



Unit of Biochemical Toxicology
Department of Biochemistry and Biophysics
Arrhenius Laboratories for Natural Sciences
Stockholm University
Sweden

**Μελέτες για την υπερτροφία ήπατος σε ποντίκια
C57Bl6 που εκτίθενται σε PFOA**

Όνομα: Βαϊνά Μαρία

Επόπτες: Joe DePierre & Stefan Nobel

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Joe DePierre

Δημήτριος Κουρέτας

Αντώνιος Κυπάρος

5 Μαρτίου 2007 – 8 Ιουνίου 2007



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

Αριθ. Εισ.: 6178/1
Ημερ. Εισ.: 08-10-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΒΑΙ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087184

Περιεχόμενα

1. Περίληψη	3
2. Εισαγωγή.....	3
2.1 PFOA	3
2.1.1 Τι είναι τα PFOA;	3
2.1.2 Χρήσεις των PFOA	5
2.2 Υπεροξειδώματα.....	6
2.3 Πολλαπλασιαστές υπεροξεισωματίων.....	7
2.4 Peroxisome Proliferator-Activated Receptors.....	8
2.5 Ανατομία ήπατος	12
2.6 Λειτουργίες ήπατος	13
2.7 Αγγεία αίματος στο ήπαρ	14
2.8 Κύτταρα ήπατος.....	15
2.9.1 Ηπατοκύτταρα	15
2.9.2 Κύτταρα Kupffer.....	17
2.9.3 Λεμφοκύτταρα ήπατος	18
2.9.4 Κύτταρα Stellate	20
2.10 Αναγέννηση ήπατος	21
2.11 Στόχοι της μελέτης	23
3. Υλικά και μέθοδοι.....	24
3.1 Χημικές ουσίες.....	24
3.2 Ζώα και μεταχείριση.....	24
3.3 Προετοιμασία τροφής των ζώων.....	25
3.4 Πρωτόκολλο	25
3.5 Προετοιμασία των ομογενοποιημάτων	25
3.6 Μέτρηση του DNA	26
3.7 Μέτρηση των πρωτεϊνών	27
4. Αποτελέσματα.....	28
5. Συζήτηση.....	33
6. Συμπεράσματα	37
7. Ευχαριστίες.....	38
8. Βιβλιογραφία	38

1. Περίληψη

Στις μέρες μας, τα PFOA χρησιμοποιούνται σε πολλές βιομηχανικές και καταναλωτικές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα στην παραγωγή του Teflon[®]. Το PFOA είναι μέλος της υπερ-οικογένειας των πολλαπλασιαστών υπεροξεισωματίων. Μετά από πειράματα που έγιναν σε τρωκτικά, τα πιο εκτενέστερα χαρακτηρισμένα αποτελέσματα των πολλαπλασιαστών υπεροξεισωματίων, είναι η αύξηση στον αριθμό και το μέγεθος των υπεροξεισωματίων, η υπερτροφία του ήπατος, καθώς επίσης και η ρύθμιση του δυναμικού ενέργειας της β-οξειδωσης των λιπαρών οξέων των ηπατικών υπεροξεισωμάτων. Ο σημαντικότερος στόχος της παρούσας μελέτης είναι να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός της υπερτροφίας του ήπατος. Προκειμένου να μελετήσουμε τον μηχανισμό αυτό, ερευνήσαμε την περιεκτικότητα σε DNA, την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και τη μορφολογία του ήπατος κατά τη διάρκεια της υπερτροφίας. Αρσενικά ποντίκια C57 B16 χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, στη μια δόθηκε τροφή που περιείχε 0.001% w/w PFOA και στην ομάδα control δόθηκε με τροφή χωρίς προσθήκη PFOA. Την 1^η, 2^η, 3^η, 5^η και 10^η μέρα του πειράματος τα ζώα θυσιάστηκαν και το ήπαρ αφαιρέθηκε και ζυγίστηκε. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η υπερτροφία ήπατος και η σύνθεση του DNA ξεκινούν την τρίτη ημέρα μετά από την έκθεση σε PFOA και η χρονική πορεία της σύνθεσης DNA η οποία προκλήθηκε από τα PFOA βρέθηκε να συμβαδίζει με τη χρονική πορεία της αύξησης του ηπατικού βάρους. Η παρατήρηση των ηπατικών τομών στο οπτικό μικροσκόπιο έδειξε ότι τα ποντίκια που εκτέθηκαν σε PFOA είχαν διευρυμένα ηπατοκύτταρα, καθόλου γλυκογόνο, κανένα σημάδι απόπτωσης, νέκρωσης ή μίτωσης αλλά περιείχαν έγκλειστα σωματίδια άγνωστης προέλευσης. Αυτή τη στιγμή δεν μπορούμε να απαντήσουμε στο ερώτημα εάν η υπερτροφία εξαρτάται από τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ή πρόκειται απλώς για διευρυμένα κύτταρα με αυξημένη περιεκτικότητα σε DNA.

