ

Η γενική τοξικότητα που το ΡΦΟΑ και το ΡΦΟΣ προκαλούν στα πειραματόζωα μπορεί να εκτιμηθεί μέσω του έλεγχου του βάρους τους και

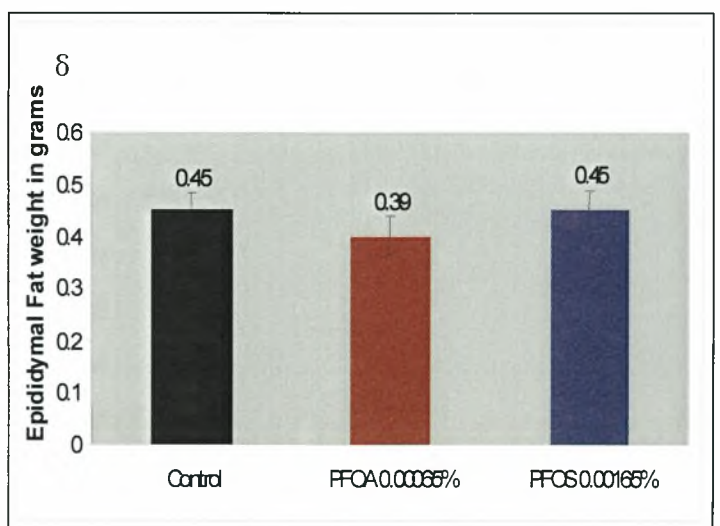
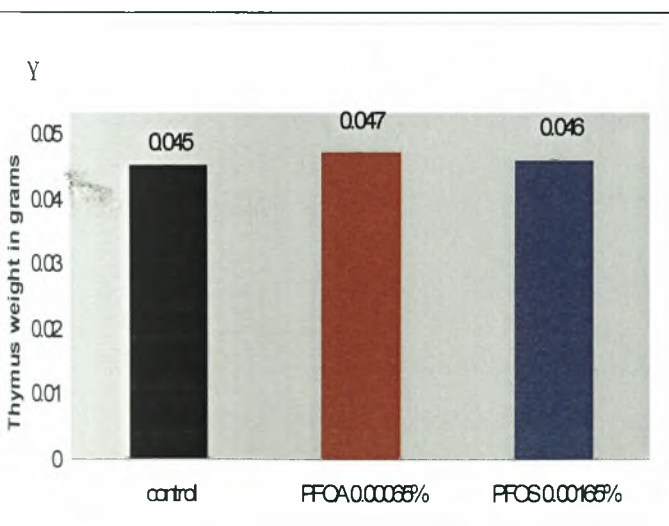
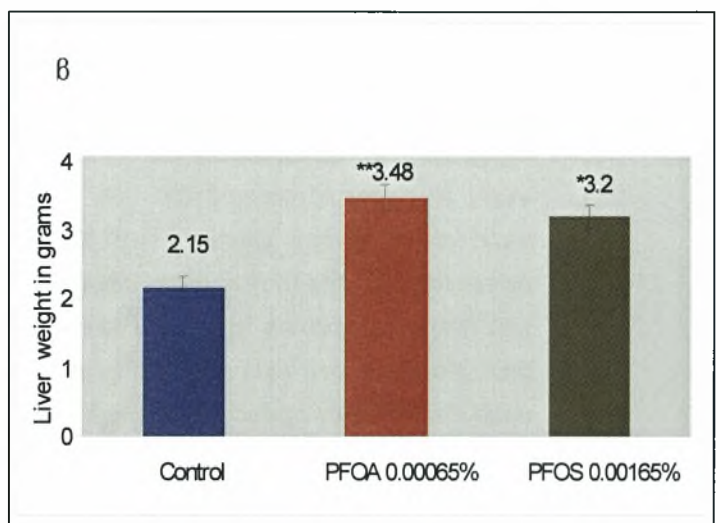
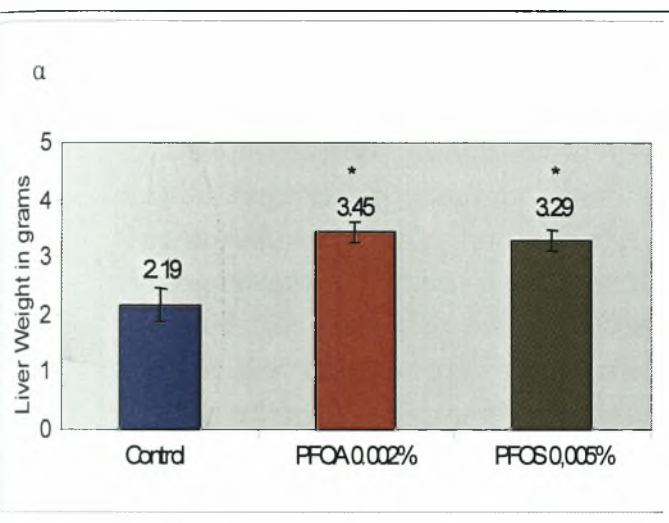
της κατανάλωσης τροφής. Οι δόσεις που χρησιμοποιήσαμε ήταν χαμηλές προκειμένου να είναι παρόμοιες με αυτές στις οποίες εκτίθεται ο άνθρωπος περιβαλλοντικά. Όπως φαίνεται στην εικόνα 8 τα ποντίκια τα οποία έλαβαν 8 mg/kg/ήμερα PFOS ή 3.2 mg/kg/ήμερα PFOA στο πείραμα των 10 ημερών και 2.6 mg/kg/ήμερα PFOS ή 1.04 mg/kg/ήμερα PFOA στο πείραμα των 30 ημερών, δεν παρουσιάζουν καμία διαφορά όσον αναφορά την κατανάλωση τροφής και το βάρος σε σχέση με τα ποντίκια που δεν έλαβαν ξενοβιοτικό.

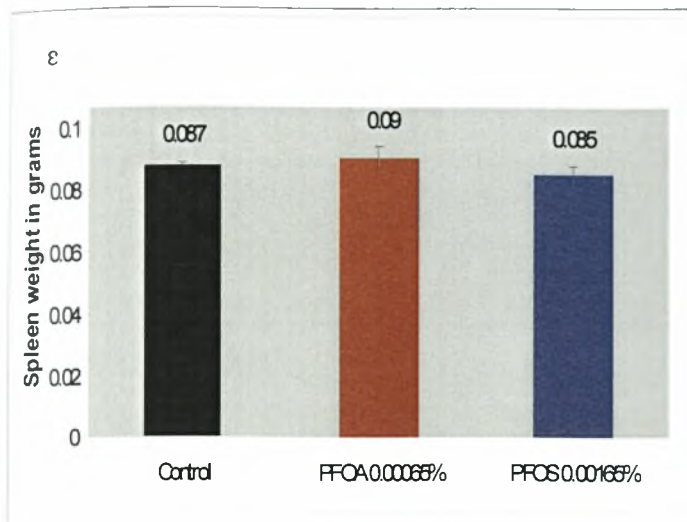


Εικόνα 8: (α, β) Βάρος ποντικών από τα πειράματα 10 και 30 ημερών αντίστοιχα και (γ,δ) κατανάλωση τροφής στα δυο πειράματα αντίστοιχα. Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση για n=4 και n=5 (n είναι ο αριθμός των ποντικών σε κάθε ομάδα).

ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΧΑΜΗΛΩΝ ΔΟΣΕΩΝ ΡΦΟΑ ΚΑΙ ΡΦΟΣ ΣΤΟ ΒΑΡΟΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ, ΤΗΣ ΣΠΛΗΝΑΣ, ΤΟΥ ΘΥΜΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΠΙΔΥΔΙΜΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Η έκθεση σε αυτές τις χαμηλές δόσεις είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ηπατομεγαλίας τόσο στο 10 ημερών πείραμα όσο και στο 30 ημερών πείραμα και κυρίως στην ομάδα ποντικών που εκτέθηκε στο ΡΦΟΑ (εικόνα 9,α και β) αλλά δεν άσκησαν καμία επίδραση στο βάρος του θύμου, της σπλήνας και του επιδυδικού λίπους (γ,δ και ε).

