

**Unit of Biochemical Toxicology  
Department of Biochemistry and Biophysics  
Arrhenius Laboratories for natural sciences  
Stockholm University  
Sweden**

**Τίτλος:**

**Μια μελέτη για το ρόλο του PPARα στην ανάπτυξη της μη  
αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος (NAFLD)**

**Όνομα:**

**Συμεωνίδου Ευθυμία**

**Επόπτες:**

**Joseph DePierre**

**Manuchehr Abedi-Valugerdi**

**Τριμελής εξεταστική επιτροπή:**

**Joseph DePierre**

**Δημήτριος Κουρέτας**

**Αντώνιος Κυπάρος**

**Ημερομηνία: 03/03/07-10/06/07**



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

Αριθ. Εισ.: 6179/1  
Ημερ. Εισ.: 08-10-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2007  
ΣΥΜ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087183

Περίληψη.....	2
1. Εισαγωγή.....	3
1.1 Το ανοσοποιητικό σύστημα.....	3
1.1.2 Η μη ειδική ανοσία.....	3
1.1.3 Η ειδική ανοσία.....	4
1.1.4 Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.....	5
1.1.5 Όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος.....	8
1.2 Το ήπαρ: ανατομία και το ανοσοποιητικό σύστημά του.....	11
1.2.1 Τα κύτταρα του ήπατος.....	12
1.2.2 Το ήπαρ ως ανοσολογικό όργανο.....	13
1.2.3 Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (non alcoholic fatty liver disease, NAFLD).....	14
1.3 Υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πολλαπλασιαστές υπεροξειδωμάτων.....	17
1.3.1 Δομή των PPARs.....	17
1.3.2 Μοριακός μηχανισμός της ενεργοποίησης των PPARs.....	18
1.3.3 PPARα και μεταβολισμός λιπιδίων.....	19
1.3.4 PPARα και φλεγμονή.....	20
1.3.5 Πιθανή συμμετοχή του PPARα στην ανάπτυξη NAFL.....	21
2. Υλικά και μέθοδοι.....	21
2.1 Αφαίρεση των οργάνων.....	22
2.2 Απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από το ήπαρ.....	22
2.3 Απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από τη σπλήνα και το θύμο αδένα.....	23
2.4 Κυτταρική καθαρότητα των οργάνων.....	23
2.5 Προετοιμασία σωλήνων για την ανάλυση FACS.....	23
2.6 Ανάλυση FACS.....	24
2.7 Στατιστική ανάλυση.....	27
2.8 Δοκιμή ιστοπαθολογίας του ήπατος.....	27
3. Αποτελέσματα.....	28
3.1 Διαφορές στο σωματικό βάρος μεταξύ των PPARα διαγονιδιακών και άγριου τύπου ποντικών.....	28
3.2 Διαφορές στα βάρη των οργάνων μεταξύ των PPARα-null διαγονιδιακών και άγριου τύπου ποντικών.....	28
3.3 Κυτταρική καθαρότητα των οργάνων.....	29
3.4 Στατιστική ανάλυση στα αποτελέσματα της ανάλυσης FACS στα κύτταρα του ανοσοποιητικού στο ήπαρ.....	29
3.5 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεθόδου FACS στον αριθμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού ανά gr ήπατος.....	30
3.6 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης FACS στον αριθμό των κυττάρων της σπλήνας.....	31
3.7 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων από την μέθοδο FACS στον αριθμό των κυττάρων του θύμου αδένα.....	32
3.8 Μικροσκοπική ανάλυση των ηπατοκυττάρων.....	33
3.9 Ιστοπαθολογική ανάλυση του ήπατος.....	35
4. Συζήτηση.....	36
5. Συμπέρασμα και μελλοντικές προοπτικές.....	38
6. Ευχαριστίες.....	38
7. Βιβλιογραφία.....	39

## Περίληψη

Οι υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πολλαπλασιαστές υπεροξεισωματίων (PPARs) είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται από προσδέτες και ανήκουν σε μια οικογένεια πυρηνικών υποδοχέων. Οι PPARs αποτελούνται από τον PPAR $\alpha$ , τον PPAR  $\beta/\delta$  και τον PPAR $\gamma$ . Ο υποδοχέας PPAR $\alpha$  ρυθμίζει την οξειδωση των λιπαρών οξέων και εκφράζεται κυρίως σε ιστούς στους οποίους είναι ενεργός ο μεταβολισμός λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος, των νεφρών, του σκελετικού μύος και των λιπώδων ιστών. Αυτές οι πληροφορίες μας οδήγησαν να υποθέσουμε ότι η έλλειψη ή η χαμηλή έκφραση του PPAR $\alpha$  στο ήπαρ θα εξασθενίσει το μεταβολισμό των λιπιδίων και θα οδηγήσει στη συσσώρευση των λιπιδίων, η οποία τελικά διεγείρει τις φλεγμονώδεις απαντήσεις σε αυτό το όργανο. Προκειμένου να εξεταστεί η πρόταση μας, διεξαγάμε μια συγκριτική μελέτη μεταξύ ενήλικων DBA/2 διαγονιδιακών ποντικών με απενεργοποιημένο τον υποδοχέα PPAR $\alpha$  (PPAR $\alpha$ -null mice) και ίδιου φύλου και ηλικίας αγρίου τύπου ποντίκια όσον αφορά τους την κυτταρική και τους φαινοτύπους των κυττάρων του ανοσοποιητικού στο ήπαρ, τη σπλήνα και το θύμο αδέν. Παρατηρήσαμε ότι τα PPAR $\alpha$  διαγονιδιακά ποντίκια παρουσίασαν μια μέτρια αύξηση στο συνολικό βάρος του σώματος και στα βάρη του ήπατος, της σπλήνας και του επιδιδυμικού λιπώδους επιθέματος συγκρινόμενα με τα άγριου τύπου. Ανάλυση του αριθμού των ενδοηπατικών κυττάρων του ανοσοποιητικού (IHIC) και των κυττάρων της σπλήνας από PPAR $\alpha$  διαγονιδιακά ποντίκια αποκάλυψαν τα εξής: I) οι αριθμοί των IHIC και των κυττάρων της σπλήνας αυξήθηκαν κατά >195% και >125%, αντίστοιχα· II) όσον αφορά τα IHIC, μακροφάγα, ενεργοποιημένα κοκκιοκύτταρα, NK, NKT, T βοηθητικά και T κυτταροτοξικά κύτταρα ήταν οι πληθυσμοί κυττάρων που αυξήθηκαν περισσότερο (πίνακας 6)· III) στη σπλήνα όλοι οι πληθυσμοί των κυττάρων αυξήθηκαν και IV) κατά ενδιαφέροντα τρόπο, η μικροσκοπική ανάλυση των ηπατοκυττάρων ανέδειξε τη συσσώρευση μικρών και μεγάλων σταγονιδίων λίπους στα ενήλικα PPAR $\alpha$  διαγονιδιακά ποντίκια, αλλά όχι σε εκείνα παρόμοιας ηλικίας άγριου τύπου ζώων. Αυτά τα αποτελέσματα σαφώς δείχνουν ότι με την αύξηση της ηλικίας τα DBA/2 PPAR $\alpha$  διαγονιδιακά ποντίκια αναπτύσσουν έναν τύπο φλεγμονής του ήπατος που προκαλείται από τη συσσώρευση των λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα.

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Το ανοσοποιητικό σύστημα.

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι μια συλλογή μηχανισμών που προστατεύει από τη μόλυνση αναγνωρίζοντας, προσδιορίζοντας και σκοτώνοντας διάφορα παθογόνα. Είναι ικανό να ανιχνεύσει ένα μεγάλο ποσό παθογόνων και να τα διακρίνει από τα κύτταρα και τους ιστούς του οργανισμού. Η ανίχνευση είναι περίπλοκη επειδή τα παθογόνα εξελίσσουν νέους τρόπους για να μολύνουν τον οργανισμό του ξενιστή. Το ανοσοποιητικό σύστημα περιλαμβάνει μη ειδικά και ειδικά συστατικά. Η μη ειδική ανοσία παρέχει την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στη μόλυνση. Σε αντίθεση με την μη ειδική ανοσία, που είναι όμοια σε όλα τα μέλη ενός είδους, η ειδική ανοσία δεν μπαίνει στο «παιχνίδι» έως ότου υπάρχει μια αντιγονική πρόκληση στον οργανισμό.

### 1.1.2 Η μη ειδική ανοσία

Η μη ειδική ανοσία περιλαμβάνει τα κύτταρα και τους μηχανισμούς που υπερασπίζονται τον ξενιστή από τη μόλυνση από άλλους οργανισμούς, κατά τρόπο μη ειδικό. Τα περισσότερα συστατικά της μη ειδικής ανοσίας είναι παρόντα πριν από τη μόλυνση και αποτελούν ένα σύνολο από μηχανισμούς αντοχής στην ασθένεια που δεν είναι συγκεκριμένοι για ένα ιδιαίτερο παθογόνο. Φαγοκυτταρικά κύτταρα, φραγμοί όπως το δέρμα, και αντιμικροβιακές ενώσεις είναι μερικά από τα συστατικά που διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στην μη ειδική ανοσία.

Η μη ειδική ανοσία περιλαμβάνει τέσσερις τύπους αμυντικών φραγμών: ανατομικό, φυσιολογικό, φαγοκυτταρικό και φλεγμονώδη.

Οι ανατομικοί φραγμοί τείνουν να εμποδίσουν την είσοδο των μικροοργανισμών. Το δέρμα και η επιφάνεια των βλεννογόνων μεμβρανών συμπεριλαμβάνονται σε αυτήν την κατηγορία. Το δέρμα είναι ένα μηχανικό εμπόδιο που καθυστερεί την είσοδο των παθογόνων λόγω του όξινου περιβάλλοντός του (pH 3-5) που αποτρέπει την αύξηση των μικροβίων. Επίσης, στην επιφάνεια των βλενωδών μεμβρανών αναπτύσσεται φυσιολογική χλωρίδα που ανταγωνίζεται με τα μικρόβια για τη θέση και τις θρεπτικές ουσίες. Η βλέννα παγιδεύει τους ξένους μικροοργανισμούς και οι βλεφαρίδες τους ωθούν από το σώμα.

Οι φυσιολογικοί φραγμοί που συμβάλλουν στην μη ειδική ανοσία περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία, η οποία εμποδίζει την αύξηση μερικών παθογόνων, το χαμηλό pH, η οξύτητα του γαστρικού υγρού σκοτώνει τους περισσότερους από τους μικροοργανισμούς και τους χημικούς μεσολαβητές, όπως η λυσοζύμη που διασπά το βακτηριακό τοίχωμα και η ιντερφερόνη που προκαλεί αντιϊκή προστασία στα κύτταρα που δεν μολύνθηκαν.

Ένας ακόμα σημαντικός μη ειδικός μηχανισμός είναι η απορρόφηση των παθογόνων με φαγοκυττάρωση. Σε αυτόν τον τύπο ενδοκυττάρωσης ειδικευμένα κύτταρα, όπως τα μονοκύτταρα του αίματος, τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα των ιστών, εσωτερικεύουν, σκοτώνουν και αποσυνθέτουν ολόκληρους μικροοργανισμούς (5).

Η καταστροφή ενός ιστού ή η εισβολή των παθογόνων προκαλεί μια σύνθετη ακολουθία γεγονότων γνωστή ως φλεγμονώδη απάντηση. Τρία σημαντικά γεγονότα της φλεγμονώδους απάντησης είναι η αγγειοδιαστολή, η αύξηση στην διαπερατότητα των τριχοειδών που διευκολύνει την εισροή του υγρού και των κυττάρων από τα διογκωμένα τριχοειδή αγγεία στον ιστό και η εισροή των φαγοκυττάρων. Το τελικό αποτέλεσμα της φλεγμονής μπορεί να είναι η στρατολόγηση της ειδικής ανοσοποιητικής απόκρισης στην εισβολή ή η εκκαθάριση του εισβολέα από τα συστατικά της μη ειδικής ανοσίας (4).

### **1.1.3 Η ειδική ανοσία**

Η ειδική ανοσία αποτελείται από εξειδικευμένα κύτταρα και διαδικασίες που εξαλείφουν τις παθογόνες προκλήσεις. Η ειδική ανοσοποιητική απόκριση παρέχει στο ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν και να θυμούνται συγκεκριμένα παθογόνα και να οργανώνουν ισχυρότερες επιθέσεις κάθε φορά που αντιμετωπίζεται το ίδιο παθογόνο (4).

Ενώ η μη ειδική ανοσοποιητική απόκριση είναι η ίδια σε όλα τα μέλη ενός είδους, η ειδική ανοσία έχει διαφορετικές αντιδράσεις σε συγκεκριμένες αντιγονικές προκλήσεις. Η ειδική ανοσία επιδεικνύει τέσσερις χαρακτηριστικές ιδιότητες:

- *Αντιγονική ειδικότητα*, επιτρέπει στο ανοσοποιητικό σύστημα να διακρίνει τις λεπτές διαφορές μεταξύ των αντιγόνων.



- *Ποικιλομορφία*, το ανοσοποιητικό σύστημα είναι σε θέση να παράγει ένα μεγάλο ποσό διαφορετικών μορίων αναγνώρισης, που του επιτρέπουν να αναγνωρίσει πολλές μοναδικές δομές στα ξένα αντιγόνα.
- *Ανοσοποιητική μνήμη*, μόλις το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίσει και αποκριθεί σε ένα αντιγόνο, σε μια δεύτερη αντιμετώπιση του ίδιου αντιγόνου προκαλεί μια αυξημένη ανοσοποιητική επαναενεργοποίηση.
- *Αναγνώριση εαυτού/ μη εαυτού*, το ανοσοποιητικό σύστημα έχει τη δυνατότητα να αποκρίνεται μόνο στα ξένα αντιγόνα. Μπορεί να διακρίνει το εαυτό από το μη εαυτό και να αποκριθεί μόνο στα μη εαυτά μόρια (5).

Η ειδική ανοσία εξαρτάται από την μη ειδική ανοσία. Παραδείγματος χάριν, τα φαγοκύτταρα που είναι κρίσιμα για την μη ειδική ανοσοποιητική απάντηση συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της ειδικής ανοσοποιητικής απάντησης. Αφ' ετέρου, διαλυτοί παράγοντες που παράγονται από μια ειδική ανοσοποιητική απόκριση εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων.