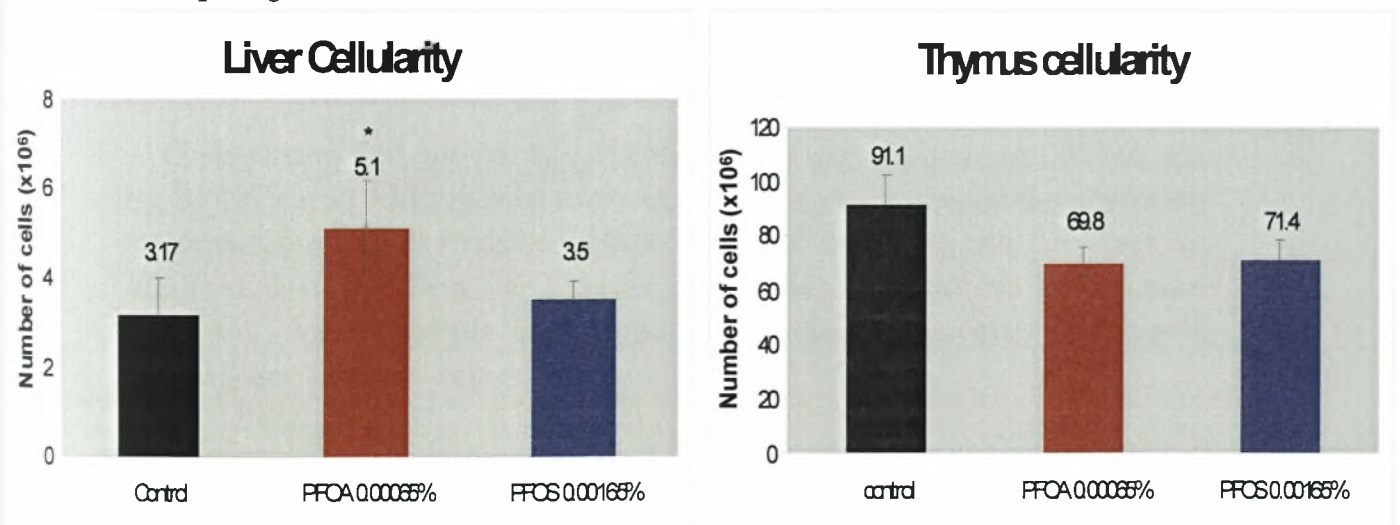




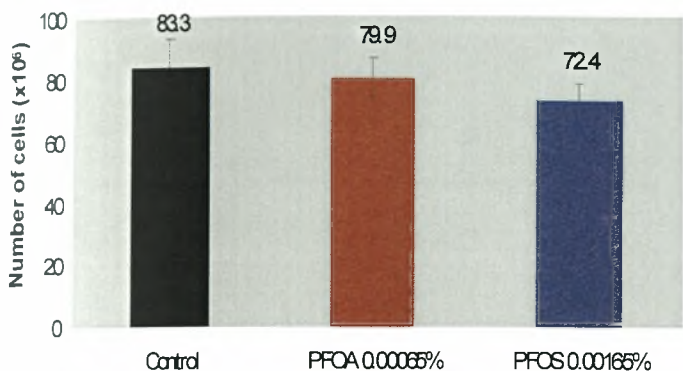
Εικόνα 9: Βάρος ήπατος από τα πειράματα 10 ημερών (α) και 30 ημερών (β). Το βάρος του θύμου(γ), της σπλήνας(ε) και του επιδιδυμικού λίπους(δ) μετά από 30 μέρες έκθεσης στα ξενοβιοτικά. Οι τιμές που φαίνονται εκφράζονται ως μέση τιμή±τυπικό σφάλμα για n=4 ή n=5. Τα δεδομένα αναλύθηκαν για στατιστική σημαντικότητα χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney U test. $P \leq 0.05^*$, $P \leq 0.01^{**}$, $P \leq 0.001^{***}$

ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ PFOA ΚΑΙ ΤΟΥ PFOS ΣΤΟΝ ΑΡΙΘΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ, ΤΟΥ ΘΥΜΟΥ, ΤΗΣ ΣΠΛΗΝΑΣ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΑΡΙΘΜΟ ΤΩΝ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

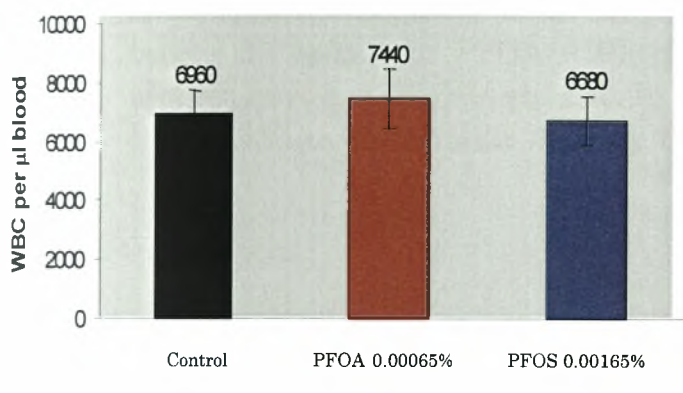
Στις δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτά τα πειράματα, δεν υπήρχε καμία σημαντική διαφορά στον αριθμό των σπληνοκυττάρων ή των θυμοκυττάρων παρόλο που υπήρχε μια τάση για μείωση του αριθμού των θυμοκυττάρων σε σχέση με την ομάδα ποντικών που δεν έλαβε ξενοβιοτικό (Εικόνα 10). Στην ίδια εικόνα επίσης φαίνεται ότι ο η κυτταρική του ήπατος δεν επηρεάστηκε σημαντικά από το PFOS αλλά μια αύξηση της κυτταρικής παρατηρήθηκε μετά από 30 ημέρες έκθεσης στο PFOA. Στο πείραμα των 10 ημερών καμία αλλαγή στην στον αριθμό των κυττάρων αυτών των οργάνων δεν παρατηρήθηκε. Επιπλέον σε αυτές τις δόσεις το PFOS και το PFOA δεν επηρεάζουν τον ολικό αριθμό των λευκοκυττάρων του αίματος.



Spleen Cellularity



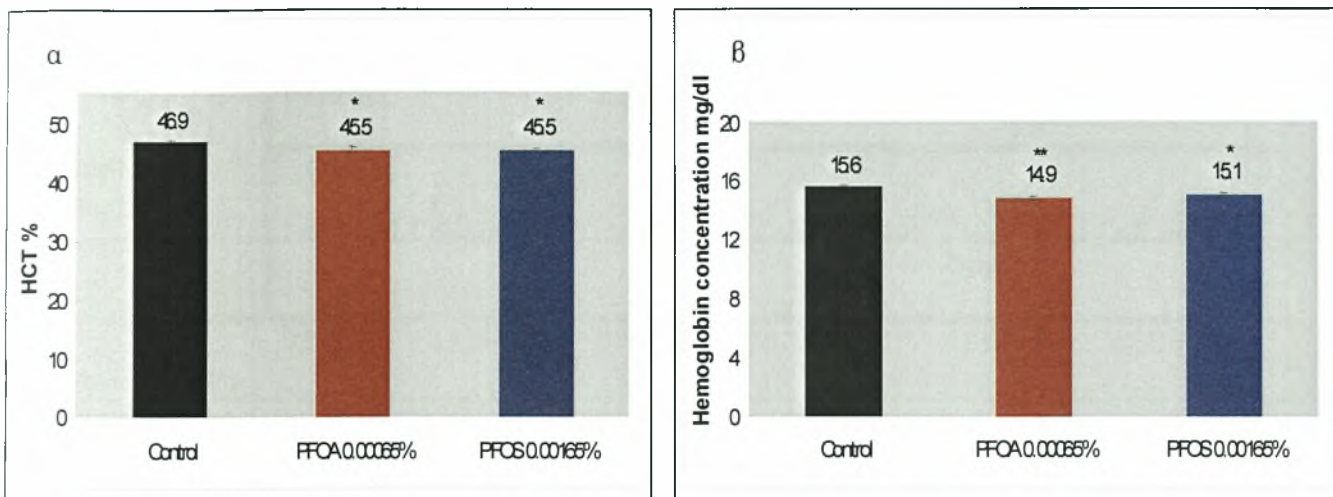
White blood cells



Εικόνα 10: Αριθμός κυττάρων του ήπατος ,του θύμου, της σπλήνας και αριθμός λευκοκυττάρων, από το πείραμα των 30 ημερών .Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι μέση τιμή±τυπικό σφάλμα. Τα δεδομένα αναλύθηκαν για στατιστική σημαντικότητα χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney U test. $P \leq 0.05^*$, $P \leq 0.01^{**}$, $P \leq 0.001^{***}$.

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΑΙΜΑΤΟΚΡΙΤΗ

Ύστερα από βραχυπρόθεσμη έκθεση των πειραματόζων στο PFOA και στο PFOS καμία αλλαγή τόσο στον αιματοκρίτη όσο και στην συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης δεν παρατηρήθηκε όμως τα αποτελέσματα δεν ήταν τα ίδια ύστερα από έκθεση 30 ημερών των πειραματόζων στα ξενοβιοτικά όπου και παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση και στις δυο αυτές παραμέτρους (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Αιματοκρίτης (α) και συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (β) μετά από έκθεση 30 ημερών σε PFOA ή PFOS. Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα για n=5. Τα δεδομένα αναλύθηκαν για στατιστική σημαντικότητα με το Mann-Whitney U test. $P \leq 0.05^*$, $P \leq 0.01^{**}$, $P \leq 0.001^{***}$.