#### **1.1.4 Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος**

Μια ευρεία ποικιλία λευκών αιμοσφαιρίων συμμετέχει σε μια ανοσοποιητική απόκριση. Υπάρχουν τέσσερις τύποι ανοσοποιητικών κυττάρων: λεμφοκύτταρα, μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και κοκκιοκύτταρα. Μόνο τα λεμφοκύτταρα έχουν τις ιδιότητες της ποικιλομορφίας, εξειδίκευσης, μνήμης και αναγνώρισης εαυτού/ μη εαυτού. Οι άλλοι τύποι λευκών κυττάρων του αίματος διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους, όπως η εσωτερική και η καταστροφή των μικροοργανισμών, η παρουσίαση των αντιγόνων και η έκκριση των κυτοκινών.

##### *A. Λεμφοκύτταρα*

Τα λεμφοκύτταρα αντιπροσωπεύουν το 20-40% των λευκών κυττάρων στο αίμα και το 99% των κυττάρων στη λέμφο. Κυκλοφορούν στο αίμα και τη λέμφο αλλά μπορούν επίσης να βγουν από την κυκλοφορία και να εισέλθουν στους ιστούς. Τα λεμφοκύτταρα διαιρούνται σε τρεις υποπληθυσμούς, T-λεμφοκύτταρα, B-λεμφοκύτταρα και φυσικά κυτταροκτόνα (3).

Τα **B-λεμφοκύτταρα** παράγονται στο μυελό των οστών στα ενήλικα θηλαστικά. Παράγουν τα αντισώματα και μερικούς διαλυτούς μεσολαβητές που ονομάζονται κυτοκίνες.

Τα **T-λεμφοκύτταρα** παράγονται στο μυελό των οστών αλλά ωριμάζουν στο θύμο αδένι. Δεν παράγουν αντισώματα αλλά έχουν υποδοχείς στην επιφάνεια τους που σχετίζονται με τα αντισώματα. Τα T-κύτταρα «βλέπουν» το αντιγόνο με έναν διαφορετικό τρόπο από τα B-κύτταρα. Αναγνωρίζουν τμήματα πεπτιδίων του αντιγόνου που δημιουργούν σύμπλεγμα με MHC γλυκοπρωτείνες στην επιφάνεια των γειτονικών κυττάρων.

Υπάρχουν δύο υποκατηγορίες T-κυττάρων που καθορίζονται βάσει της λειτουργίας, της βοηθητικής έκφρασης μορίων και του τύπου της MHC αντιγονοπαρουσιαστικής πρωτεΐνης σε αυτά. Αυτό μπορεί να συνοψιστεί ως εξής:

Accessory Molecule	T cell	MHC restriction	Function
CD4	T helper	Class II	Cytokine production help for B cells and cytotoxic T cells
CD8	T cytotoxic	Class I	Cytokine production cytotoxic lysis of infected or tumour cells

*Πίνακας 1: Βασικά χαρακτηριστικά των δύο υποκατηγοριών των T-κυττάρων*

Τα **φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK)** είναι μεγάλα κοκκώδη λεμφοκύτταρα που είναι κυτταροτοξικά κατά την πρωτογενή διέγερση από το αντιγόνο. Τα NK κύτταρα αντιπροσωπεύουν την πρώτη γραμμή άμυνας στις μολύνσεις, στην ανάπτυξη όγκων και άλλες παθογόνες αλλαγές της ομοιόστασης του ιστού. Παράγουν κυτοκίνες και εκφράζουν τους υποδοχείς για την ανοσοσφαιρίνη. Έχουν επίσης άλλα μόρια υποδοχέων που τους επιτρέπουν να ανιχνεύουν μολυσμένα κύτταρα του ξενιστή, συμπεριλαμβανομένων των ογκοκυττάρων, του ιού, ή κυττάρων μολυσμένων από βακτήρια (5).



### *B. Μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα*

Το μονοπύρρηνο φαγοκυτταρικό σύστημα αποτελείται από τα μονοκύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα και τα μακροφάγα στους ιστούς και αντιπροσωπεύει 5-8% των λευκών κυττάρων αίματος.

Τα **μακροφάγα** διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στην μη ειδική και ειδική ανοσολογική απόκριση. Είναι υπεύθυνα για την *φαγοκυττάρωση*, *αντιμικροβιακές και κυτταροτοξικές δραστηριότητες*, και την *έκκριση διαλυτών παραγόντων*, όπως οι κυτοκίνες και άλλοι διαλυτοί παράγοντες. Αν και το μεγαλύτερο μέρος του αντιγόνου που προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα αποικοδομείται και αποβάλλεται, έχει αποδειχθεί η παρουσία αντιγονικών πεπτιδίων στη μεμβράνη των μακροφάγων. Αυτή η επεξεργασία και παρουσίαση του αντιγόνου είναι κρίσιμες για την ενεργοποίηση των T βοηθητικών κυττάρων (7).

### *Γ. Δενδριτικά κύτταρα*

Τα **δενδριτικά κύτταρα** προέρχονται από την «γενιά» των μονοκυττάρων. Αυτά τα κύτταρα λειτουργούν ως επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα MHC κατηγορίας II μόρια. Συλλαμβάνουν το αντιγόνο στους ιστούς και μεταναστεύουν στα διάφορα λεμφικά όργανα όπου παρουσιάζουν το αντιγόνο στα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα. Ένας άλλος τύπος δενδριτικού κυττάρου, το θυλακοειδές δενδριτικό κύτταρο, έχει διαφορετική λειτουργία από τα αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα που περιγράφηκαν παραπάνω. Αυτά τα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα μεμβρανικών υποδοχέων για το αντίσωμα, οι οποίοι επιτρέπουν τη σύνδεση των συμπλόκων αντιγόνου-αντισώματος. Η αλληλεπίδραση των B-κυττάρων με αυτό το συνδεδεμένο αντιγόνο μπορεί να έχει σημαντικά αποτελέσματα για τις αποκρίσεις των B-κυττάρων (6).

### *Δ. Κοκκιοκύτταρα*

Τα κοκκιοκύτταρα είναι μεγάλα λευκά αιμοσφαίρια, τα οποία περιέχουν κυτταροπλασματικά κοκκία. Υπάρχουν τρεις τύποι κοκκιοκυττάρων που διακρίνονται σύμφωνα με τα ιστολογικά πρότυπα χρώσης:

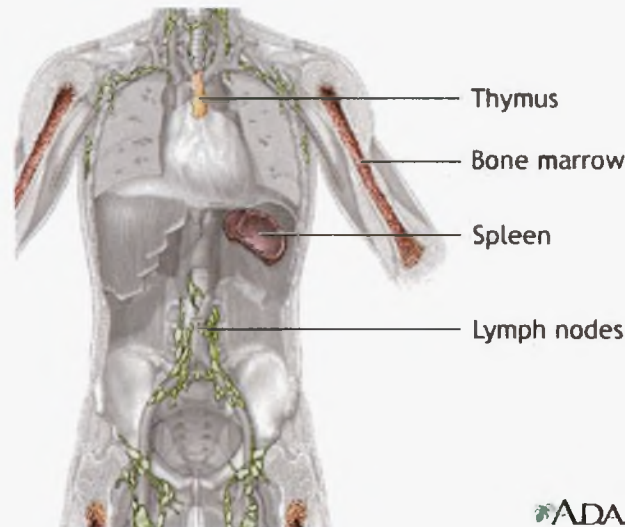
Τα **ουδετερόφιλα**, αντιπροσωπεύουν το 50-70% των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων, εκφράζουν υποδοχείς για την ανοσοσφαιρίνη και το συμπλήρωμα και εμπλέκονται στην οξεία φλεγμονώδη απόκριση.

Τα **ηωσινόφιλα**, αντιπροσωπεύουν το 1-3% των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων, φέρνουν υποδοχείς για IgE, συμμετέχουν στην καταστροφή παρασίτων επικαλυμμένων με IgE, όπως οι παρασιτικοί σκώληκες του εντέρου και συμβάλλουν στην απόκριση στα αλλεργιογόνα.

Τα **βασεόφιλα**, είναι μόνο παρόντα στην κυκλοφορία του αίματος, και αντιπροσωπεύουν < 1% των λευκοκυττάρων, είναι αντίστοιχα των κυττάρων του συνδετικού ιστού. Εκφράζουν υποδοχείς υψηλής συγγένειας για IgE και όταν διεγείρονται εκκρίνουν χημικές ουσίες υπεύθυνες για την άμεση υπερευαισθησία ως συνέπεια της υψηλής έκφρασης αυτών των υποδοχέων που προκαλείται από αντιγόνα (5).

### **1.1.5 Όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος**

Ένας αριθμός από μορφολογικά και λειτουργικά διαφορετικά όργανα και ιστούς έχουν ποικίλες λειτουργίες στην ανάπτυξη των ανοσολογικών απαντήσεων. Τα όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος είτε παράγουν τα κύτταρα που συμμετέχουν στην ανοσοποιητική απόκριση ή δρουν ως θέσεις της ανοσολογικής λειτουργίας. Αυτά μπορούν να διακριθούν σύμφωνα με τις λειτουργίες ως πρωτογενή και δευτερογενή λεμφικά όργανα. Τα πρωτογενή λεμφικά όργανα είναι ο θύμος αδένας και ο μυελός των οστών όπου πραγματοποιείται η ωρίμανση των λεμφοκυττάρων. Οι λεμφαδένες, η σπλήνα και τα διάφορα λεμφικά συστήματα των βλεννογόνων των ιστών είναι τα δευτερογενή λεμφικά όργανα, τα οποία παγιδεύουν το αντιγόνο και παρέχουν τις περιοχές για να αλληλεπιδράσουν τα ώριμα λεμφοκύτταρα με το αντιγόνο.



*Σχήμα 1: Η θέση των οργάνων του ανοσοποιητικού συστήματος στο ανθρώπινο σώμα.*

#### *A. Πρωτογενή λεμφικά όργανα*

Ο **θύμος αδένας** είναι η περιοχή της ανάπτυξης και της ωρίμανσης των Τ-κυττάρων. Είναι ένα επίπεδο, δίλοβο όργανο που βρίσκεται επάνω από την καρδιά. Κάθε λοβός περιβάλλεται από μια κάψα και διαιρείται σε λοβίδια, τα οποία χωρίζονται το ένα από το άλλο από πλέγματα συνδετικού ιστού αποκαλούμενα δικτυωτό (trabeculae)(8). Κάθε λοβίδιο οργανώνεται σε δύο διαμερίσματα: το φλοιό (εξωτερικό διαμέρισμα) και το μυελό (εσωτερικό διαμέρισμα). Ο φλοιός είναι η θέση των πιο πρόωρων γεγονότων στην ανάπτυξη των θυμοκυττάρων, όπου πραγματοποιούνται η αναδιοργάνωση των υποδοχέων των Τ-κυττάρων και η θετική επιλογή. Ο μυελός είναι η θέση των τελευταίων γεγονότων στην ανάπτυξη των θυμοκυττάρων. Τα θυμοκύτταρα που φθάνουν στο μυελό ήδη έχουν υποβληθεί επιτυχώς στην αναδιοργάνωση των υποδοχέων των Τ-κυττάρων και στη θετική επιλογή και έχουν εκτεθεί σε έναν περιορισμένο βαθμό αρνητικής επιλογής. Ο μυελός είναι ειδικευμένος να επιτρέπει στα θυμοκύτταρα να υποβληθούν στους επιπλέον κύκλους αρνητικής επιλογής για να εξαλειφθούν τα Τ-κύτταρα που αντιδρούν κατά εαυτών αντιγόνων από το ώριμο ρεπερτόριο (3).

Ο **μυελός των οστών** είναι η περιοχή γένεσης και ανάπτυξης των Β-κυττάρων. Βρίσκεται μέσα στα κόκαλα. Λόγω των λεμφικών προγεννητορων, τα ανώριμα Β-κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούν μέσα στο μυελό των οστών, τα κύτταρα μέσα στο μυελό των οστών αλληλεπιδρούν άμεσα με τα Β-κύτταρα και

εκκρίνουν διάφορες κυτοκίνες που χρειάζονται για την ανάπτυξη. Μια διαδικασία επιλογής μέσα στο μυελό των οστών περιορίζει τα Β-κύτταρα με υποδοχείς για αντισώματα που αντιδρούν με εαυτά αντιγόνα (8).

### *B. Δευτερογενή λεμφικά όργανα*

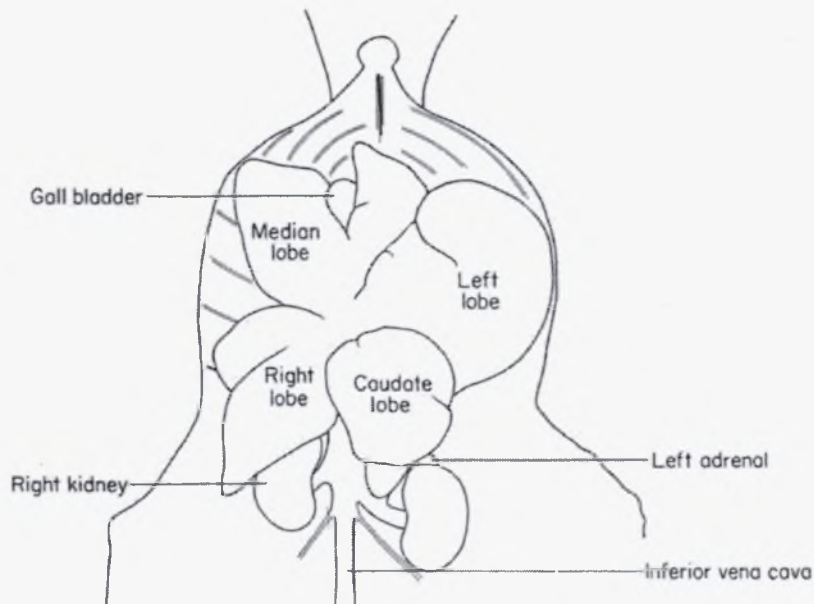
Οι **λεμφαδένες** είναι οι περιοχές όπου οι ανοσολογικές απαντήσεις οργανώνονται ενάντια στα αντιγόνα στη λέμφο. Αποτελούν δομές οβάλ σχήματος που συσκευάζονται με λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Είναι η πρώτη οργανωμένη λεμφική δομή που αντιμετωπίζει τα αντιγόνα που εισέρχονται στους ιστούς. Μορφολογικά, ένας λεμφαδένας μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις κατά προσέγγιση ομόκεντρες περιοχές: το φλοιό, τον παραφλοιό (paracortex) και το μυελό. Ο φλοιός περιέχει λεμφοκύτταρα (συνήθως Β-κύτταρα), μακροφάγα και θυλακοειδή δενδριτικά κύτταρα. Κάτω από το φλοιό είναι ο παραφλοιός που περιέχει Τ-λεμφοκύτταρα και συγκλίνοντα δενδριτικά κύτταρα. Το ενδότατο στρώμα ενός λεμφαδένα είναι ο μυελός και είναι αραιότερα εποικημένο με κύτταρα λεμφικής καταγωγής, όπως ενεργά πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν μόρια αντισωμάτων (3,8).

Η **σπλήνα** διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο, οργανώνει τις ανοσολογικές αποκρίσεις ενάντια στα αντιγόνα στη ροή του αίματος. Είναι ένα μεγάλο, ωοειδές δευτερογενές λεμφικό όργανο που βρίσκεται ψηλά στην αριστερή κοιλιακή κοιλότητα. Η σπλήνα είναι εξειδικευμένη στο φιλτράρισμα του αίματος και την παγίδευση αντιγόνων που δημιουργούνται στο αίμα, κατά συνέπεια μπορεί να αποκριθεί σε συστηματικές μολύνσεις (8). Μια κάψα περιβάλλει τη σπλήνα. Υπάρχουν δύο τύποι διαμερισμάτων, η κόκκινη πολφική κοιλότητα και η λευκή πολφική κοιλότητα, με μια οριακή ζώνη ενδιάμεσα. Η κόκκινη πολφική κοιλότητα των τριχοειδών επικοινωνεί με μακροφάγα και πολυάριθμα ερυθροκύτταρα. Είναι η περιοχή όπου παλαιά RBCs καταστρέφονται και απομακρύνονται. Η λευκή πολφική κοιλότητα περιβάλλει τις σπληνικές αρτηρίες, διαμορφώνοντας μια περιαρτηριακή λεμφική θήκη που επικοινωνεί κυρίως από Τ-λεμφοκύτταρα (3).

Οι βλεννώδεις μεμβράνες που παραθέτονται στα πεπτικά, αναπνευστικά και ουρογεννητικά συστήματα είναι οι κύριες περιοχές εισόδου για τα περισσότερα παθογόνα. Αυτές οι τρωτές επιφάνειες μεμβρανών υπερασπίζονται από μια ομάδα

οργανωμένων λεμφικών ιστών γνωστή συλλογικά ως **βλεννογόνοι λεμφικοί ιστοί**. Ο μεγάλος πληθυσμός των πλασμοκυττάρων που παράγουν αντισώματα βεβαιώνει τη λειτουργική σημασία των βλεννογόνων λεμφικών ιστών στην άμυνα του σώματος (3).

## 1.2 Το ήπαρ: ανατομία και το ανοσοποιητικό σύστημά του



*Σχήμα 2: Διαγραμματική απεικόνιση του ήπατος ποντικίων*

Το ήπαρ των ποντικών βρίσκεται στην άνω δεξιά πλευρά της κοιλίας κάτω από τα πλευρά και το διάφραγμα και πάνω από το στομάχι, το δεξί νεφρό και το έντερο. Το ήπαρ, ο μεγαλύτερος αδένας στο σώμα, έχει τόσο εξωτερικές όσο και εσωτερικές εκκρίσεις, οι οποίες παράγονται στα ηπατικά κύτταρα. Η εξωτερική έκκρισή του, η **χολή**, συλλέγεται αφού περάσει μέσω των τριχοειδών χολικών αγγείων στους χολικούς αγωγούς, οι οποίοι ενώνονται όπως τα κλαδάκια και οι κλάδοι ενός δέντρου για να διαμορφώσουν δύο μεγάλους αγωγούς που ενώνονται για να διαμορφώσουν τον ηπατικό αγωγό. Η χολή είτε κρατάτε στη χοληδόχο κύστη από τον κυστικό αγωγό είτε χύνεται άμεσα στο δωδεκαδάκτυλο από τον χολικό αγωγό και βοηθά στην πέψη. Οι εσωτερικές εκκρίσεις εμπλέκονται στο μεταβολισμό των αζωτούχων και υδατανθρακικών υλικών που απορροφώνται από το έντερο και φέρονται στο ήπαρ από την πυλαία φλέβα. Οι υδαάνθρακες αποθηκεύονται στα ηπατικά κύτταρα υπό μορφή γλυκογόνου που εκκρίνεται με τη μορφή ζάχαρης άμεσα στη ροή του αίματος (27). Το ήπαρ διαιρείται σε πέντε λοβούς, αριστερό, κερκοφόρο, πρόσθιο δεξιό, οπίσθιο δεξιό και μεσαίο λοβό.



Το ήπαρ περιέχει περίπου 13% του συνολικού αίματος του σώματος σε οποιαδήποτε δεδομένη στιγμή. Υπάρχουν δύο ευδιάκριτες πηγές που παρέχουν αίμα στο ήπαρ:

- το οξυγονωμένο αίμα ρέει μέσα από την ηπατική αρτηρία
- το πλούσιο σε θρεπτικά αίμα ρέει μέσα από την ηπατική πυλαία φλέβα (26)

Η ηπατική πυλαία φλέβα και η ηπατική αρτηρία παραδίδουν το οξυγόνο και τις θρεπτικές ουσίες στα τριχοειδή του αίματος. Αυτή η στενή σχέση μεταξύ των ηπατοκυττάρων και του περιβάλλοντος αίματος επιτρέπει σε πολλές μεταβολικές διαδικασίες να πραγματοποιηθούν. Το αίμα ρέει από τα τριχοειδή στην κεντρική φλέβα, απομακρύνοντας αποτοξινωμένες ουσίες και μεταβολικά τελικά προϊόντα. Η κεντρική φλέβα επανασυνδέεται τελικά με την ηπατική φλέβα μεταφέροντας τις ουσίες αυτές έξω από το ήπαρ.

Οι διάφορες λειτουργίες του ήπατος πραγματοποιούνται από τα κύτταρα του. Το ήπαρ επιτελεί διάφορους ρόλους στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, όπως η γλυκονεογένεση, η γλυκογονόλυση, η γλυκογένεση, η αποσύνθεση της ινσουλίνης και άλλων ορμονών και είναι αρμόδιο για την υποστήριξη του πρωτεϊνικού μεταβολισμού. Το ήπαρ επιτελεί επίσης διάφορους ρόλους στο μεταβολισμό λιπιδίων, όπως η σύνθεση χοληστερόλης και η παραγωγή τριγλυκεριδίων (λίπη). Το ήπαρ απομακρύνει τις τοξικές ουσίες και τα περισσότερα φαρμακευτικά προϊόντα με μια διαδικασία αποκαλούμενη μεταβολισμός φαρμάκων (24.25).

### **1.2.1 Τα κύτταρα του ήπατος**

Τα ηπατοκύτταρα αποτελούν μόνο τα δύο τρίτα του συνολικού πληθυσμού κυττάρων στο ήπαρ. Ο υπόλοιπος πληθυσμός των μη-παρεγχυματικών κυττάρων περιλαμβάνει LSEC, κύτταρα Kupffer, χολικά κύτταρα, αστροκύτταρα και ενδοηπατικά λεμφοκύτταρα.

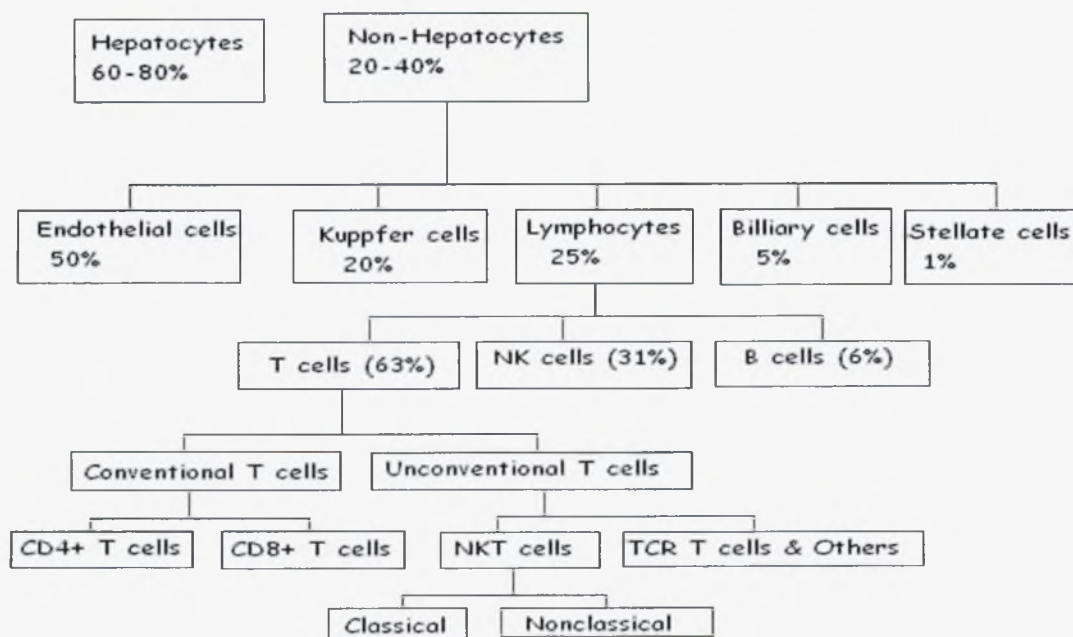
Τα *ηπατοκύτταρα* εμπλέκονται στην πρωτεϊνική σύνθεση, την αποθήκευση των πρωτεϊνών και το μετασχηματισμό των υδατανθράκων, τη σύνθεση της χοληστερόλης, των αλάτων και των φωσφολιπιδίων, και της αποτοξίνωσης, της τροποποίησης και της έκκρισης εξωγενών και ενδογενών ουσιών. Το ηπατοκύτταρο αρχίζει επίσης το σχηματισμό και την έκκριση της χολής.



Εκτός από τα ηπατοκύτταρα, το ήπαρ περιέχει έναν μεγάλο πληθυσμό λεμφοκυττάρων, τα οποία περιλαμβάνουν συμβατικούς και μη συμβατικούς υποπληθυσμούς λεμφοκυττάρων των μη ειδικών (NK και NKT κύτταρα) και ειδικών ( T και B κύτταρα) ανοσοποιητικών συστημάτων.

Τα κύτταρα *Kupffer* αντιπροσωπεύουν περίπου 20% των μη-παρεγχυματικών κυττάρων στο ήπαρ. Όταν εγκατασταθούν στο ήπαρ, τα κύτταρα Kupffer είναι αρμόδια για την κάθαρση των ενδοτοξινών από το διερχόμενο αίμα και για την φαγοκυττάρωση μικροοργανισμών ή τμημάτων μικροοργανισμών.

Τα *LSECs* εκφράζουν μόρια που προωθούν την πρόσληψη των αντιγόνων και μόρια που προωθούν την παρουσίαση αντιγόνων. Τα υπόλοιπα ηπατικά δενδριτικά κύτταρα είναι κυρίως ανώριμα κύτταρα, προορίζονται να παγιδεύουν και να επεξεργάζονται αντιγόνα (23).



Σχήμα 3: Σύσταση κυττάρων του υγιούς ήπατος.

### 1.2.2 Το ήπαρ ως ανοσολογικό όργανο

Η δομική οργάνωση του ήπατος έχει επιπτώσεις στην ανοσολογική λειτουργία του. Το ήπαρ είναι εμπλουτισμένο με μακροφάγα, NK κύτταρα και NKT κύτταρα που είναι σημαντικά συστατικά της μη ειδικής ανοσίας.

Διάφορα βακτηριακά ερεθίσματα και τα βακτηριακά υπεραντιγόνα ενεργοποιούν τα κύτταρα Kupffer. Σε απάντηση σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις ερεθισμάτων τα κύτταρα Kupffer παράγουν TNF- $\alpha$ , IL-10 και διάφορα ενδιάμεσα που καταστέλλουν την ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Αφ' ετέρου, τα κύτταρα Kupffer είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην ευρεία αντίσταση σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μολύνσεις. Είναι γνωστό ότι αρχίζουν και ενορχηστρώνουν μια αποτελεσματική πρώτη φάση απόκριση. Επίσης, τα ηπατικά NK κύτταρα ρυθμίζουν τον τραυματισμό του ήπατος εξισορροπώντας την τοπική παραγωγή των προφλεγμονώδων και αντιφλεγμονώδων κυτοκινών μετά από ενεργοποίηση των ενεργοποιητικών και κατασταλτικών υποδοχέων τους. Επιπλέον, τα NKT κύτταρα αναγνωρίζουν μη-πεπτιδικούς αντιγονικούς στόχους όπως γλυκολιπίδια, συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων μυκοβακτηρίων. Η πλειοψηφία αυτών των κυττάρων ενεργοποιείται από IL-12 και τα αποτελέσματα της ενεργοποίησης είναι η γρήγορη λύση των κυττάρων.

Εκτός από τη μη ειδική ανοσία υπάρχουν μερικές επιπτώσεις και στην ειδική ανοσολογική απόκριση στο ήπαρ. Αν και δεν είναι γνωστή η λειτουργία των B-κυττάρων στο ήπαρ, μερικά πειραματικά ευρήματα επιβεβαιώνουν την άποψη ότι οι ενδοηπατικές δομές που μοιάζουν με θυλάκια είναι λειτουργικά παρόμοιες με εκείνες των λεμφαδένων όσον αφορά την ενεργοποίηση, την ανάπτυξη και την ωρίμανση των B-κυττάρων. Η ανοσολογική απάντηση στα περισσότερα ηπατο-τροφικά παθογόνα συνδέεται κινητικά με ισχυρή CD4 και CD8 απάντηση T-κυττάρων. Τέλος, οξύς τραυματισμός του ήπατος γίνεται πιο εμφανής κατά την διάρκεια μη-ειδικής, ενίσχυσης της ενδοηπατικής διήθησης όπου μεσολαβούν χημειοκίνες. Ένα βασικό βήμα σε αυτήν την μη-ειδική ενίσχυση της φλεγμονώδους διήθησης είναι η στρατολόγηση ουδετερόφιλων (1).