ΟΙ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΗΝ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΗΠΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΥΠΟΠΛΥΘΗΣΜΩΝ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΛΟΓΩ ΤΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΕ PFOA Ή PFOS

Στον πίνακα 1 Α φαίνονται τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής για τους ενδοηπατικούς κυτταρικούς υποπληθυσμούς του ανοσοποιητικού μετά από 10 ημέρες έκθεσης σε PFOA ή PFOS και στον πίνακα 1B μετά από 30 ημέρες έκθεσης. Έτσι, φαίνεται πως ανεξάρτητα από τον χρόνο έκθεσης υπάρχει ένα συγκεκριμένο μοτίβο αλλαγής της σύνθεσης των κυτταρικών υποπληθυσμών. Η έκθεση στο PFOA είτε για 10 είτε για 30 ημέρες οδηγεί σε αύξηση συγκεκριμένων κυτταρικών υποπληθυσμών και πιο συγκεκριμένα του ολικού αριθμού των λευκοκυττάρων, των μακροφάγων, των γδΤ λεμφοκυττάρων, των μυελωδών κατασταλατικών κυττάρων, των Β κυττάρων, των ερυθροειδών προδρόμων, των Τ βοηθητικών και Τ κυτταροτοξικών και των κοκκιοκυττάρων. Έτσι, φαίνεται πως κυρίως το PFOA τροποποιεί τους κυτταρικούς υποπληθυσμούς του ανοσοποιητικού στο ήπαρ.

A

Subpopulations (surface markers)	Control		0.002% PFOA		0.005% PFOS	
	% of total	Cell no x 10 ³	% of total	Cell no x 10 ³	% of total	Cell no x 10 ³
All Leucocytes(CD45 ⁺)	92.3±1.9	4415±432	93.8±1.8	8877±1122**	91.5±3.6	4843±632
B cells (CD19 ⁺)	32.3±2.2	1607±275	29.3±1.8	2728±329*	30.5±1.9	1631±227
γδ T Cells (γδ ⁺)	6.2±0.4	304±42	7.5±0.7	730±139*	7.2±0.8	371±49
Erythroid progenitors (TER119 ⁺)	2.2±0.4	109±25	4.6±0.9*	418±74**	2.7±0.4	141±22
Plasma cells (CD138 ⁺)	0.7±0.1	26±2	0.6±0.1	53±15	0.6±0.1	31±6
Granulocytes (Gr1 ⁺)	7.8±0.4	366±43	6.4±0.2*	601±77*	7.2±0.2	383±55
Macrophages (CD11b ⁺)	9.8±0.5	468±55	11.0±0.5	1017±101**	9.6±0.6	508±74
Myeloid suppressor cells (CD11b ⁺ /Gr1 ⁺)	3.1±0.7	162±49	5.9±1.4*	549±165*	2.6±0.3	145±30
NK cells (NK1.1 ⁺)	14.8±1.2	687±44	13.8±0.9	1266±150**	14.6±0.9	775±120
NKT cells (NK1.1 ⁺ /TCR ⁺)	7.8±1.1	354±40	5.4±0.4	484±43	7.3±1.0	381±65
T helper cells (CD4 ⁺ /NK 1.1 ⁻)	10.8±0.8	511±53	9.6±0.5	909±122*	10.4±0.8	541±84
T cytotoxic cells (CD8 ⁺ /NK 1.1 ⁻)	5.6±0.4	263±21	6.0±0.6	593±115*	6.3±0.4	347±68

B

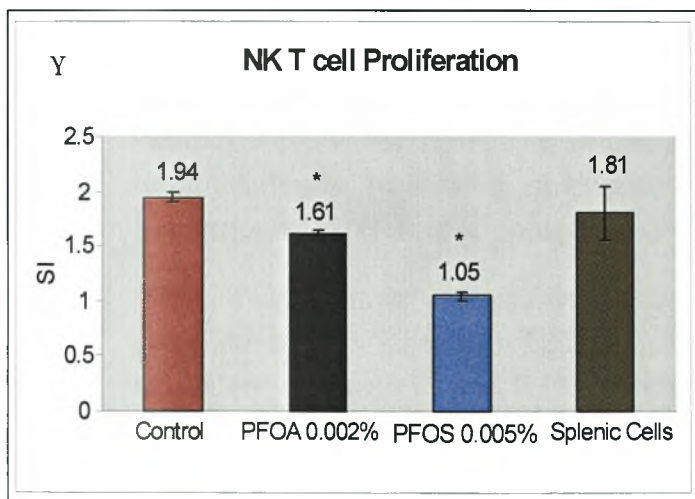
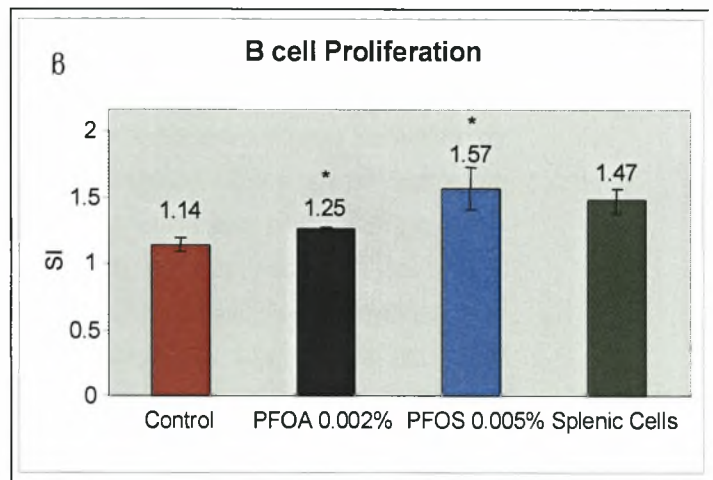
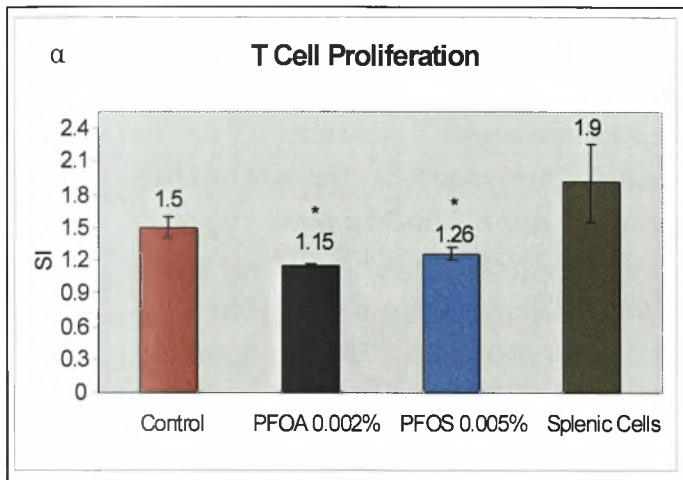
Subpopulations (surface markers)	CONTROL		PFOA 0,00065%		PFOS 0,00165%	
	Total number of cells x10 ⁶	% of total	Total number of cells x10 ⁶	% of total	Total number of cells x10 ⁶	% of total
All	1.53±0.2	80.95±0,45	4.8±1,9**	82.4±4.36E	3.4±0.1**	82.7±2.4
Leucocytes(CD45⁺)						
CD44 ⁺	2.6±0,77	82.2±2.3	4.2±0.8*	84.2±3.07	2.8±0.28	82±2.9
B cells (CD19 ⁺)	0.9±0.19	29.9±2.98	1.44±0.28*	28.7±1	1.03±0.13	29.5±1.19
γδ T Cells (γδ ⁺)	0.25±0.07	8.27±0.6	0.5±0.16*	9.5±1	0.27±0.06	7.5±0.9
Erythrocytes (TER119 ⁺)	0.06±0.01	2.2±0.4	0.16±0.05**	3.17±0.4*	0.097±0.018	2.8±0.2
Plasma cells (CD138 ⁺)	0.01±0.002	0.5±0.08	0.014±0.002	0.35±0.06	0.015±0.02	0.45±0.02
Granulocytes (Gr1 ⁺)	0.147±0.03	5±0.23	0.26±0.08*	5±0.4	0.19±0.03	5.4±0.3
Macrophages (CD11b ⁺)	0.32±0.08	10.6±0.2	0.55±0.1*	11±0.67	0.33±0.02	10±0.6
Myeloid suppressor cells (CD11b ⁺ /Gr1 ⁺)	0.09±0.03	3±0.1	0.18±0.03*	3.6±0.2**	0.1±0.001	2.9±0.2
NK cells (NK1.1 ⁺)	0.46±0.1	14.5±0.4	0.68±0.1	13.4±0.5	0.49±0.04	14.5±0.7
NKT cells (NK1.1 ⁺ /CD4 ⁺)	0.326±0.1	9.6±1.2	0.4±0.07	8.1±0.5	0.32±0.04	9.7±0.4
T helper cells (CD4 ⁺)	0.36±0.12	11.1±0.8	0.54±0.09*	11.1±0.6	0.37±0.03	11±1.1
T cytotoxic cells (CD8 ⁺)	0.167±0.05	5.1±0.3	0.3±0.04*	5.9±0.5	0.2±0.02	5.9±0.3

Πίνακας 1: Φαινοτυπική ανάλυση των ενδοηπατικών κυτταρικών υποπληθυσμών του ανοσοποιητικού μετά από έκθεση 10 ημερών σε PFOA(0.002%) και PFOS (0.005%) (A) και έκθεση 30 ημερών σε 0.00065% PFOA και 0.00165% PFOS(B).Τα

αποτελέσματα αναλύθηκαν με ANOVA για στατιστική σημαντικότητα. $P \leq 0.05^*$, $P \leq 0.01^{**}$.

ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΡFOΑ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡFOS ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ Τ, Β ΚΑΙ ΝΚΤ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Στην εικόνα 12 φαίνεται πως η ικανότητα πολλαπλασιασμού τόσο των διεγερμένων με ConA T λεμφοκυττάρων όσο και των διεγερμένων με αGalCer NKT λεμφοκυττάρων είναι μειωμένη μετά από έκθεση των ποντικών σε PFOS ή PFOA(α,γ). Μάλιστα στην περίπτωση των NKT λεμφοκυττάρων το PFOS ασκεί ακόμα πιο μεγάλη επίδραση. Σε αντίθεση, η ικανότητα πολλαπλασιασμού των διεγερμένων με LPS B λεμφοκυττάρων επάγεται μετά από έκθεση των ποντικών σε PFOS ή PFOA(β)



Εικόνα 12: Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων (α), των B λεμφοκυττάρων (β) και των NKT (γ) σε απάντηση της διέγερσης τους με ConA, LPS και αGalCer αντίστοιχα μετά από 10 ημέρες έκθεσης σε PFOA ή PFOS. Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα για n=3. Τα δεδομένα αναλύθηκαν για στατιστική σημαντικότητα χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney U test. $P \leq 0.05^*$, $P \leq 0.01^{**}$, $P \leq 0.001^{***}$

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΗΠΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ

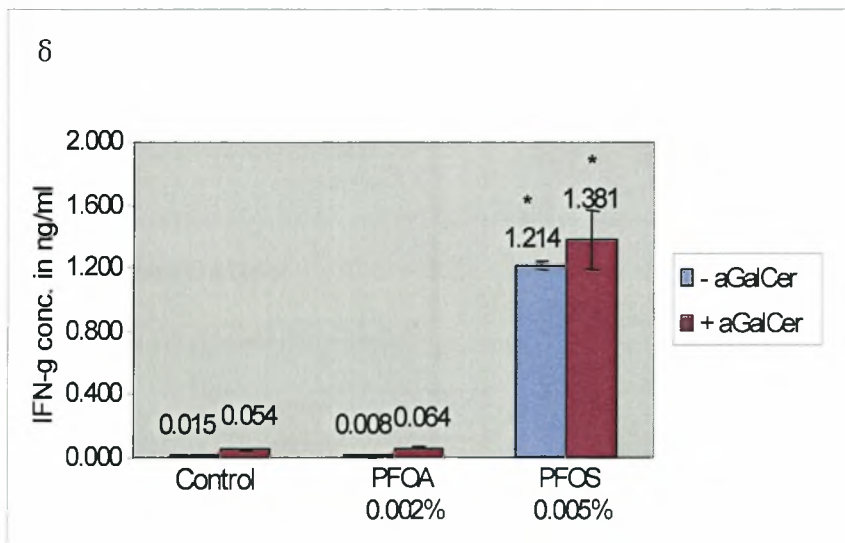
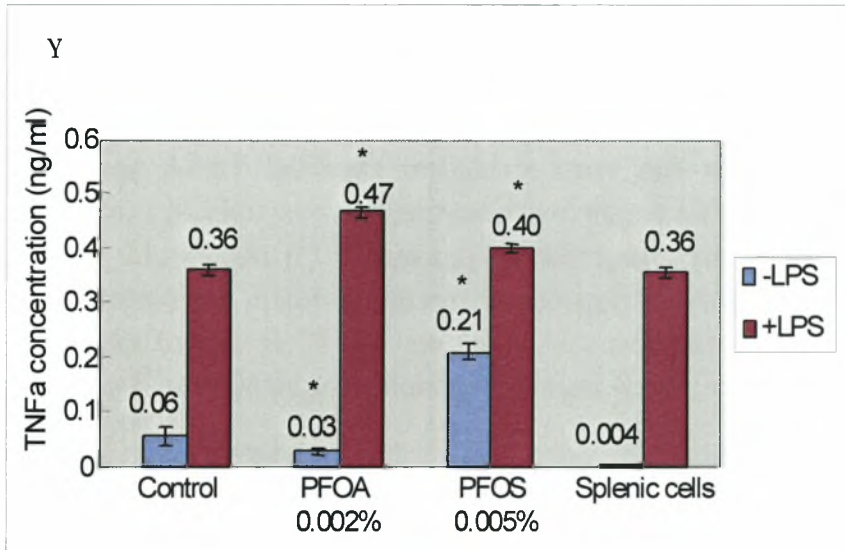
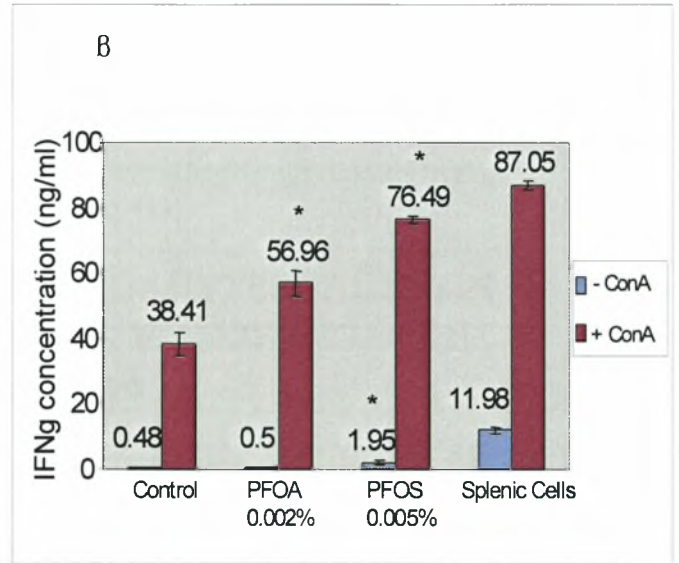
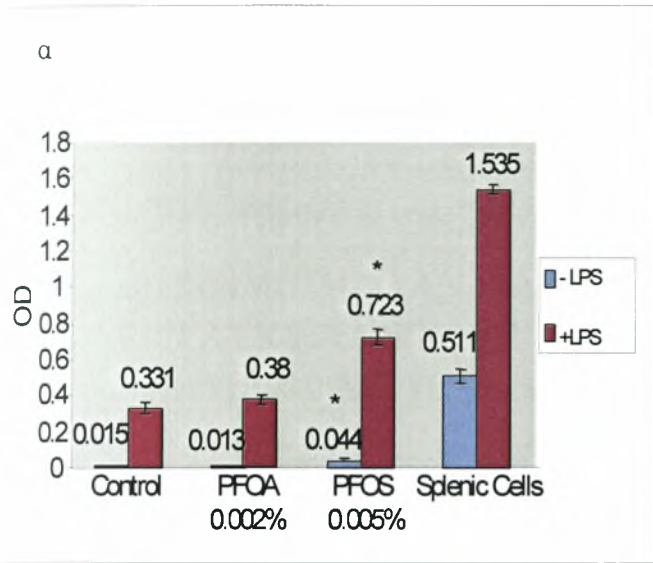
Η λειτουργικότητα των ενδοηπατικών κυττάρων του ανοσοποιητικού αναλύθηκε μέσω προσδιορισμού των παραγόμενων κυτοκινών και αντισωμάτων IgM *in vitro*, ύστερα από αλλά και χωρίς διέγερση με LPS ή ConA ή aGalCer και στις τρεις ομάδες των πειραματόζωων. Τα σπληνοκύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό control.

Η παραγωγή του TNFα (εικόνα 13γ) από τα διεγερμένα με LPS μακροφάγα που απομονώθηκαν από τα πειραματόζωα που εκτέθηκαν σε PFOA ή PFOA είναι σημαντικά αυξημένη με μια κάπως μεγαλύτερη αύξηση στην περίπτωση του PFOA. Επιπλέον, ακόμα και χωρίς διέγερση με LPS, η παραγωγή του TNFα παραμένει σε υψηλά επίπεδα στην ομάδα που εκτέθηκε στο PFOS σε σχέση με την ομάδα που δεν έλαβε ξενοβιοτικό. Σε αντίθεση χωρίς διέγερση με LPS το PFOA φαίνεται να καταστέλλει την παραγωγή του TNFα από τα μακροφάγα.

Τα ηπατικά T λεμφοκύτταρα από τα ποντίκια που είχαν εκτεθεί σε PFOA και PFOS, παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα IFNγ μετά από τη διέγερση τους με ConA και η παραγωγή αυτή είναι ακόμα μεγαλύτερη στην περίπτωση του PFOS. Επιπλέον ακόμα και χωρίς τη διέγερση με ConA τα T λεμφοκύτταρα από την ομάδα που εκτέθηκε στο PFOS διατηρούν την ικανότητα υψηλότερης παραγωγής IFNγ σε σχέση με την ομάδα που δεν εκτέθηκε σε ξενοβιοτικό(13β).