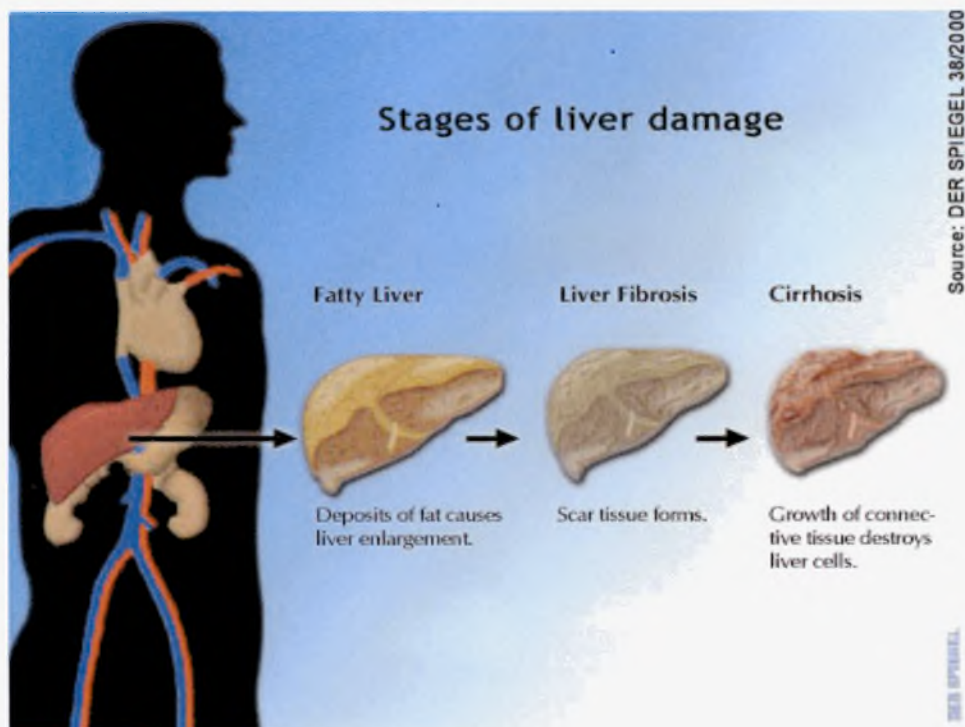
### **1.2.3 Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (non alcoholic fatty liver disease, NAFLD)**

Το ήπαρ διαδραματίζει έναν κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό λιπιδίων, ελεύθερων εισαγόμενων λιπαρών οξέων του ορού και στην παρασκευή, αποθήκευση και εξαγωγή λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών. Η παθοφυσιολογία που οδηγεί σε NAFL δεν είναι πλήρως κατανοητή, και ειδικότερα, οι παράγοντες που οδηγούν στην

προοδευτική ηπατοκυτταρική βλάβη μετά από συσσώρευση τριγλυκεριδίων δεν είναι καλά διευκρινισμένοι. Φαίνεται ότι η αλλαγή των τοπικών και συστηματικών παραγόντων που ελέγχουν την ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης των ηπατικών λιπιδίων και της οξειδωσης τους οδηγεί στην συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ. Κατά τη στεάτωση γενικά παρατηρούνται μακροκυστικά σταγονίδια, αν και μπορεί να υπάρχουν και μικροκυστικά (18,20). Το ιστολογικό φάσμα της NAFLD εκτείνεται από τη γενικά καλοήθη, ήπια στεάτωση στη στεάτωση με στοιχεία ηπατοκυτταρικής φλεγμονής και βλάβης (μη αλκοολική στεάτωση, NASH), η οποία μπορεί να σχετίζεται με την προοδευτική ίνωση και κίρρωση (19).

*Επιδημιολογία:* Στο γενικό πληθυσμό, η κατ' εκτίμηση εμφάνιση της ασθένειας κυμαίνεται από 3 ως 24%. Εμφανίζεται να είναι πιο συχνή στους άντρες, και αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας (από 2,6% μεταξύ των παιδιών σε 26% μεταξύ ανθρώπων 40-59 ετών) και μετά από την εμμηνόπαυση. Η NAFLD είναι συχνότερη μεταξύ των ανθρώπων με διαβήτη και παχυσαρκία (15,30,31).

*Παθοφυσιολογία:* Το λίπος συσσωρεύεται στο ήπαρ όταν το ποσοστό εισόδου των λιπαρών οξέων στα ηπατοκύτταρα υπερβαίνει τη μεταβολική ικανότητα να τα επεξεργαστεί. Τα λιπαρά οξέα που εισάγονται στο ήπαρ δεσμεύονται στην αλβουμίνη από τον περιφερειακό λιπώδη ιστό, και επίσης από την τοπική σύνθεση στο ήπαρ ως αποτέλεσμα της περίσσειας είτε πρωτεϊνών είτε υδατανθράκων. Υπάρχουν επίσης δύο σημαντικά μονοπάτια για τη ρύθμιση των λιπαρών οξέων: η μιτοχondριακή β-οξειδωση και τα κετονοσώματα, και η έκκριση στο αίμα ως τριγλυκερίδια σε πολύ χαμηλής-πυκνότητας λιποπρωτεΐνη. Διαταραχές σε αυτές τις διαδικασίες μπορούν να κληρονομηθούν ή να αποκτηθούν, με συνέπεια τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ (15).



*Σχήμα 4: Η ανάπτυξη της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος*

*Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά γνωρίσματα:* Όπως με πολλές κοινές χρόνιες παθήσεις του ήπατος, ασθενείς με NAFLD έχουν ήπια συμπτώματα. Μια συχνή διάγνωση του NAFL είναι η εύρεση παθολογικών ηπατικών ενζύμων σε μια τυπική εξέταση αίματος. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν εξάντληση, αδιαθεσία και ασαφή κοιλιακό πόνο στο δεξί πάνω τεταρτημόριο. Αυτά τα συμπτώματα είναι παρόντα πριν από τη διάγνωση στο ένα τρίτο περίπου των ασθενών. Στην εξέταση της φυσιολογίας, η ηπατομεγαλία είναι συχνά παρούσα σε πάνω από 75% των ασθενών. Επίσης, τα σημαντικότερα εργαστηριακά χαρακτηριστικά γνωρίσματα είναι ήπιες αυξήσεις στις αμινοτρασφεράσες της αλανίνης και της ασπαρτάμης, τα πιο κοινά ευρήματα του NAFL (15).

*Θεραπεία:* Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει καμία θεραπεία για τη NAFLD που αποδεδειγμένα είναι αποτελεσματική βάσει των τυχαίων ελεγχόμενων εξετάσεων συμπεριλαμβανομένης της βιοψίας του ήπατος, εντούτοις διάφορες θεραπευτικές μορφές έχουν δοκιμαστεί με κάποια επιτυχία, όπως η διατροφή, τα αντιοξειδωτικά, στατίνες, η μεταμόσχευση ήπατος κ.λ.π.

### 1.3 Υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πολλαπλασιαστές υπεροξεισωμάτων

Οι υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πολλαπλασιαστές υπεροξεισωμάτων (PPARs) ανήκουν σε μια υπεροικογένεια πυρηνικών υποδοχέων και είναι παράγοντες μεταγραφής που ενεργοποιούνται από προσδέτες. Μέχρι σήμερα, τρεις διαφορετικοί τύποι PPAR έχουν προσδιοριστεί:

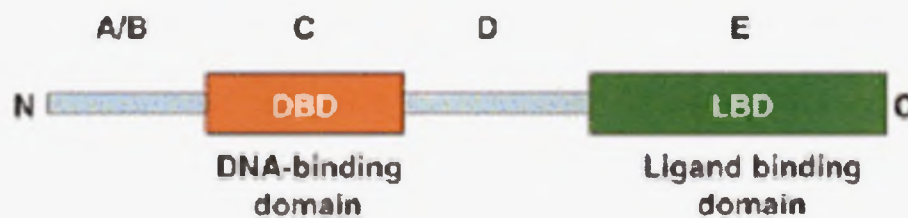
- **PPAR α** (468 αμινοξέα, χρωμόσωμα 22q13.3), είναι συνήθως παρόν σε ιστούς που χαρακτηρίζονται από τα υψηλά επίπεδα καταβολισμού λιπαρών οξέων, όπως το ήπαρ, το νεφρό, η καρδιά και ο μυς (12). Οι PPARα ενεργοποιούν πολλά γονίδια οξειδωσης λιπιδίων στα υπεροξεισωματικά, μιτοχονδριακά και μέσω του κυτοχρώματος P450 μονοπάτια. Προωθεί επίσης τη γλυκονογένεση, καταστέλλει τα γονίδια καταβολισμού αμινοξέων και έχει τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις (32).
- **PPAR γ** (475/505 αμινοξέα, χρωμόσωμα 3p25.1), εκφράζεται στο λιπώδη ιστό, ανιχνεύεται επίσης στο μαστικό αδένια και σε διάφορους άλλους ιστούς (12). Οι PPARγ είναι απαραίτητοι και επαρκείς για τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και παράγουν μικρά, μεταβολικά ενεργά κύτταρα που έχουν την ίδια προέλευση με τους ινοβλάστες. Είναι απαραίτητοι επίσης για την ανάπτυξη της καρδιάς και του πλακούντα (32).
- **PPAR δ** (ή PPAR β, 441 αμινοξέα, χρωμόσωμα 6p21.2), εκφράζονται σε ένα ευρύ φάσμα ιστών συμπεριλαμβανομένης της καρδιάς, του λιπώδους ιστού, του εγκεφάλου, του εντέρου, του μυ, της σπλήνα και των επινεφριδίων (12). Οι PPARδ εμπλέκονται στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης και θεωρείται ότι είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής των PPARα και PPARγ αν και τα δεδομένα είναι ακόμα λίγα. Ο PPARδ ελέγχει τη αποπτωτική απόκριση στις προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως TNFα (32).

#### 1.3.1 Δομή των PPARs

Όλοι οι PPARs έχουν μια παρόμοια δομή: η περιοχή A/B είναι μια ανεξάρτητη από τον προσδέτη περιοχή που μεσολαβεί στη μεταγραφική ενεργοποίηση σε ορισμένους τύπους κυττάρων. Η C ή DNA-δεσμευτική περιοχή (DBD) είναι υψηλά συντηρημένη και αποτελείται από δύο δάχτυλους ψευδάργυρου που δεσμεύουν συγκεκριμένα



PPREs στη ρυθμιστική περιοχή των γονιδίων που αποκρίνονται στους PPAR. Η περιοχή D αποτελεί μια εύκαμπτη περιοχή σύνδεσης, η οποία θεωρείται ότι επιτρέπει την ανεξάρτητη μετακίνηση της περιοχής δέσμευσης του προσδέτη σε σχέση με τη DBD. Η E ή ligand-δεσμευτική περιοχή (LBD) μετατρέπει τους PPARs σε μια ενεργό μορφή που δεσμεύει το DNA και διαμορφώνει την έκφραση γονιδίων. Η περιοχή E εμπλέκεται επίσης στο διμερισμό, τον πυρηνικό εντοπισμό και την ένωση με οργανωτές της μεταγραφής, όπως συν-ενεργοποιητές και συν-καταστολείς. Η περιοχή LBD των PPARs εμφανίζεται να είναι αρκετά μεγάλη σε σύγκριση με αυτή άλλων πυρηνικών υποδοχέων. Αυτή η διαφορά μπορεί να επιτρέπει στους PPARs να αλληλεπιδρούν με μια ευρεία σειρά δομικά ευδιάκριτων φυσικών και συνθετικών προσδετών (34).



*Σχήμα 5: Γενική σχηματική αναπαράσταση της δομής της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων PPAR*

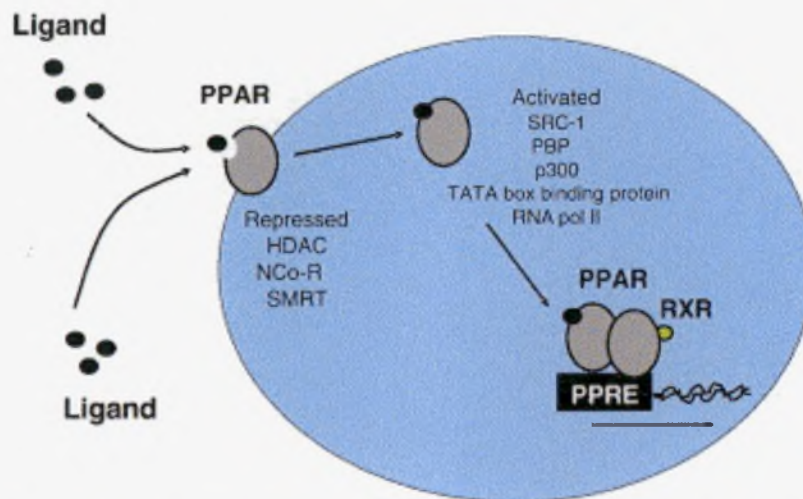
### **1.3.2 Μοριακός μηχανισμός της ενεργοποίησης των PPARs**

Οι PPARs είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται από προσδέτες, μετά από ετεροδιμερισμό με το ρετινοϊκό X υποδοχέα (RXR), αναγνωρίζουν τα PPAR response elements (PPRE), που βρίσκονται στον υποκινητή των γονιδίων στόχων. Τα PPREs αποτελούνται από μια ομόρροπη επανάληψη του εξαμερούς AGGTCA της ακολουθίας αναγνώρισης του πυρηνικού υποδοχέα που χωρίζεται από ένα ή δύο ενδιάμεσα νουκλεοτίδια (DR-1 και DR-2). Μέσα σε αυτό το σύμπλοκο, ο PPAR δεσμεύεται στο 5' άκρο ενώ το RXR δεσμεύεται στο 3' άκρο του στοιχείου απάντησης (33, 13).

Το μεταγραφικό μονοπάτι των PPARs ελέγχεται από το επίπεδο έκφρασης και σταθερότητας των υποδοχέων, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, την



εξειδίκευση, τη διαθεσιμότητά του προσδέτη και τη στρατολόγηση συμπαραγόντων (21).



*Σχήμα 6: Γενικό σχέδιο για την ενεργοποίηση ενός υποδοχέα PPAR ως παράγοντα μεταγραφής.*

### **1.3.3 PPARα και μεταβολισμός λιπιδίων**

Ο PPARα έχει ταυτοποιηθεί ως βασικός ρυθμιστής των γονιδίων που εμπλέκονται στα υπεροξεισωματικά, μιτοχονδριακά και μικροσωμικά συστήματα οξείδωσης λιπαρών οξέων στο ήπαρ (17). Η μεταγραφική δραστηριότητά του PPARα προϋποθέτει δέσμευση στους προσδέτες και το συν-ενεργοποίηση του RXRα, που οδηγούν στην επαγωγή των μιτοχονδριακών, υπεροξεισωματικών και μικροσωμικών ενζύμων οξείδωσης λιπαρών οξέων, των ενζύμων της γλυκονεογένεσης και της λιπογένεσης. Αυτά τα αποτελέσματα αυξάνουν τη διαθεσιμότητα των λιπαρών οξέων για οξείδωση, που οδηγεί σε μια σημαντική μείωση των ηπατικών λιπαρών οξέων (2).

Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια που κωδικοποιούν την οξειδάση του ακυλο-CoA (ACO), το οποίο είναι το ρυθμοκαθοριστικό ένζυμο στο μονοπάτι, το πολυσύνθετο ένζυμο υδρογονάση/ αφυδρογονάση του ενολο-CoA (HD) και τη θειολάση του κετο-ακυλο-CoA είναι άμεσοι στόχοι των PPARα (37). Η υπεροξεισωματική β-οξείδωση εμφανίζεται σαν ένας μηχανισμός περιορισμού των λιπαρών οξέων πολύ μακριάς αλυσίδας, τα οποία προέρχονται από τη διατροφή και τα αποτρέπεται να εισέλθουν στα μιτοχόνδρια. Μετά από μερικούς κύκλους υπεροξεισωματικής β-οξείδωσης, κατά την οποία αφαιρούνται δύο άνθρακες σε κάθε κύκλο υπό μορφή μορίου ακέτυλο-

CoA, η μικρότερη αλυσίδα μπορεί να αποικοδομηθεί πλήρως στο μιτοχόνδριο (16,22). Επιπλέον, η υπεροξεισωματική β-οξείδωση οξειδώνει άλλα υποστρώματα, όπως το ξενοβιοτικές ουσίες (11,29). Ο PPARα διεγείροντας την υπεροξεισωματική β-οξείδωση βοηθάει στην αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων αν εισαχθούν στα μιτοχόνδρια ή να χρησιμοποιηθούν στη σύνθεση μεμβρανών και επίσης συμβάλλει στην αποτοξίνωση των ενδογενών και εξωγενών ενεργών μορίων, μερικά από τα οποία μπορούν να είναι προσδέτες των PPAR.

Επιπλέον, η μιτοχονδριακή β-οξείδωση συμβάλλει στην παραγωγή ενέργειας μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης η οποία παράγει ATP. Ο ρόλος των PPARα στη παραγωγή της ενέργειας συνδέεται με το βαθμό που ο PPARα ρυθμίζει αυτό το μονοπάτι. Ο PPARα ρυθμίζει την CPT I (carnitine palmitoyl transferase I) που συμμετέχει στη εισόδων των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια. Ο PPARα ρυθμίζει περαιτέρω τη μιτοχονδριακή β-οξείδωση συντονίζοντας της έκφρασης του γονιδίου της αφυδρογονάσης των μεσαίας-αλυσίδας ακυλο-CoA (MCAD). Η μιτοχονδριακή mHMG-CoAS (hydroxymethylglutaryl-CoA synthase) είναι το κύριο ένζυμο που εμπλέκεται στο σχηματισμό κετονοσωμάτων και ελέγχεται άμεσα από τον PPARα (38).

#### **1.3.4 PPARα και φλεγμονή**

Τα πρώτα στοιχεία που δείχνουν έναν πιθανό ρόλο των PPARs στην φλεγμονώδη απάντηση ήταν η απόδειξη ότι το λευκοτριένιο B4 δεσμεύεται σε PPARα και προκαλεί τη μεταγραφή των γονιδίων που συμμετέχουν σε ω- και β-οξείδωση η οποία οδηγεί στην επαγωγή του καταβολισμού του (35).

Ο PPARα εκφράζεται στα διαφοροποιημένα μακρόφαγα του ανθρώπου. Ο PPARα ρυθμίζει τη φυσιολογία των μονοκυττάρων/μακρόφαγων, καθώς επίσης και την απάντησή τους στα φλεγμονώδη ερεθίσματα μέσα στον αρτηριακό τοίχωμα (36). Παραδείγματος χάριν, η ενεργοποίηση του PPARα εμποδίζει την έκφραση της επαγωγικής συνθάσης του νιτρικού οξειδίου και την παραγωγή του παράγοντα ιστού, MMP-9 και TNFα στα μακρόφαγα. Επίσης, PPARα εκφράζεται στα CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> T- κύτταρα όπου προσδέτες εμποδίζουν την παραγωγή IL-2 και τον πολλαπλασιασμό TH1 κυττάρων. Ο PPARα έχει μια ρυθμιστική επίδραση στην ανάπτυξη των B-

κυττάρων στο μυελό των οστών στα ποντίκια (13). Τέλος, η παρεμπόδιση της σύνθεσης των προ-φλεγμονωδών μορίων όπως IL-6 και προσταγλαδίνες από ενεργοποιημένα κύτταρα λείων μυών εμφανίζεται να συμμετέχει στον έλεγχο της φλεγμονής με μεσολαβητή τον PPARα, μέσω μειωμένης δραστηριότητας του NF-κΒ, το οποίο ρυθμίζει την παραγωγή κυτοκινών (14).

### **1.3.5 Πιθανή συμμετοχή του PPARα στην ανάπτυξη NAFL**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο PPARα είναι ένας ηπατικός υποδοχέας που ρυθμίζει τα τρία μονοπάτια της οξειδωσης λιπαρών οξέων στο επίπεδο της μεταγραφής. Αυτές οι πληροφορίες μας οδήγησαν να υποθέσουμε ότι η έλλειψη ή η χαμηλή έκφραση του PPARα στο ήπαρ θα εξασθενίσει το μεταβολισμό των λιπιδίων και θα έχει ως συνέπεια τη συσσώρευση των λιπιδίων που υποκινεί τελικά τις φλεγμονώδεις απαντήσεις σε αυτό το όργανο.

## **2. Υλικά και μέθοδοι**

Προκειμένου να εξετάσουμε αν η έλλειψη ή η χαμηλή έκφραση PPARα στο ήπαρ θα εξασθενίσει το μεταβολισμό των λιπιδίων και θα οδηγήσει στη συσσώρευση των λιπιδίων, η οποία υποκινεί τελικά τις φλεγμονώδεις απαντήσεις σε αυτό το όργανο, διεξάγαμε μια συγκριτική μελέτη μεταξύ ενήλικων αρσενικών διαγονιδιακών ποντικών DBA/2 που δεν εκφράζουν PPARα και άγριου τύπου ποντικών που ταίριαζαν στο φύλο και την ηλικία και παρατηρήσαμε την κυτταρική και τους φαινότυπους των κυττάρων του ανοσοποιητικού στο ήπαρ, τη σπλήνα και τον θύμο αδένα.

Συνοψίζοντας, σε αυτό το πείραμα είχαμε 2 ομάδες ζώων:

Ομάδα 1: DBA/2 άγριου τύπου ποντίκια

Ομάδα 2: DBA/2 PPARα διαγονιδιακά ποντίκια

Προκειμένου να εξεταστούν οι διαφορές στη μορφολογία, την κυτταρική, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και την ιστοπαθολογία μεταξύ αυτών των δύο ομάδων ποντικών αφαιρέσαμε το ήπαρ, τη σπλήνα, το θύμο αδένα και το λευκό λίπος.

## **2.1 Αφαίρεση των οργάνων**

Τα ποντίκια θανατώνονταν κάτω από βαθιά αναισθησία με CO<sub>2</sub>. Μια βελόνα εισήχθη στην καρδιά και μέσω των αιμοφόρων αγγείων διαχύσαμε στο ήπαρ 10 ml PBS και το αφαιρέσαμε. Κατόπιν, τα άλλα όργανα (σπλήνα, θύμος αδένας, και άσπρο λίπος) αφαιρέθηκαν. Όλα τα όργανα τοποθετήθηκαν σε PBS και κρατήθηκαν στον πάγο πριν χρησιμοποιηθούν.

## **2.2 Απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από το ήπαρ**

Πριν αρχίζει η διαδικασία της απομόνωσης το ήπαρ ζυγίζεται. Η απομόνωση των ηπατικών λεμφοκυττάρων με τη διαδικασία του μηχανικού τεμαχισμού πραγματοποιήθηκε ως εξής: Το ήπαρ τεμαχίστηκε εκτενώς και περάστηκε σιγά σιγά μέσω μιας ανοξειδωτής σήτας και αιωρήθηκε έπειτα στο μέσο RPMI που περιείχε εμβρυϊκό ορό μόσχων (fetal calf serum, FCS) (9,10). Το αιώρημα αυτό των κυττάρων υποβλήθηκε σε φυγοκέντριση στα 1500 r/min για 10 λεπτά. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα Percoll 35% που περιείχε ηπαρίνη και έπειτα υποβλήθηκε σε φυγοκέντριση στα 2600 r/min για 50 λεπτά. Το υπερκείμενο υποβλήθηκε σε φυγοκέντριση πάλι σε 2600 r/min για 40 λεπτά και το ίζημα που κρατήθηκε στον πάγο. Μετά από αυτήν την φυγοκέντριση, 3 διαφορετικές φάσεις εμφανίζονται. Η ανώτερη φάση περιείχε τα ηπατοκύτταρα, τα οποία απομονώνονται και φυλάσσονται σε περίπτωση που συμβεί κάποιο λάθος. Το ίζημα κρατήθηκε στον πάγο, και το υπερκείμενο συμπληρώθηκε με PBS μέχρι τα 45 ml και υποβλήθηκε μια ακόμα φορά σε φυγοκέντριση στα 1500 r/min για 20 λεπτά. Μετά από αυτόν, το ίζημα κράτηθηκε στον πάγο. Τέλος, τα τρία ιζήματα προστέθηκαν σε ένα και 4 ml διαλύματος λύσης για τα ερυθροκύτταρα προστέθηκαν για 2 λεπτά. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη μερικών ml FCS στον πάγο του σωλήνα. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1300 r/min για 10 λεπτά και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 700-800 μl διάλυμα FACS (PBS + 1% FCS + 0,1 %NaN<sub>3</sub>).

### **2.3 Απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από τη σπλήνα και το θύμο αδέν**

Οι σπλήνες και οι θύμοι αδένες ζυγίστηκαν και «δουλεύτηκαν» ήπια με τις λαβίδες σε διάλυμα PBS. Το ελαιώδες των κυττάρων φιλτραρίστηκε και έπειτα υποβλήθηκε σε φυγοκέντριση στα 1300 r/min για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 5 ml PBS. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύθηκε στο διάλυμα FACS.

### **2.4 Κυτταρική απόδοση των οργάνων**

Η κυτταρική απόδοση ανά όργανο αξιολογήθηκε με τον άμεσο υπολογισμό κάτω από το μικροσκόπιο. Ειδικότερα, 10 μl των δειγμάτων αναμίχθηκαν με 90 μl χρωστική trypan blue και μεταφέρθηκαν στο μικροσκόπιο.

### **2.5 Προετοιμασία σωλήνων για την ανάλυση FACS**

Συμπληρώσαμε τους σωλήνες με 50 μl κάθε δείγματος και 50 μl του αντισώματος και επώαστηκαν στον πάγο και στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Κατόπιν, οι σωλήνες συμπληρώθηκαν με 400 μl διαλύματος FACS και φυγοκεντρήθηκαν στα 1300 r/min για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 400 μl του διαλύματος FACS.

Για τη κυτταρομετρική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι δείκτες αντισωμάτων:

<b>Liver</b>	<b>Spleen</b>	<b>Thymus</b>
Unstained	Unstained	Unstained
CD19	CD19	NK
NK	NK	CD11b
CD11b	CD11b	CD3
CD3/CD4	NK/CD4	NK/CD4
NK/CD4	Gr1/CD11b	Gr1/CD11b
Gr1/CD11b	CD4/CD8	CD44
Thy1/Sca1		CD4/CD8
CD45		
CD3/CD4		

Πίνακας 2: Δείκτες αντισωμάτων

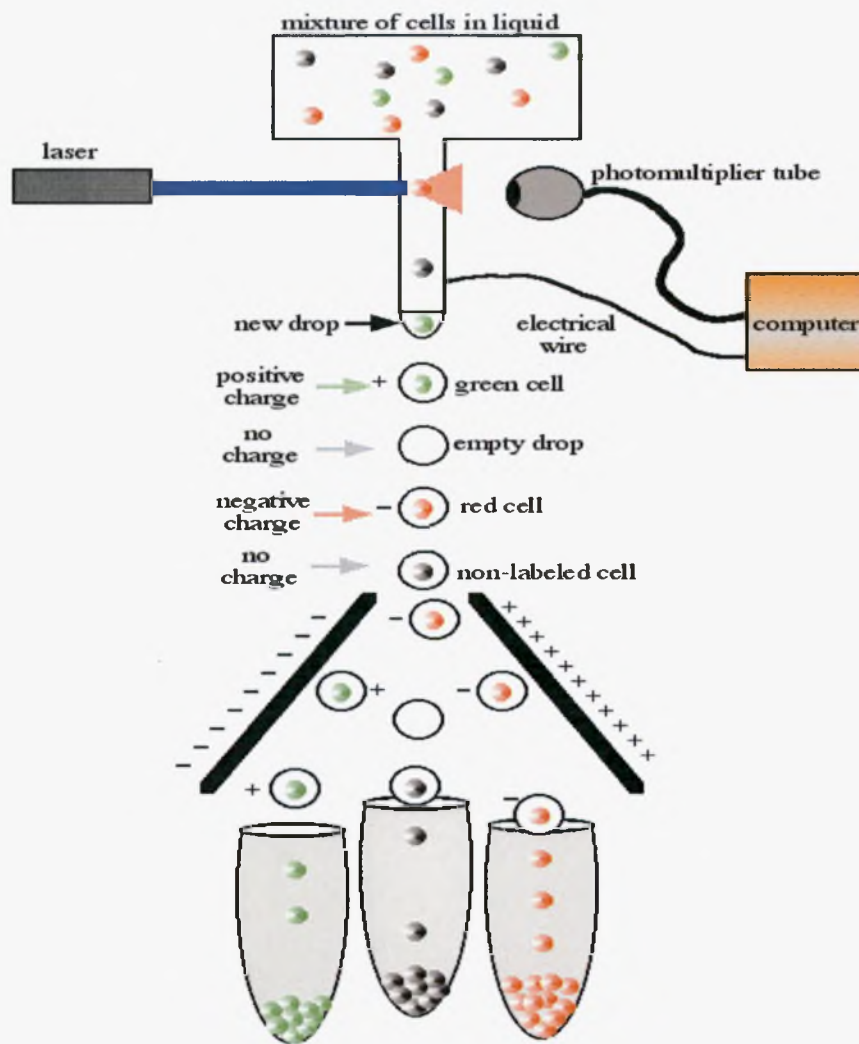


## 2.6 Ανάλυση FACS

Ο φθορισμο-ενεργοποιούμενος διαχωρισμός κυττάρων (FACS) είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τη μέτρηση και ανάλυση μορίων της επιφάνειας κυττάρων που επιπλέουν σε διάλυμα κοντά σε μια ακτίνα φωτός η οποία ανιχνεύει τους φθορισμούς των κυττάρων. Η ανάλυση FACS μπορεί να εφαρμοστεί για να καθορίσει την ανοσολογική σκιαγράφηση των διάφορων στελεχών ποντικών όπως αμιγή και ανοσοκατεσταλμένα στελέχη με τη χρησιμοποίηση αντισωμάτων συγκεκριμένων για τα λευκοκύτταρα και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού.

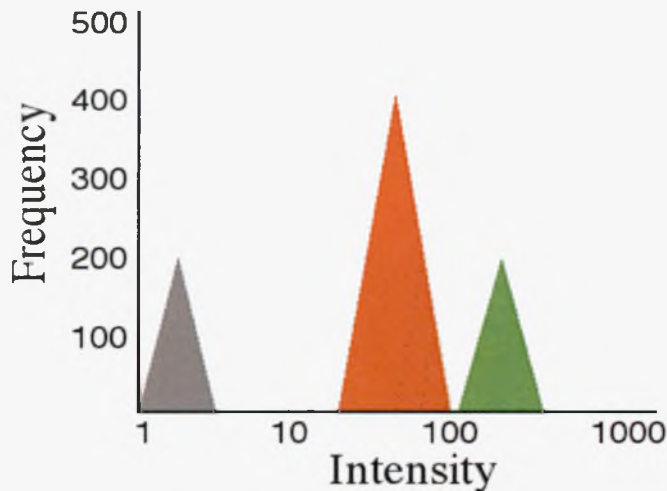
Η διαδικασία αρχίζει με την τοποθέτηση των κυττάρων σε μια φιάλη και τον καταναγκασμό τους να εισέλθουν σε ένα μικρό ακροφύσιο ένα κάθε φορά (σχήμα 7). Τα κύτταρα περνάν κάτω από το ακροφύσιο, το οποίο δονείται σε μια βέλτιστη συχνότητα για να παραγάγει σταγόνες σε σταθερή απόσταση από το ακροφύσιο. Καθώς τα κύτταρα ρέουν με το ρεύμα του διαλύματος, ανιχνεύονται από ένα λέιζερ (μπλε φως στο σχήμα 7). Μέρος από το φως του λέιζερ είναι σκεδάζετε (κόκκινος κώνος που προέρχεται από το κόκκινο κύτταρο) από τα κύτταρα και αυτό χρησιμοποιείται για να μετρήσει τα κύτταρα. Αυτό το σκεδασμένο φως μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να μετρηθεί το μέγεθος των κυττάρων. Εάν θέλουμε να διαχωρίσουμε έναν υποπληθυσμό κυττάρων, θα μπορούσαμε να το κάνουμε με μαρκάρισμα εκείνων των κυττάρων που μας ενδιαφέρουν με ένα αντίσωμα που συνδέεται με μια χρωστική ουσία που φθορίζει. Το αντίσωμα είναι συνδεδεμένο σε μια πρωτεΐνη που εκφράζεται μεμονωμένα στα κύτταρα που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Το φως του λέιζερ διεγείρει τη χρωστική ουσία που εκπέμπει ένα χρώμα του φωτός που ανιχνεύεται από το σωλήνα φωτοπολλαπλασιαστή, ή τον ανιχνευτή φωτός. Με τη συλλογή των πληροφοριών από το φως (διασπορά και φθορισμός) ένας υπολογιστής μπορεί να καθορίσει ποια κύτταρα πρόκειται να διαχωριστούν και να συλλεχθούν.





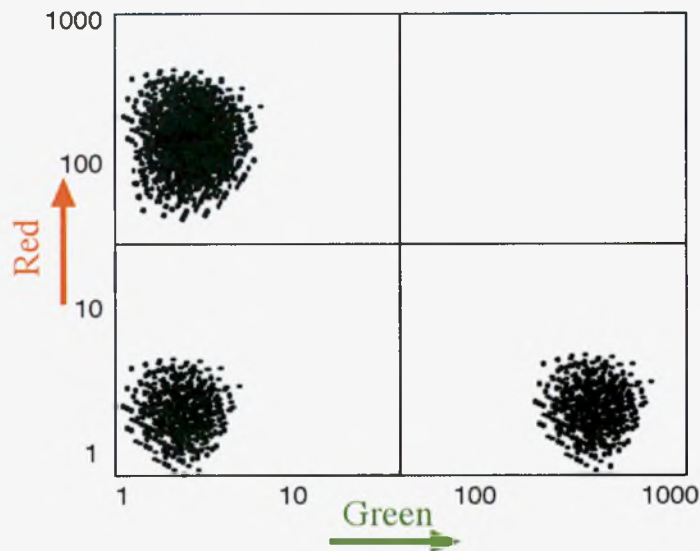
*Σχήμα 7: Διάγραμμα της συσκευής FACS. Τα κύτταρα έχουν σημειωθεί με φθορίζοντα είτε κόκκινα είτε πράσινα αντισώματα, μερικά κύτταρα δεν εκφράζουν το επίτοπο και επομένως δεν είναι σημασμένα με κανένα φθορίζον .*

Τα δεδομένα από την ανάλυση FACS που συλλέγονται από τον υπολογιστή μπορούν να επιδειχθούν με δύο διαφορετικούς τρόπους. Αυτό θέλουμε να ξέρουμε είναι πόσα κύτταρα κάθε χρώματος ταξινομήθηκαν. Στο πρώτο παράδειγμα (σχήμα 8), βλέπουμε την ένταση του πράσινου ή κόκκινου φθορισμού στον Χ-άξονα και τον αριθμό των κυττάρων σε κάθε επίπεδο φθορισμού στον Υ-άξονα. Σε αυτό το παράδειγμα, υπήρξαν διπλάσια κόκκινα κύτταρα που ταξινομήθηκαν σε σχέση με τα πράσινα ή αμαρκάριστα κύτταρα, αλλά το επίπεδο φωτός ήταν μεγαλύτερο από τα πράσινα κύτταρα σε σχέση με τα κόκκινα κύτταρα. Αυτή η μέθοδος είναι καλύτερη εάν όλα τα κύτταρα είναι πράσινα, κόκκινα ή αμαρκάριστα και κανένα κύτταρο δεν χρωματίζεται και με τα δύο χρώματα.



*Σχήμα 8: Ποσοτικοποίηση των δεδομένων FACS. Αυτή η γραφική παράσταση παρουσιάζει τον αριθμό κυττάρων (X-άξονας) και το επίπεδο φθορισμού που εκπέμπεται (Y-άξονας) από τα σημασμένα κύτταρα. Πολλά διαφορετικά χρώματα μπορούν να σχεδιαστούν σε αυτήν την γραφική παράσταση, αλλά τα κύτταρα δεν πρέπει να σημειωθούν με περισσότερα από ένα χρώματα.*

Στο σχήμα 9, βλέπουμε έναν διαφορετικό τρόπο να παρουσιάσουμε τα ίδια στοιχεία. Ο X-άξονας αναφέρεται στην ένταση του πράσινου φθορισμού ενώ ο Y-άξονας στην ένταση του κόκκινου φθορισμού. Τα μεμονωμένα μαύρα σημεία αντιπροσωπεύουν τα μεμονωμένα κύτταρα και δεν χρειάζεται να μετρήσουμε τα σημεία αυτά αλλά απλά εξετάζουμε τη σχετική πυκνότητα των σημείων σε κάθε τεταρτημόριο. Από αυτήν την γραφική παράσταση, μπορούμε να δούμε ότι δεν υπάρχει κανένα κύτταρο σημασμένο και κόκκινο και πράσινο (πάνω δεξιά) και πολλά κύτταρα που ήταν αμαρκάριστα (κάτω αριστερά). Ο αριθμός των σημασμένων με πράσινο κυττάρων (κάτω δεξιά) είναι σχεδόν ίδιος όπως τον αριθμό μη σημασμένων κυττάρων, αλλά ο αριθμός των σημασμένων με κόκκινο κυττάρων (πάνω αριστερά) είναι διπλάσιος των άλλων δύο κατηγοριών κυττάρων. Πάλι, μπορούμε να δούμε ότι το επίπεδο φθορισμού ήταν πιο υψηλό στα πράσινα κύτταρα από τα κόκκινα. Αυτή η μέθοδος παρουσίασης των δεδομένων είναι ιδιαίτερα χρήσιμη εάν τα κύτταρα που είναι παρόντα ότι έχουν σημειωθεί και με κόκκινο και με πράσινο (28).



*Σχήμα 9: Ποσοτικοποίηση των δεδομένων FACS. Αυτή η γραφική παράσταση συγκρίνει τον αριθμό κυττάρων που σημαίνονται από δύο χρώματα - κόκκινο (Y-άξονας) και πράσινο (X-άξονας). Η ένταση του εκπεμπόμενου φωτός αυξάνεται όπως υποδεικνύεται από τα βέλη. Ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε ένταση παρουσιάζεται από τον αριθμό σημείων, όπου κάθε σημείο αντιπροσωπεύει ένα μονό κύτταρο. Αυτή η γραφική παράσταση δεν λειτουργεί για περισσότερα από δύο χρώματα αλλά λειτουργεί καλά όταν μπορούν τα μεμονωμένα κύτταρα να σημανθούν και από τα δύο χρώματα συγχρόνως.*

## 2.7 Στατιστική ανάλυση

Τα στοιχεία εκφράστηκαν με  $\text{mean} \pm \text{SD}$ . Στατιστική ανάλυση εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας το  $t$  test. Η διαφορά μεταξύ των ομάδων θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική όταν το  $P$  value ήταν λιγότερο από 0,05 (10).

## 2.8 Δοκιμή ιστοπαθολογίας του ήπατος

Προκειμένου να εξεταστεί η ιστοπαθολογία του ήπατος αφαιρέσαμε μικρά κομμάτια του ιστού από PPAR $\alpha$  διαγονιδιακά ποντίκια και από τα αντίστοιχα άγριου τύπου. Μετά από την αφαίρεση τα δείγματα στάλθηκαν στο ίδρυμα Karolinska στο τμήμα ογκολογίας - παθολογίας. Αυτά τα δείγματα προετοιμάστηκαν από τη Margareta Rodensjö.

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Διαφορές στο σωματικό βάρος μεταξύ των PPARα διαγονιδιακών και άγριου τύπου ποντικών

Ο πρώτος πίνακας παρουσιάζει συνολικά σωματικά βάρη του άγριου τύπου και των PPARα-null διαγονιδιακών ποντικών μετά από την ανάλυση στατιστικής. Τα διαγονιδιακά ποντίκια εμφάνισαν μια μέτρια αύξηση στο σωματικό βάρος έναντι του άγριου τύπου.

	Wild type	Knock out
Body weight	29.04 ( $\pm$ 0.68)	33.15 ( $\pm$ 1.83) P=0.12

*Πίνακας 3: Βάρος σώματος*

#### 3.2 Διαφορές στα βάρη των οργάνων μεταξύ των PPARα-null διαγονιδιακών και άγριου τύπου ποντικών

Σε κάθε πείραμα, τα όργανα ζυγίστηκαν προκειμένου να εξεταστεί η μορφολογία τους. Διαφορετικό βάρος από τα κανονικά επίπεδα είναι μια πρώτη ένδειξη των διαταραχών σε αυτά τα όργανα. Παρατηρήσαμε ότι τα knock out ποντίκια είχαν μια αύξηση στο βάρος του ήπατος και της σπλήνας έναντι των άγριου τύπου ποντικών. Εντούτοις, καμία διαφορά δεν εμφανίστηκε στο βάρος του θύμου αδένου. Τέλος, η ποσότητα του επιδιδυμικού λίπους αυξήθηκε αρκετά στα διαγονιδιακά ποντίκια. Ο ακόλουθος πίνακας παρουσιάζει αυτά τα στοιχεία μετά από στατιστική ανάλυση:

	Wild type	Knock out
Liver	1.598( $\pm$ 0.04)	1.997( $\pm$ 0.12)* P=0.05
Spleen	0.065( $\pm$ 0)	0.081( $\pm$ 0)* P=0.05
Thymus	0.025( $\pm$ 0)	0.027( $\pm$ 0) P=0.5
White fat	0.346( $\pm$ 0.05)	0.799( $\pm$ 0.22) P=0.12

*Πίνακας 4: Βάρη οργάνων*

### 3.3 Κυτταρική των οργάνων

Η κυτταρική είναι ένας διαφορετικός παράγοντας, ο οποίος δείχνει το λειτουργική και μορφολογική κατάσταση των οργάνων. Ανάλυση των ενδοηπατικών κυττάρων του ανοσοποιητικού και των σπληνοκυττάρων αποκάλυψε ότι ο συνολικός αριθμός κυττάρων σε αυτά τα όργανα αυξήθηκε εντυπωσιακά σε PPAR $\alpha$ -null ποντίκια συγκριτικά με τα άγριου τύπου ποντίκια.

	<b>Wild type</b> (x 10 <sup>6</sup> )	<b>Knock out</b> (x 10 <sup>6</sup> )
<b>Liver</b>	7.66(±1.33)	13.66(±0.66)* P=0.04
<b>Liver per gr</b>	4.66(±0.88)	6.66(±0.33) P=0.07
<b>Spleen</b>	46(±9.29)	62(±9.07) P=0.27
<b>Thymus</b>	29.66(±3.75)	24.33(±6.48) P=0.5

*Πίνακας 5: Κυτταρική των κυττάρων του ανοσοποιητικού στα όργανα.*

### 3.4 Στατιστική ανάλυση στα αποτελέσματα της ανάλυσης FACS στα κύτταρα του ανοσοποιητικού στο ήπαρ

Η σημαντικότερη παράμετρος για να ελέγξει κανείς εάν η φλεγμονώδης απόκριση υπάρχει σε αυτά τα όργανα είναι να αναλυθεί ο τύπος των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και να μετρηθεί ο πληθυσμός κάθε τύπου κυττάρου. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε προκειμένου να επιτύχουμε αυτόν τον σκοπό ήταν ανάλυση FACS. Ο ακόλουθος πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης από τα αποτελέσματα της μεθόδου FACS στα ενδοηπατικά κύτταρα του ανοσοποιητικού. Τα περισσότερα από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στο ήπαρ αυξήθηκαν στα knock out ποντίκια σε σύγκριση με αντίστοιχα άγριου τύπου.