Όπως και στην περίπτωση των T λεμφοκυττάρων η παραγωγή των IgM αντισωμάτων από διεγερμένα με LPS B λεμφοκύτταρα, από τις ομάδες που είχαν εκτεθεί σε PFOA ή PFOS είναι αυξημένη σε σύγκριση με την control ομάδα. Η παραγωγή αυτή είναι ακόμα υψηλότερη ύστερα από έκθεση στο PFOS. Η υψηλή παραγωγή IgM από τα B λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από τους ποντικούς που εκτέθηκαν σε PFOA ή PFOA παρατηρείται ακόμα και χωρίς διέγερση τους με LPS(Εικόνα 13α).

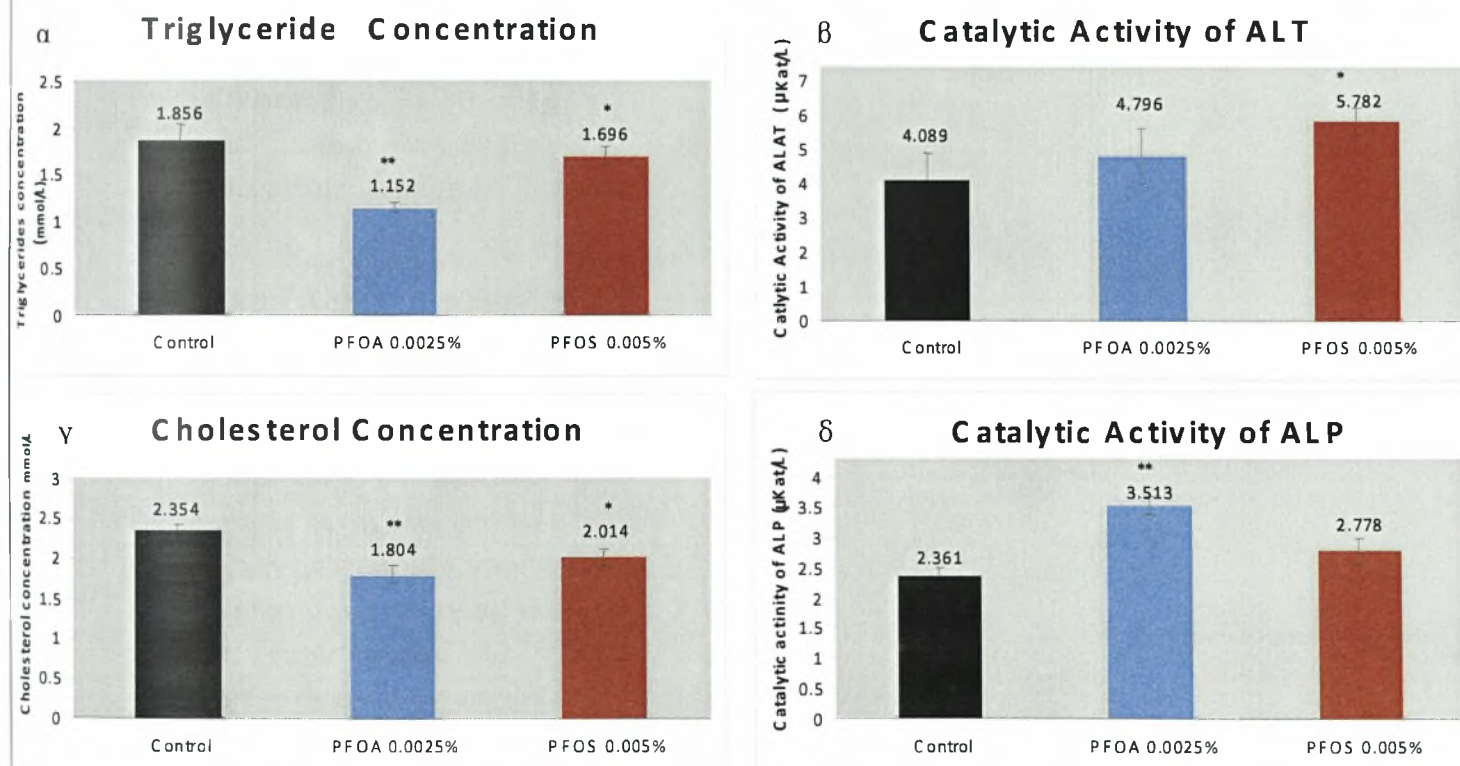
Τελικά, η έκθεση των ποντικών στο PFOS ασκεί σημαντική επίδραση στην λειτουργικότητα των NKT λεμφοκυττάρων. Τα διεγερμένα *in vitro* με aGalCer ηπατικά NKT λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από τα πειραματόζωα που είχαν εκτεθεί σε PFOS παράγουν υψηλότερες ποσότητες IFNγ σε σχέση με την control ομάδα και με την ομάδα που εκτέθηκε σε PFOA. Επίσης ακόμα και χωρίς διέγερση τα NKT λεμφοκύτταρα από την PFOS ομάδα παράγουν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις IFNγ(Εικόνα 13δ).

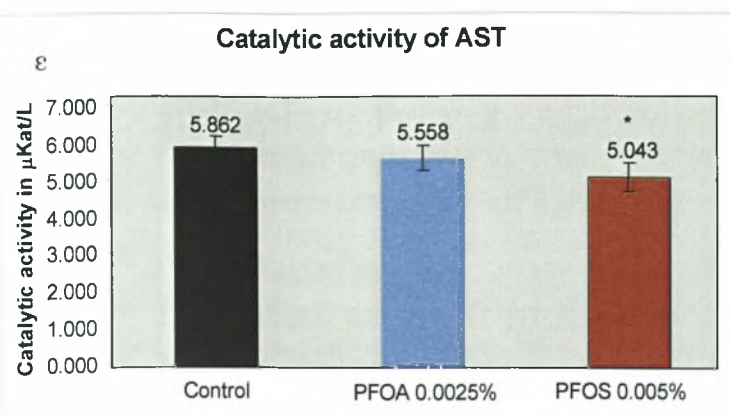


Εικόνα 13:Λειτουργική ανάλυση των ενδοηπατικών μακροφάγων, Τ λεμφοκυττάρων, Β λεμφοκυττάρων και ΝΚΤ κυττάρων, μετά από έκθεση 10 ημερών σε PFOA ή PFOS. α) Παραγωγή IgM από τα Β λεμφοκύτταρα β)IFN γ από τα Τ λεμφοκύτταρα γ) TNF από τα μακροφαγα δ)IFN γ από τα ΝΚΤ κυτταρα. Οι τιμές που φαίνονται είναι μέση τιμη \pm τυπικο σφάλμα (n=3). Τα δεδομένα αναλύθηκαν για στατιστική σημαντικότητα χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney U test. P \leq 0.05* ,P \leq 0.01** ,P \leq 0.001 ***.

ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ,ΤΩΝ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ

Τα δείγματα ορού από τα ποντίκια που εκτέθηκαν σε PFOA και PFOS,καθώς και ο ορός από τα πειραματόζωα που δεν εκτέθηκαν σε ξενοβιοτικό αναλύθηκε για την δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης, της ασπαραγινικής αμινοτρανσφεράσης, της αλανινοαμινοτρανσφεράσης καθώς και για την συγκέντρωση της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 14, η καταλυτική δραστικότητα της ALP είναι αυξημένη μόνο στον ορό των πειραματόζωων που εκτέθηκαν στο PFOA(δ). Η δραστικότητα της ALAT βρέθηκε αυξημένη στον ορό των ποντικών που είχαν εκτεθεί σε PFOS(β) ενώ η δραστικότητα της ASAT ήταν σημαντικά μειωμένη στην ίδια ομάδα (ε). Τελικά η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης ήταν σημαντικά μειωμένη στον ορό τόσο των ποντικών που εκτέθηκαν σε PFOA όσο και αυτών που εκτέθηκαν στο PFOS κάτι που συμφωνεί με την γνωστή υπολιπιδαιμική δράση τους (α,β).





Εικόνα 14:Καταλυτική δραστηκότητα των ALT (β),ALP(δ),AST(ε) και συγκεντρώσεις τριγλυκεριδίων (α) και χοληστερόλης(γ) στον ορο των ποντικών που εκτεθηκαν για 10 ημέρες σε PFOA ή PFOS. Οι τιμές που φαίνονται είναι μέση τιμη±τυπικο σφάλμα (n=3). Τα δεδομένα αναλύθηκαν για στατιστική σημαντικότητα χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney U test. $P \leq 0.05^*$, $P \leq 0.01^{**}$, $P \leq 0.001^{***}$.