	<b>Wild type</b>	<b>Knock out</b>
<b>Total immune cells</b> (x 10 <sup>6</sup> )	7.66(±1.33)	13.66(±0.66)* P=0.04
<b>Cells of innate immune response</b>		
<b>Natural killer cells</b>	0.93(± 0.06)	2.33(±0.33) * P=0.04
<b>Macrophages</b>	1(±0.28)	2(±0)* P=0.03
<b>Natural killer T cells</b>	0.36(±0.08)	0.93(±0.06)* P=0.04
<b>Activated neutrophils</b>	0.5(±0.05)	1(±0)* P=0.03
<b>Cells of immune adaptive response</b>		
<b>B lymphocytes</b>	2(±0.57)	3(±0) P=0.12
<b>T helper cells</b>	1.5(±0.28)	3.5(±0.76)* P=0.04
<b>T cytotoxic cells</b>	0.76(±0.14)	1.6(±0.20)* P=0.05
<b>Thymocytes/Granulocytes</b>	2(±0.57)	4(±0)* P=0.03

*Πίνακας 6: Κυτταρικότητα των ενδοηπατικών κυττάρων του ανοσοποιητικού*

### **3.5 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεθόδου FACS στον αριθμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού ανά gr ήπατος**

Επειδή το ήπαρ είναι ένα από τα μεγαλύτερα όργανα στο σώμα υπολογίσαμε τον αριθμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού ανά γραμμάριο ήπατος. Αυτό μας βοήθησε να εξετάσουμε εάν τα αποτελέσματά μας ήταν αντικειμενικά.



	<b>Wild type</b>	<b>Knock out</b>
<b>Total immune cells</b> (x10 <sup>6</sup> )	4.66(±0.88)	6.66(±0.33) P=0.07
<b>Cells of the innate immune response</b>		
<b>Natural killer cells</b>	0.7(±0.11)	1(±0)* P=0.03
<b>Macrophages</b>	0.66(±0.20)	1(±0) P=0.12
<b>Natural killer T cells</b>	0.26(±0.08)	0.4(±0) P=0.12
<b>Activated neutrophils</b>	0.3(±0.05)	0.56(±0.03)* P=0.04
<b>Cells of the adaptive immune cells</b>		
<b>B lymphocytes</b>	1.2(±0.41)	1.5(±0.28) P=0.5
<b>T helper cells</b>	0.86(±0.13)	1.53(±0.24)* P=0.04
<b>T cytotoxic cells</b>	0.43(±0.06)	0.73(±0.06)* P=0.04
<b>Thymocytes/Granulocytes</b>	1.1(±0.26)	2(±0)* P=0.03

*Πίνακας 7: Κυτταρική των ενδοηπατικών κυττάρων του ανοσοποιητικού ανά gr ήπατος*

### **3.6 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης FACS στον αριθμό των κυττάρων της σπλήνας**

Ο ακόλουθος πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης από την ανάλυση FACS στα κύτταρα της σπλήνας. Ο αριθμός σχεδόν όλων των ανοσοποιητικών κυττάρων αυξήθηκε σε PPARα διαγονιδιακών ποντίκων σε σχέση με των άγριου τύπου ποντικών.

	<b>Wild type</b>	<b>Knock out</b>
<b>Total immune cells</b> (x 10 <sup>6</sup> )	46(±9.29)	62(±9.07) P=0.27
<b>Cells of the innate immune response</b>		
<b>Natural killer cells</b>	3(±0.57)	5(±0.57) P=0.07
<b>Macrophages</b>	5.66(±0.88)	8.33(±1.85) P=0.26
<b>Natural killer T cells</b>	1.36(±0.18)	2(±0.28) P=0.18
<b>Activated neutrophils</b>	1.5(±0.5)	2.66(±0.88) P=0.26
<b>Cells of the adaptive immune response</b>		
<b>B lymphocytes</b>	21.33(±5.92)	28.33(±5.69) P=0.27
<b>T helper cells</b>	9.33(±1.66)	13.66(±0.88)* P=0.04
<b>T cytotoxic cells</b>	4.83(±0.72)	6.33(±0.88) P=0.26

*Πίνακας 8: Κυτταρικότητα των ανοσοποιητικών κυττάρων της σπλήνας*

### **3.7 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων από την μέθοδο FACS στον αριθμό των κυττάρων του θύμου αδένος**

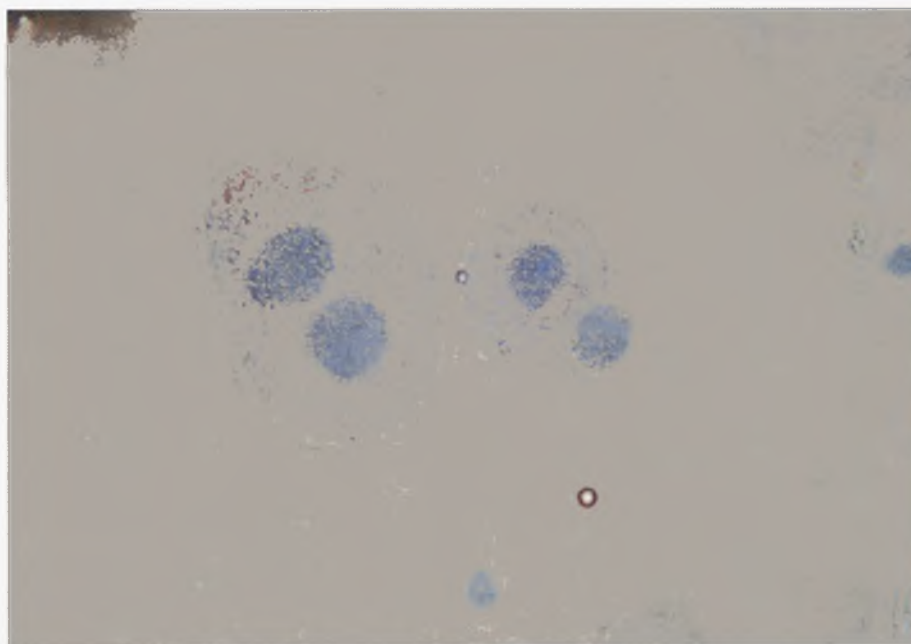
Ο τελευταίος πίνακας παρουσιάζει τις διαφορές στον αριθμό ανοσοποιητικών κυττάρων στο θύμο αδένος μεταξύ των knock out και των άγριου τύπου ποντικών. Παρατηρήσαμε ότι ο αριθμός κυττάρων στο θύμο αδένος δεν είχε ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ των δύο τύπων ποντικών.

	<b>Wild type</b>	<b>Knock out</b>
<b>Total immune cells</b> (x 10 <sup>6</sup> )	29.66(±3.75)	24.33(±6.48) P=0.5
<b>Cells of the innate immune response</b>		
<b>Natural killer cells</b>	0.3(±0.05)	0.26(±0.09) P=0.82
<b>Macrophages</b>	0.43(±0.03)	0.33(±0.06) P=0.19
<b>Natural killer T cells</b>	0.2(±0.05)	0.15(±0.04) P=0.48
<b>Activated neutrophils</b>	0.18(±0.07)	0.07(±0.02) P=0.27
<b>Cells of the adaptive immune response</b>		
<b>T helper cells</b>	3.16(±0.60)	2.33(±0.66) P=0.26
<b>T cytotoxic cells</b>	1.03(±0.26)	0.7(±0.20) P=0.37

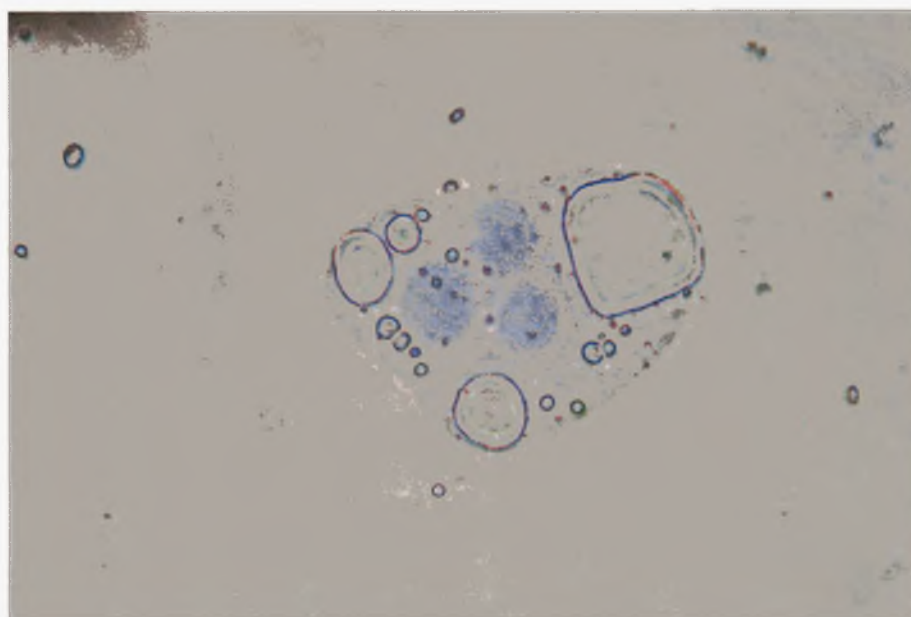
*Πίνακας 9: Κοτταρικότητα των κυττάρων του ανοσοποιητικού στο θύμο αδένα.*

### **3.8 Μικροσκοπική ανάλυση των ηπατοκυττάρων**

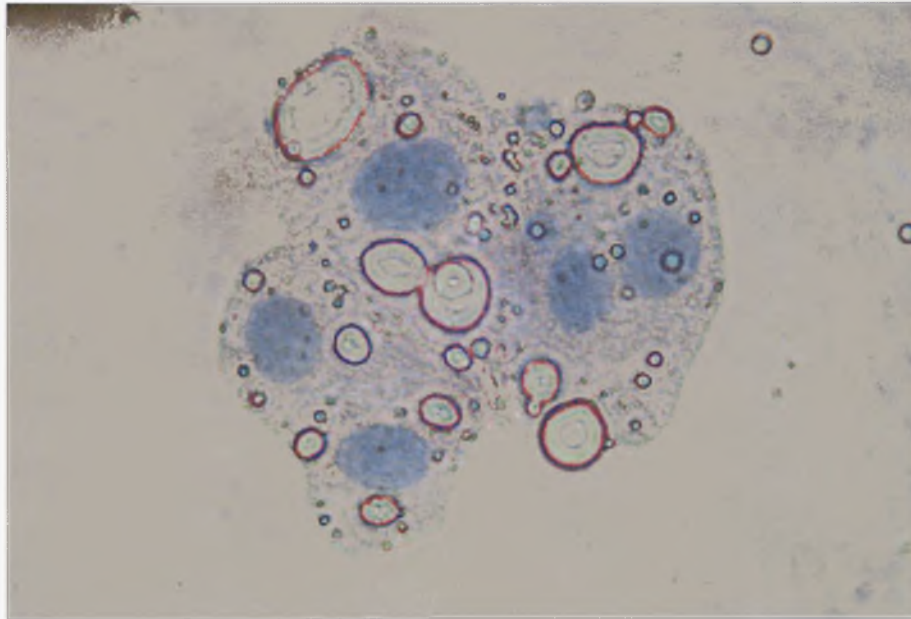
Οι ακόλουθες εικόνες παρουσιάζουν τη συσσώρευση του λίπους μέσα στα ηπατοκύτταρα των PPARα διαγονιδιακών ποντίκων. Το λίπος σχηματίζει μικρά και μεγάλα σταγονίδια στον κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων. Αυτά τα σταγονίδια δεν είναι παρόντα στα ηπατοκύτταρα των άγριου τύπου ποντικών. Όλα τα κύτταρα έχουν σταθεροποιηθεί με trypan blue.



Σχήμα 10: Ηπατοκύτταρα άγριου τύπου ποντικών σταθεροποιημένα με trypan blue



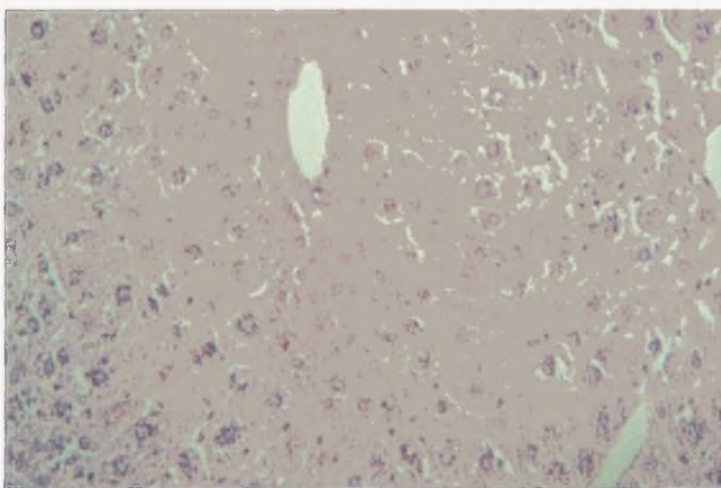
Σχήμα 11: Ηπατοκύτταρα από PPARα-null ποντίκι σταθεροποιημένο με trypan blue



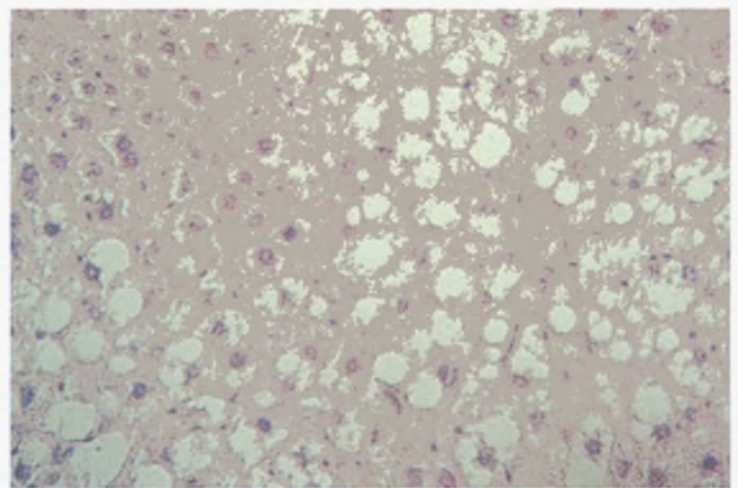
*Σχήμα 12: Ηπατοκύτταρα από PPARα-null ποντίκι σταθεροποιημένα με trypan blue*

### **3.9 Ιστοπαθολογική ανάλυση του ήπατος**

Τέλος, οι ακόλουθες εικόνες παρουσιάζουν τομές ήπατος PPARα διαγονιδιακών ποντίκων και των άγριου τύπου αντίστοιχων σε φύλο και ηλικία. Το λίπος συσσωρεύεται στον ιστό του ήπατος των PPARα ποντικών. Αυτή είναι η αιτία για το κιτρινωπό χρώμα στο ήπαρ με NAFLD. Οι τομές σταθεροποιήθηκαν με H&E.