2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

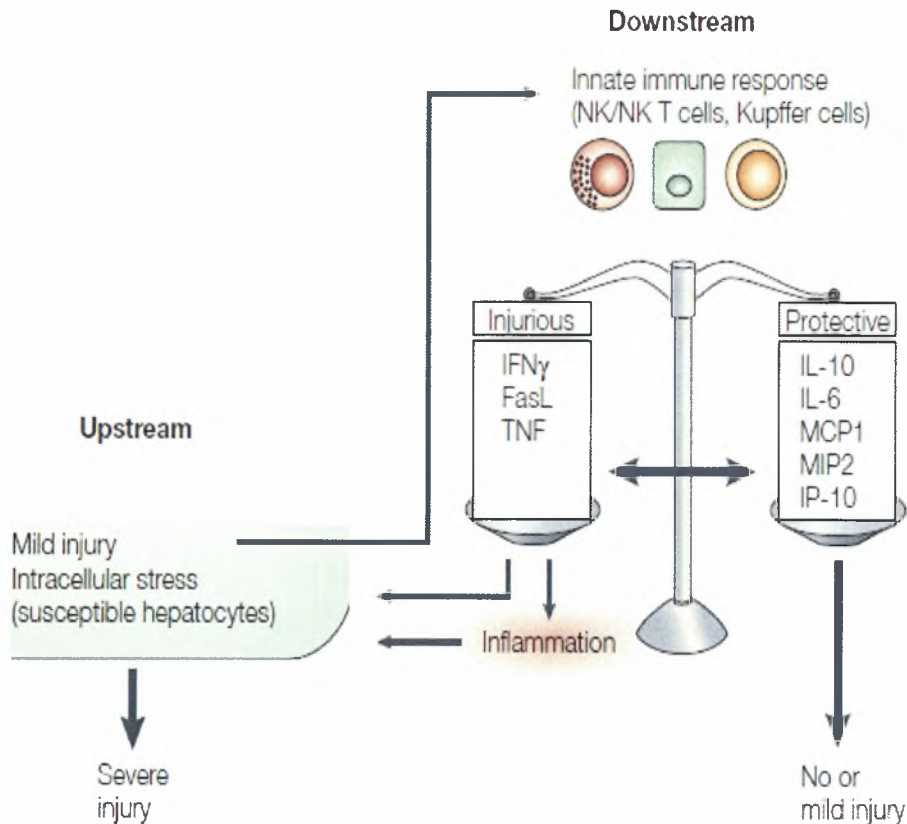
Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι σε αυτές τις χαμηλές συγκεντρώσεις το PFOA και το PFOS δεν επηρεάζουν ούτε τον αριθμό θυμοκυττάρων ούτε των σπληνοκυττάρων, ούτε το βάρος και την κατανάλωση τροφής των ποντικών.

Αν και υπάρχουν κάποιες μελέτες που έχουν περιγράψει τις τροποποιήσεις που ασκούν το PFOA και το PFOS στο ανοσοποιητικό σύστημα(60), οι επιδράσεις που αυτές οι χημικές ουσίες έχουν στο ενδοηπατικά κύτταρα του ανοσοποιητικού δεν είχαν περιγραφεί έως τώρα. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι οι επιδράσεις που το PFOA και το PFOS ασκούν στο ανοσοποιητικό σύστημα του ήπατος είναι πολύ διαφορετικές σε σχέση με αυτές που ασκούν στα υπόλοιπα όργανα του ανοσοποιητικού όπως ο θυμός και η σπλήνα.

Θεωρείται ότι το PFOA και το PFOS δρουν μέσω της ενεργοποίησης των PPARs στο ήπαρ κάτι που οδηγεί σε παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου οι οποίες μπορούν να τροποποιήσουν την δομή των μακρομορίων και ίσως οδηγούν τελικά σε βλάβη του ήπατος. Όπως φαίνεται από την βιοχημική ανάλυση παραπάνω το PFOS προκαλεί μεγαλύτερη βλάβη και τραυματισμό στο ήπαρ σε σχέση με το PFOA αφού η δραστηκότητα της ALT η οποία είναι ένα ενδοκυτταρικό ενζυμο το οποίο βρίσκεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα ηπατοκύτταρα, είναι ένα ειδικό ενζυμο εκτίμησης της ηπατικής λειτουργίας και αυξάνεται περισσότερο στον ορό των ποντικών που έχουν εκτεθεί στο PFOS κάτι που υποδεικνύει μεγαλύτερη βλάβη του ήπατος σε αυτή τη περίπτωση. Σε αντίθεση, η AST είναι ένα λιγότερο ειδικό

ένζυμο εκτίμησης της ηπατικής λειτουργίας αφού είναι παρούσα και σε άλλους ιστούς εκτός από το ήπαρ όπως στον εγκέφαλο, στους πνεύμονες και στους νεφρούς. Η ALP είναι επίσης ένα ένζυμο παρών στο ήπαρ το οποίο βρίσκεται κυρίως στο επιθήλιο των χολικών αγωγών και η δραστηριότητα της είναι αυξημένη στον ορό από ποντικούς που έχουν εκτεθεί σε PFOA και PFOS αλλά περισσότερο στην περίπτωση του PFOA κάτι που υποδεικνύει ένα χολοστατικό μοτίβο βλάβης του ήπατος(61,62).

Είναι επίσης πιθανό η μεγαλύτερη βλάβη του ήπατος η οποία προκαλείται από το PFOS να οφείλεται στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων υποπληθυσμών κυττάρων του ανοσοποιητικού, δευτερογενώς του οξειδωτικού stress που προκαλεί. Από την παρούσα μελέτη φαίνεται πως κυρίως το PFOS και σε μικρότερο βαθμό το PFOA έχουν την ικανότητα να επάγουν τη παραγωγή IFN γ και IgM *in vitro* μετά από διέγερση με LPS και ConA των B και T λεμφοκυττάρων αντίστοιχα αλλά μόνο το PFOS είναι ένας ισχυρός διεγέρτης της παραγωγής IFN γ από τα διεγερμένα με LPS NKT λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, ακόμα και σε απουσία οποιουδήποτε αντιγονικού διεγέρτη των T,B και NKT λεμφοκυττάρων, τα ενδοηπατικά κύτταρα του ανοσοποιητικού από τα ποντίκια που είχαν εκτεθεί στο PFOS παράγουν υψηλότερες συγκεντρώσεις φλεγμονωδών κυτοκινών και IgM προτείνοντας ότι όπως και σε περιπτώσεις άλλων ξενοβιοτικών που προκαλούν τοξικότητα στο ήπαρ(6,35,48,63,64),το PFOS διαταράσσει την ισορροπία ανάμεσα στους προστατευτικούς και βλαπτικούς παράγοντες της φυσικής ανοσίας στο ήπαρ. Έτσι αφού οι παράγοντες TNF α και IFN γ ανήκουν στους παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν τραυματισμό του ήπατος και οι παράγοντες IL-6 και IL-10 ανήκουν στους προστατευτικούς παράγοντες φαίνεται πως η "ζυγαριά" γέρνει προς την πλευρά του τραυματισμού(Εικόνα15). Όμως σε αυτήν τη μελέτη τα επίπεδα των IL-6 και IL-10 δεν προσδιορίστηκαν. Επίσης είναι πιθανό, η ενεργοποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού να είναι αποτέλεσμα του οξειδωτικού stress και της βλάβης που αυτό προκαλεί αφού το οξειδωτικό stress καθιστά τα κύτταρα περισσότερο επιδεικτικά στον τραυματισμό από τη δράση των κυττάρων του ανοσοποιητικού. Επιπλέον, περεταίρω μελέτες είναι αναγκαίες προκειμένου να διαφωτιστεί ο μηχανισμός ο οποίος ρυθμίζει τις απαντήσεις των κυττάρων του ανοσοποιητικού αφού τα αποτελέσματα μπορεί να είναι διαφορετικά στην περίπτωση ενός *in vivo* συστήματος μελέτης, αφού το σύστημα μελέτης που χρησιμοποιήθηκε εδώ ήταν *ex vivo*.



Εικόνα 15: Μηχανισμός πρόκλησης βλάβης στο ήπαρ από τη δράση ξενοβιοτικών και διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προστατευτικών και βλαπτικών παραγόντων του ανοσοποιητικού μέσω των NKT και Kupffer κυττάρων. Πιθανώς ο μηχανισμός να είναι παρόμοιος και στην περίπτωση του PFOS (τροποποιημένη εικόνα από 63).