*Σχήμα 13: Άγριου τύπου DBA2 ποντίκια*



*Σχήμα14: PPARα knock out DBA2 ποντίκια*



## 4. Συζήτηση

Όπως αναμενόταν, η έλλειψη ή η χαμηλή έκφραση των πυρηνικών υποδοχέων PPAR $\alpha$  οδήγησε σε ένα διαφορετικό τύπο μεταβολισμού των λιπαρών οξέων στα ενήλικα διαγονιδιακά ποντίκια DBA/2. Αυτά τα ποντίκια είχαν μια αύξηση στο συνολικό σωματικό βάρος τους έναντι των άγριου τύπου αντίστοιχων τους σε φύλο και ηλικία (πίνακας 3). Η αύξηση οφείλεται στην αποθήκευση του επιδιδυμικού λίπους. Λόγω της ανικανότητας του ήπατος να μεταβολίσει τα λιπαρά οξέα, το λίπος συσσωρεύεται στο σώμα γρηγορότερα από ότι συσσωρεύεται στα άγριου τύπου ποντίκια.

Παρατηρήσαμε ότι στα knock out ποντίκια αυξήθηκε το βάρος του ήπατος και της σπλήνας σε σχέση με τα άγριου τύπου ποντίκια. Εντούτοις, καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στο βάρος του θύμου αδένου (πίνακας 4). Επιπλέον, η ποσότητα του επιδιδυμικού λίπους αυξήθηκε στα knock out ποντίκια. Τα knock out ποντίκια είχαν το διπλάσιο λίπος συγκριτικά με τα άγριου τύπου. Το λίπος συσσωρεύεται στο ήπαρ όταν το ποσοστό εισόδου των λιπαρών οξέων στα ηπατοκύτταρα υπερβαίνει τη μεταβολική ικανότητα για την επεξεργασία τους. Υπάρχουν δύο σημαντικά μονοπάτια για την αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων, η μιτοχονδριακή  $\beta$ -οξειδωση και η έκκριση στο αίμα ως τριγλυκερίδια. Η έλλειψη ή η χαμηλή έκφραση του PPAR $\alpha$  είναι μια από τις διαταραχές, η οποία καταλήγει στη συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ. Η συσσώρευση των λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα επισημάνθηκε μετά από τη μικροσκοπική ανάλυση, η οποία αποκάλυψε μικρά και μεγάλα σταγονίδια λίπους στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων (σχήματα 11,12). Αυτά τα σταγονίδια δεν είναι παρόντα στα ηπατοκύτταρα των κυττάρων άγριου τύπου (σχήμα 10). Όπως οι τομές στα σχήματα 13,14 παρουσιάζουν η συσσώρευση του λίπους είναι παρούσα σε ολόκληρο τον ιστό του ήπατος στα PPAR $\alpha$  διαγονιδιακά ποντίκια αντίθετα προς τα άγριου τύπου. Αυτά τα στοιχεία είναι πιθανώς υπεύθυνα για την αύξηση στην απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος σε αυτά τα ζώα.

Εκτός από το ήπαρ, το βάρος της σπλήνας είχε μια αύξηση στα PPAR $\alpha$  knock out ποντίκια. Αυτή σπληνομεγαλία μια ένδειξη της φλεγμονώδους απόκρισης. Ένα ακόμα σημάδι ότι η συσσώρευση λιπιδίων ενεργοποιεί τη φλεγμονώδη απάντηση είναι η αύξηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων στο ήπαρ και τη σπλήνα

(πίνακας 5). Σε αυτά τα όργανα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αυξήθηκαν εντυπωσιακά στα PPAR $\alpha$ -null ποντίκια συγκριτικά με τα άγριου τύπου. Ειδικότερα, οι αριθμοί ενδοηπατικών ανοσοποιητικών κυττάρων και σπληνοκυττάρων αυξήθηκαν κατά > 195% και για > 125%, αντίστοιχα.

Όσον αφορά τα ενδοηπατικά κύτταρα του ανοσοποιητικού η ανάλυση FACS αποκαλύπτει μια σημαντική αύξηση και στον πληθυσμό των κυττάρων της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης, όπως τα μακρόφαγα, τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα, τα φυσικά κυτταροκτόνα T κύτταρα και τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, είτε στον πληθυσμό των κυττάρων της ειδικής ανοσίας, όπως τα B-λεμφοκύτταρα, τα T-βοηθητικά κύτταρα και τα T-κυτταροτοξικά κύτταρα (πίνακες 6,7). Το ίδιο πρότυπο εμφανίζεται στην ανάλυση των ανοσοποιητικών κυττάρων της σπλήνας. Στη σπλήνα όλοι οι πληθυσμοί των κυττάρων αυξήθηκαν, όπως τα μακρόφαγα, τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα και τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, τα οποία είναι κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας. Επιπλέον, τα B-λεμφοκύτταρα, τα T-βοηθητικά κύτταρα και τα T-κυτταροτοξικά αυξήθηκαν, τα οποία είναι κύτταρα της ειδικής ανοσίας (πίνακας 8). Ειδικότερα, η σημαντική αύξηση στον πληθυσμό των T-βοηθητικών κυττάρων στη σπλήνα είναι ένδειξη ενός τύπου φλεγμονώδους απάντησης. Αφ' ετέρου, καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των πληθυσμών των ανοσοποιητικών κυττάρων στο θύμο αδένα μεταξύ PPAR $\alpha$ -null και άγριου τύπου ποντίκια (πίνακας 9). Ο θύμος αδένας είναι ένα πρωτογενές όργανο του ανοσοποιητικού συστήματος όπου η ωρίμανση και η ανάπτυξη των T-κυττάρων πραγματοποιείται. Πιθανώς, αυτό το όργανο δεν επηρεάζεται από αυτού του τύπου φλεγμονής στο ήπαρ.

Ωστόσο, πρέπει να αναφέρουμε ότι τα διαγονιδιακά ποντίκια συμπεριφέρονταν όπως τα άγριου τύπου χωρίς ανωμαλίες στην ανάπτυξή τους. Η φυσιολογία και η κατανάλωση τροφής τους ήταν κανονικές.

Αυτά τα αποτελέσματα σαφώς δείχνουν ότι με την αύξηση της ηλικίας τα DBA/2 PPAR $\alpha$ -null ποντίκια αναπτύσσουν έναν τύπο φλεγμονής στο ήπαρ που προκαλείται από τη συσσώρευση των λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα. Η χρόνια φλεγμονή μπορεί στη συνέχεια να οδηγήσει στην ανάπτυξη της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος (NAFLD). Τέλος, ο ρόλος του PPAR $\alpha$  στην ανάπτυξη της ασθένειας NAFL είναι σημαντικός λόγω της συμμετοχής του στον καταβολισμό των ξενοβιοτικών, όπως οι

πολλαπλασιαστές υπεροξεισωμάτων, αυτά τα ποντίκια εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην επίδραση των πολλαπλασιαστών υπεροξεισωματίων.

## 5. Συμπέρασμα και μελλοντικές προοπτικές

Συνοψίζοντας, η έλλειψη ή η χαμηλή έκφραση του υποδοχέα PPAR $\alpha$  στο ήπαρ οδηγεί στην εξασθένιση του μεταβολισμού λιπιδίων, η οποία από τους έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση σταγονιδίων λίπους στα ηπατοκύτταρα. Η συσσώρευση των λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα υποκινεί τη φλεγμονώδη απόκριση στο ήπαρ. Η χρόνια φλεγμονή μπορεί στη συνέχεια να οδηγήσει στην ανάπτυξη NAFLD. Επιπλέον, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα PPAR $\alpha$  knock out ποντίκια μπορούν να υιοθετηθούν ως νέο πειραματικό μοντέλο για να μελετηθεί η παθογένεση της NAFLD.

Επιπλέον μελέτες είναι απαραίτητες για να καθορίσουν τη φυσιολογία του ήπατος ενήλικων PPAR $\alpha$ -null ποντικών και τη λειτουργία των ηπατικών κυττάρων του ανοσοποιητικού σε αυτό το μοντέλο. Επιπλέον, θα μπορούσε να παρατηρηθεί ο ρόλος του γένους στην ανάπτυξη NAFL σε αυτό το μοντέλο. Και τελικά, ο ρόλος των περιβαλλοντικών παραγόντων όπως μολυσματικοί παράγοντες και τοξίνες στην ανάπτυξη NAFL.

## 6. Ευχαριστίες

Τέλος, θέλω να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους ανθρώπους που, με διαφορετικό τρόπο ο καθένας, με βοήθησαν κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης.

Τον καθηγητή Joseph DePierre, που μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ σε αυτό το πρόγραμμα και για την υποστήριξη του κατά τη διάρκεια της εργασίας μου.

Τους καθηγητές Buck D. Nelson και Stefan Nobel που έδειξαν ενδιαφέρον για την εργασία μου και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Τον καθηγητή Δημήτρη Κουρέτα, που μου έδωσε την ευκαιρία να ταξιδέψω στη Σουηδία και να δουλέψω στο πανεπιστήμιο της Στοκχόλμης και για τη βοήθειά του σε οποιοδήποτε πρόβλημα κατά τη διάρκεια του προγράμματος Erasmus.

Τον επόπτη μου το Dr Manuchehr Abedi-Valugerdi, για τις πολύτιμες συμβουλές του σχετικά με τη μελέτη μου, για την υποστήριξή του κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης, για την προθυμία του να εξηγήσει οποιαδήποτε απορία μου και για τη βοήθεια του ώστε να γραφτεί αυτή η έκθεση δίνοντας μου όλες τις απαραίτητες πληροφορίες.

Τους συνάδελφοί μου Kim Blom και Jose Bernard για τη βοήθειά τους κατά την διάρκεια των πειραμάτων μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Nicolay, τη Μαρία, τη Hedvig και τη Cynthia για τη δημιουργία μιας άριστης ατμόσφαιρας στο εργαστήριο.

## 7.Βιβλιογραφία

1. Wick MJ, Leithauser F, Reimman J. The hepatic immune system. *Crit Rev Immunol* 2002;22:47-103
2. Nahum Méndez-Sánchez, Marco Arrese, Daniel Zamora-Valdés, Misael Uribe. Current concepts in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Liver international* 2007, 423-433
3. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, Janis Kuby. *Immunology*, Fifth edition
4. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*.
5. <http://www-immuno.path.cam.ac.uk>
6. <http://www.angelfire.com/mech/elispot/immune-system-cells.html>
7. <http://bioweb.wku.edu/courses/biol328/Cells.html>
8. <http://bioweb.wku.edu/courses/biol328/organs.html>
9. Pierre L. Goossens, Hélène Jouin, Gilles Marchal, Geneviève Milon. Isolation and flow cytometric analysis of the free lymphomyeloid cells present in murine liver. *Journal of Immunological Methods*, 132 (1990) 137-144
10. Zhong-Jun Dong, Hai-Ming Wei, Rui Sun, Bin Gao, Zhi-Gang Tian. Isolation of the murine hepatic lymphocytes using mechanical dissection for phenotypic and functional analysis of NK1.1<sup>+</sup> cells. *World J Gastroenterol* 2004;10(13):1928-1933
11. Qian Yang, Frank J. Gonzalez. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  regulates B lymphocyte development via an indirect pathway in mice. *Biochemical Pharmacology* 68 (2004) 2143-2150
12. G. Chinetti, J.-C. Fruchart, B. Staels. Peroxisomes proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflammation research* 49 (2000) 497-505
13. Leonardo A. Moraes, Laura Piqueras, David Bishop-Bailey. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics* 110 (2006) 371-385
14. P. Delerive, J.-C. Fruchart, B. Staels. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *Journal of Endocrinology* (2001) 169, 453-459



15. S.D.H. Malnick, M. Beergabel, H. Knobler. Non-alcoholic fatty liver: a common manifestation of a metabolic disorder. *Q J Med* 2003; 96:699-709
16. N. Latryffe, J Vamecq. Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie* (1997) 79, 81-94
17. Janardan K. Reddy. Nonalcoholic Steatosis and Steatohepatitis III. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation, PPAR $\alpha$ , and steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest liver Physiol* 281: G1333-G1339, 2001
18. Leon A. Adams, Paul Angulo, Keith D. Lindor. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 2005; 172(7): 899-905
19. Anna Mae Diehl. Lessons from animal models of NASH. *Hepatology research* 33(2005) 138-144
20. Ionel Copaci, Laurentiu Micu, Mihai Voiculescu. The role of cytokines in non-alcoholic steatohepatitis. A systematic review. *J Gastrointestin liver Dis*, December 2006, vol.15, no.4, 363-373
21. O. Barbier, I. Pidera Torra, Y. Duguay, C. Blanquart, J.-C. Fruchart, C.Glineur, B.Staels. Pleiotropic actions of Peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002;22;717-726
22. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20: 649-688,1999
23. Vito Racanelli, Barbara Reherman. The liver as an Immunological organ. *Hepatology*, vol. 43. No.2, suppl.1, 2006
24. <http://www.llu.edu/llumc/transplant/liver-anatomy.html>
25. <http://www.cincinnatichildrens.org/health/info/liver/anatomy/liver-anatomy.html>
26. <http://medicalcenter.osu.edu/patientcare/healthinformation/otherhealthtopics/LiverBiliaryPancreaticDis4540/theLiverAnatomy>
27. <http://education.yahoo.com/reference/grav/subjects/subject?id=250#p1188>
28. <http://www3.davidson.edu>
29. Qian Yang, Yi Xie, Stefan E.H. Alexson, B. Dean Nelson, Joseph W.DePierre. Involment of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the immunomodulation caused by peroxisome proliferators in mice. *Biochemical Pharmacology* 63 (2002) 1893-1900
30. Del Gaudio A, Boschi L, Del Gaudio GA, Mastrangelo L, Munari D. Liver damage in obese patients. *Obes Surg* 2002;12:802-4
31. Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *Journ Clin Gastroenterol.* 2006 Mar;40 (3):5-10
32. <http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/ppar.htm>
33. Issemann I.,Prince R.A., Tugwood J.D., Green S. The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated byfatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs. *J Mol Endocrinol*, 11 (1)37-47, 1993
34. Qian Yian, Peroxisome proliferator-induced Immunomodulation
35. Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPAR $\alpha$ -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996;384:39-43
36. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  is a negative regulator of macrophage activation. *Nature (London)* 1998;391:79-82



37. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli . Control of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors.1992. Cell 68:879-887
38. Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, Kelly DP. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 91:11012-11016,1994