Λαμβάνοντας υπόψη, την τροποποίηση των αναλογιών των διαφόρων ανοσοποιητικών κυτταρικών υποπληθυσμών *in vivo* ως αποτέλεσμα της έκθεσης στο PFOA και στο PFOS, φαίνεται ότι στα ποντίκια που εκτέθηκαν στο PFOS υπάρχει μια μη στατιστικά σημαντική αύξηση σε όλους τους υποπληθυσμούς των κυττάρων εκτός από την περίπτωση των μυελωδών κατασταλτικών κυττάρων που ο αριθμός τους φαίνεται να μειώνεται. Σε αντίθεση στην περίπτωση των ποντικών που εκτέθηκαν στο PFOA όλοι οι ενδοηπατικοί κυτταρικοί υπερπληθυσμοί -εκτός των NKT λεμφοκυττάρων- του ανοσοποιητικού αυξάνονται σημαντικά σαν ολικοί αριθμοί και στην περίπτωση των υποπληθυσμών των ερυθροειδών προδρόμων και των μυελωδών κατασταλτικών αυξάνονται και σαν επί τοις εκατό ποσοστό του συνόλου των κυττάρων και αυτό και στα δυο πειράματα των 10 και 30 ημερών. Τα μυελώδη κατασταλτικά κυτταρα είναι γνωστό ότι καταστέλλουν την λειτουργία των T λεμφοκυττάρων (64) και για αυτό το λόγο μπορεί να παίζουν έναν έμμεσο ρόλο στην ρύθμιση των T λεμφοκυττάρων μέσω του PFOA. Ο αυξημένος αριθμός των πρόδρομων ερυθροειδών προδρόμων στο

ήπαρ μετά από έκθεση στο PFOA υποδεικνύει αυξημένη ερυθροποίηση στο ήπαρ η οποία πιθανώς είναι αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες και της βλάβης και που πιθανώς συνεισφέρει στην αναγέννηση του ήπατος.

Η μείωση του αιματοκρίτη και της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης η οποία παρατηρήθηκε στους ποντικούς οι οποίοι είχαν εκτεθεί μακροπρόθεσμα (30 ημέρες) στο PFOA και το PFOS μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένη απόπτωση των ερυθροκυττάρων είτε σε αλλαγή της έκκρισης της ερυθροποιητίνης σε αυτά τα πειραματοζώα. Έτσι περαιτέρω μελέτες που αφορούν την παραγωγή της ερυθροποιητίνης και τη μελέτη του χρόνου ημιζωής των ερυθροκυττάρων χρειάζονται προκειμένου να καθοριστεί ποιος είναι ο μηχανισμός υπεύθυνος για την εκδήλωση αυτής της ελαφρής μορφής αναιμίας.

Συμπερασματικά, το PFOA και το PFOS αν και έχουν μια χημικά παρόμοια δομή ασκούν πολύ διαφορετικές επιδράσεις στα ενδοηπατικά κυτταρα του ανοσοποιητικού τόσο στην λειτουργικότητα όσο και στις αναλογίες των διαφορετικών υποπληθυσμών και επιπλέον έρευνα απαιτείται προκειμένου να ξεκαθαριστεί πλήρως ο μηχανισμός με τον οποίο προκαλούν τραυματισμό του ήπατος.

3.ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ.Δημήτριο Κουρέτα για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία στο Πανεπιστήμιο της Στοκχόλμης και για τη βοήθεια και το ενδιαφέρον του σε όλη τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Joseph W. Depierre που με δέχτηκε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου στο εργαστήριο του και για την φιλικότητα και τη βοήθεια του και τον Dr. Manuchehr Abedi-Valugardi για όλη την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αλλά και για τις πολύτιμες θεωρητικές συμβουλές του. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους δουλέψαμε μαζί στο εργαστήριο την υποψήφια διδάκτορα Mousumi Rahman Qazi ,τον καθηγητή Buck Nelson,τον Dr. Stefan Nobel, την Dr. Jasna Bogdanska, τον Hung van Pham και επίσης τον συμφοιτητή μου Θάνο Βλασταρά.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Youssef J. and Mostafa B. Biology of Senescent Liver Peroxisomes: Role in Hepatocellular aging and disease. *Environmental Health Perspectives*, **107**,791-797, (1990)
2. Von den Bosch, Schutgens RB, Wanders RJ, Tager JM. Biochemistry of Peroxisomes. *Annu. Review Biochem.*, **61**,157-197, (1992)
3. Tolbert N.E. Metabolic Pathways in Peroxisomes and glyoxysomes. *Annu. Review Biochem.*, **50**,133-157,(1981)
4. Janarda K. Reddy. Peroxisome Proliferators and PPAR α , Biotic and xenobiotic sensing. *American journal of Pathology*, Vol 164, No 6,(2004)
5. Reddy J.K, Azarnoff D.L. Hypolipidemic hepatic Peroxisome Proliferators form a novel class of carcinogens. *Nature*, **283**,397-398,(1980)
6. Sieto Bosgra, Win Mennes, Willen Seinen. Proceedings in uncovering the mechanism behind peroxisome proliferator induced Hepatocarcinogenesis. *Toxicology*, **206**,309-323, (2005)
7. Renner R.C Growing. Concern over perfluorinated chemicals. *Envir. Scien. Technol.*, **35**,154-A-160A,(2001)
8. Olsen G.W., Huang H.Y., Helzlsover K.J., Hansen K.J., Butenhoff J.L. And Mandel J.H. Historical comparison of perfluorooctanesulfonate, perfluorooctanoate and other fluorochemicals in human blood. *Envir. Health Perspective*, **113**,539-545, (2005)
9. Simsik M.F and Dorweiler K.J. Ratio of perfluorochemical concentrations as a tracer of atmospheric deposition to surface waters. *Envir. Scien. Technol.*, **39**,8678-83, (2005)
10. Giesy J. and Kaman K. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Envri. Scien. Technol.*, **35**,1339-1342, (2001)
11. Hansen K., Clemen L., Ellefson M. and Johnson H. Compound specific quantitate characterization of organic fluorochemicals in biological matrices. *Envir. Scien. Technol.*, **35**, 766-770, (2001)
12. Burris J.M., Lundberg G.W., Simpson C. and Mandel J.H Interm Report #2 .Determination of serum half lives of several fluorochemicals. St.Paul MN:3M Medical Department, (2002)
13. Guang-Hui Dong, Ying-Hva Zhang, Li Zheng, Wei Liu, Yi-He Jin, Qin-Cheng He. Chronic effects of perfluorooctanesulfonate exposure on immunotoxicity in adult C57BL6 mice. *Arch. Toxicol.*, (2009)
14. Chang S.C, Thibodeaux J.R, Eastvold M.L, Ehresman D.J, Bjork Ja., Froehlich J.W, Lau C., Singh R.J, Wallace K.B., Butenhoff J.L. Thyroid hormone status and pituitary function in adult rats given oral doses of PFOS. *Toxicology*, **243**,330-339, (2008)
15. Lau C., Thibodeaux J.R ,Hanson R.G., Narotsky M.G., Roges J.M., Lindstrom A.B. and Strynar M.J. Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse. *Toxicol Scien*, **90**,510-8, (2006)
16. Qian Yang, Manucher Abedi-Valugerdi, Yi Xie, Xiao-Yan Zhao, Goran Moller, B. Dean Nelson and Joseph W. DePierre . Potent suppression of the adaptive immune response in mice upon dietary exposure to the potent peroxisome proliferator, perfluorooctanoic acid. *International Immunopharmacology*, **2**,389-397, (2002b)
17. Biegel S.P., Hurtt M.E., Frane S.R, O'Connor J.C. And Cook J.C. Mechanisms of extrahepatic tumor induction by Peroxisome Proliferators in male CD rats. *Toxic. Scien.*, **60**,44-55, (2001).

18. Escher P and Wahli W. Peroxisome proliferator activated receptors. Insight into multiple cellular functions. *Mutat. Res.*, **448**, 121-138, (2000)
19. Hihi A.K, Michalik L., and Wahli W. PPARs: Transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol. Life Sci.*, **59**, 790-798, (2002)
20. Shipley J.M., Hurst C.H., Tanaka S.S, Deroos F.L., Butenhoff J. Seacat A.M. And Waxman D.J. Trans-activation of PPAR target and induction of PPAR target genes by perfluorooctane-based chemicals. *Toxicol. Sci.*, **80**, 151-160, (2004)
21. Mitchell B. Rosen Barbara D. Abbott, Douglas C. Wolf, J. Christopher Corton, Carmen R. Wood, Judith E. Scith. Gene Profiling in the livers of Wild-type and PPAR α -Null mice exposed to perfluorooctanoic acid. *Toxicologic Pathology*, **36**, 592-607, (2008)
22. Mukherjee R., Jow L., Croston E.E and Paterniti J.R. Identification, characterization, and tissue distribution of human PPAR isoforms PPAR gamma 2 versus PPAR gamma 1 and activation with RXL agonists and antagonists. *J. Biolchem.*, **272**, 8071-8076, (1997)
23. Shearer B.G. And Hoekstra W.J. Recent advantages in peroxisome proliferator activated receptor science. *Curr. Med. Chem.*, **10**, 267-280, (2003)
24. Reddy JK, Hasmhimoto T. Peroxisome proliferator activated receptor an adaptive metabolic system. *Ann. Rev. Nutr.*, **21**, 193-230, (2001)
25. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb. JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV. Ligand Binding and co activator assembly of PPAR γ . *Nature*, **377**, 397-404, (1995)
26. Desvergne B, Wahli W. PPARs: nuclear control of Metabolism. *Endocr. Rev.*, **20**, 649-688, (1999)
27. Auboeuf D., Rieusset J., Fajas L., Vallier P., Frering V., Riou J.P, Stavelis B., Auwerx J., Lavvile M and V. Dal H. Tissue distribution and quantification of mRNAs of PPARs and Liver X receptor- α in humans. No alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes*, **46**, 1319-1327, (1997)
28. Ziouzenkova O, Perrey S, Asatryan L, Havana J, Macnaval KL, Moller De, Rader O.J, Sevanian A, Zecuner R, Hoefler G, Plutzky J. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins generates PPAR ligands: evidence for an antinflamantory role for lipoprotein lipase. *PNAS*, Vol 100, no 5, (2003)
29. Lee SS, Pineav T, Drago J, Lee E.J, Owen JW, Kroetz D.L, Fernandez-Salg Vero PM, Westphal H, Gonzales F.J. Targeted disruption of the α isoform of the PPAR gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of PPs. *Mol. Cell Bio.l*, **15**, 3012-3022, (1995)
30. Braissant O. and Wahli W. Differential expression of PPAR alpha, beta and gamma during rat embryonic development. *Endocrinology*, **139**, 2748-2754, (1998)
31. Margy L. Takacs and Barbara D. Abbott. Activation of mouse and human Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (α , β/δ , γ) by Perfluorooctanoic Acid and Perfluorooctane Sulfonate. *Toxic. Scien.*, **95**(1), 108-117, (2006)
32. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AL, Spiegelmal BM. mPPAR γ 2 tissue specific regulator on an adipocyte enhancer. *Genes Dev.*, **8**, 1224-1234, (1994)
33. Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, Cow WQ, Yeldandi V, Yeldandi AV, Rao MS, Gonzalez FJ, Reddy JK. Adipocyte specific gene expression and abipogenic steatosis in the mouse liver due to PPAR γ overexpression. *J. Biol. Chem.* **278**, 498-505, 2003
34. Jessica Berthiavine, Kendall B. Wallace. PFOA, PFOS and N-ethyl Perfluorooctanesulfonamido ethanol peroxisome proliferation and mitochondrial biogenesis. *Toxicologic. Letters*, **129**, 23-32, (2002)

35. Conway J.G, Tomaszewski K.E, Olson MJ, Catley RC, Marsman PS, Popp JA. Relationship of oxidative damage to the hepatocarcinogenicity of the PPs di(2-ethylhexyl)phthalate and Wy- 14.643 . *Carcinogenesis* **10(3)**,513-519, (1989)
36. Kasper Hoebe, Edithy Janssen and Bruce Beutler. The interface between innate and adaptive immunity. *Nature immunology*, Vol **5**, No 10, (2004)
37. Charles Janeway Jr. How the immune system works to protect the Host from infection. A personal view. *PNAS*, Vol **98**, no 13, 7461-7468, (2001)
38. Russian Medzhitov and Charles Janeway, Innate Immunity. The new England journal of medicine, (2000)
39. Medzhitov and Janeway A Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, **91**,295-298
40. Russian Medzhitov and Charles A. Janeway Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in Immunology*, **9**,4-9, (1997)
41. Russian Medzhitov and Charles A. Janeway Jr. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Seminars in Immunology*, vol **10**,351-353, (1998)
42. Ian R. Mackay. Hepatoimmunology: A perspective. *Immunology and cell Biology*, **80**, 36-44, (2002)
43. Sheth K, Bankey P. The liver as an immune organ. *Curr. Op. Crit. Care* , **7**,99-104, (2007)
44. Vito Racahelli and Barbara Rehermain. The liver as an immunological organ. *Hepatology*, vol **43**, No 2 , (2006)
45. Kuolle PA, Uhrig A, Hegenbarths *et al.* IL-10 down-regulates T-cell activation by antigen presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clin. Exp. Immunol.*, **114**,427-33, (1998)
46. Mehal WZ, Azzaroli F. Immunology of the healthy liver: old question and new insights. *Gastroenterology*, **120**,250-260, (2001)
47. Kita hl, Mackay IR, Van de Water J, Gershwin ME. The lymphoid liver, considerations on pathways to autoimmune injury. *Gastroenterology*, **120**, 1485-1501, (2001)
48. Frank Tacke , Tom Luedde , Christian Trautwein. Inflammatory Pathway in liver Homeostasis and liver injury. *Crit. Rev. Allerg. Immunol.*, **36**,4-12, (2009)
49. Luedde T, Liedtke C., Mains MP., Travtwain C. Loosing Balance cytokine signaling and cell death in the context of hepatocyte injury and hepatic failure .*Eur. Cytokine Netw.*, **13**,377-383, (2002)
50. Bilzer M, Rogger F, Gerbes. A Role of Kupffer cell in host defence and liver disease. *Liver int.*, **26**,1175-1186, (2006)
51. A. Jacques, C. Bleau, JM-P. Martin and L. Lamontagne. Intrahepatic endothelial and kupffer cells involved in immunosuppressive cytokines and NK/NK T cell disorders in viral acute hepatitis. *Clinical and Experimental Immunology* **152**,298-310, (2008)
52. Emmanuel Tupin, Yuki Kinjo and Mitchell Kronenbery. The unique role of NKT cells in the response to microorganisms. *Nature reviews, Microbiology*, vol **5**, 405-417, (2007)
53. Yu S., Rao MS, Reddy JK: PPARs, fatty acid oxidation, steatohepatitis and hepatocarcinogenicity. *Curr. Mol. Med.*, **3**,561-572, (2003)
54. Hill M.R., Clarke S., Rodgers K., Thornhill B *et al.* Effect of PPARa activators on TNF α expression during endotoxemia. *Infect. Immun.*,**67**,3488-3493, (1999)
55. Mercedes Ricote, Annabel F. Villedor, Christopher K. Glass. Decoding Transcriptional programs regulated by PPARs and RXRs in Macrophages: Effects on Lipid Homeostasis, Inflammation and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb.*

- Vasc. Biol.* ,**24**,230-239, (2004)
- 56.Lajos Szeles , Daniel Torocsik, Laszlo Nagy. PPAR γ in immunity and inflammation:cell types and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1771**,1014-1030, (2007)
- 57.Raymong A. Daynes and Dallas C. Jones. Emerging Roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, Vol 2, 748-759, (2002)
- 58.Giovanni Rizzo and Stefano Fiorucci. PPARs and other nuclear receptors in inflammation. *Current Opin. In Pharmacology*, **6**,421-427, (2006)
59. K.G. Blom , M. Rahman Qazi, J.B Noronha Matos, B.D. Nelson, J.W. DePierre and M. Abedi-Valugerdi. Isolation of marine Intra hepatic immune cells employing a modified procedure for mechanical disruption and functional characterization of the B, T and NKT cells obtained. *Clinical and Experimental Immunology*, **155**,320-329, (2008)
- 60.Mousumi Rahman Qazi, Zhenlei Xia, Jasna Bogdanska, Shu-Ching Chang, Dave J. Ehresman, John L. Butenhoff, B. Dean Nelson, Joseph W. DePierre, Manucher Abedi-Valugerdi. The atrophy and changes in the cellular composition of the thymus and spleen observed in mice subjected to short-term exposure to perfluorooctanesulfonate are high-dose phenomena mediated in part by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α), In Press, *Toxicology*, (2009)
61. J.K. Limdi and G.M. Hyde. Evaluation of abnormal liver function tests . *Postgrad. Med. J.*, **79**,307-312, (2003)
- 62.Edoardo G. Giannini, Roberto Testa, Vincenzo Savarino. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*,172(3), (2005)
- 63.Neil Kaplowitz. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nature reviews Drug Discovery*, Vol4, 489-499, (2005)
64. Michael P. Holt and Cynthia Ju. Mechanisms of drug-induced liver injury. Review *The AAPS Journal* **8**(1),E48-E54, (2006)
- 65.Paolo Serafini, Carmela De Santo *et al.* Dearrangement of immune responses by myeloid suppressor cells. Review *Cancer Immunol. Immunother.*, **53**,64-72, (2004)
- 66.Dale I.Godfrey and Stuart P. Benzins. Control points in NKT development. *Nature Reviews Immunology*, **7**,505-518, (2007)
- 67.Jihan Youssef and Mostafa Badr .Biology of senescent liver peroxisomes:Role in hepatocellular Agind and disease. *Environmental Health Perspectives* vol.107,No 10, (2007)
- 68.R. Bordet¹, T. Ouk, O. Petrault, P. Gele, S. Gautier, M. Laprais, D. Deplanque, P. Duriez, B. Staels, J.C. Fruchart and M. Bastide. PPAR: A new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. *Biochemical Society Transactions* ,Vol 34, part 6, (2006)
- 69.Andrew W. Duncan, Craig Dorrell , Markus Grompe. Stem Cells and Liver Regeneration.Review *Gastroenterology*,**137**,466-481,(2009)