2. Εισαγωγή

2.1 PFOA

2.1.1 Τι είναι το PFOA;

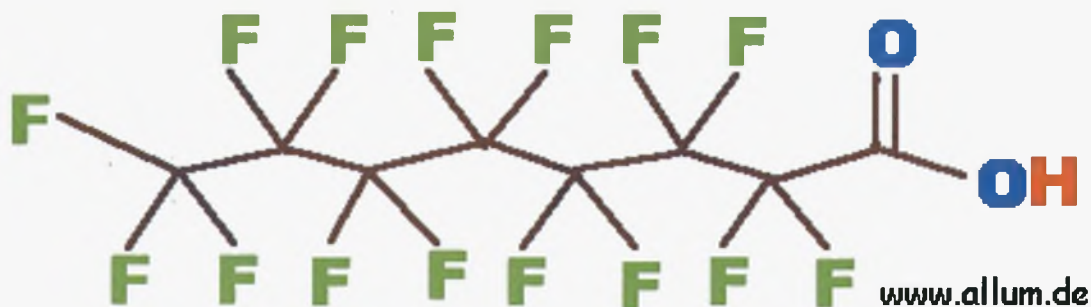
Το υπερφθορο-οκτανοϊκό οξύ – PFOA (Perfluorooctanoic acid - PFOA), είναι ένα τεχνητό οξύ που έχει πολλές βιομηχανικές χρήσεις. Είναι ένα σημαντικό χημικό, ουσιαστικό στην κατασκευή των υλικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή

προϊόντων που εκτείνονται σε ολόκληρη την οικονομία. Το PFOA είναι σταθερό στο περιβάλλον λόγω της ισχύς του δεσμού άνθρακα-φθορίου (C-F) (σχήμα 1), δεν διασπάται εύκολα και αντέχει σε υψηλές θερμοκρασίες (μέχρι 300° C). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ημιζωή του PFOA στους ανθρώπους υπολογίστηκε ότι είναι 4,37 έτη [1]. Εντούτοις, η βιολογική ημιζωή στους αρσενικούς αρουραίους είναι 4-6 ημέρες και 2-4 ώρες στους θηλυκούς [2]. Αυτή η διαφορά μεταξύ των ειδών και των φύλων οφείλεται κυρίως στην διαφορά στη νεφρική κάθαρση.

<p>Φυσικοχημικές ιδιότητες: Εμφάνιση: Λευκή σκόνη με αποπνικτική οσμή Σχετική μοριακή μάζα: 414,07 Σημείο τήξης: 45-50°C Σημείο ζέσης: 189-192°C / 736 mm Hg Τάση ατμών: 10 mm Hg / 25°C Πυκνότητα: 1,79 g/cm³ Διαλυτότητα στο νερό: 3,4 g/L Σταθερά διάστασης: pK_a = 2,5 pH διαλύματος 1 g/L: 2,6 Συντελεστής κατανομής (οκτανόλη/νερό): logP_{ow} = 6,3</p>	$ \begin{array}{cccccccc} & \text{F} & \text{F} & \text{F} & \text{F} & \text{F} & \text{F} & \text{O} \\ & & & & & & & \\ \text{F} - & \text{C} & - \text{C} & - \text{C} & - \text{C} & - \text{C} & - \text{C} & - \text{C} - \text{OH} \\ & & & & & & & \\ & \text{F} & \text{F} & \text{F} & \text{F} & \text{F} & \text{F} & \text{F} \end{array} $
<p>Υπερφθορο-οκτανοϊκό οξύ Perfluorooctanoic acid (PFOA)</p>	

Το PFOA είναι χημικώς αδρανές και δεν υπόκειται σε βιοαποικοδόμηση με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή του στο περιβάλλον και την εμφάνισή του στην τροφική αλυσίδα, γεγονός που έχει προκαλέσει ανησυχίες στην επιστημονική κοινότητα. Πρέπει να τονιστεί ότι το PFOA είναι μια ουσία που δεν παράγεται από τη φύση και η συνολική ποσότητά της είναι καθαρά ανθρωπογενούς προέλευσης. Ίχνη του PFOA έχουν ήδη ανιχνευθεί στο αίμα πολλών κατοίκων των αναπτυγμένων χωρών. Οι επιστήμονες δεν γνωρίζουν ακόμη το βαθμό κινδύνου για την υγεία του ανθρώπου, ωστόσο έρευνες έδειξαν ότι μπορεί να προκαλέσει καρκίνο, να οδηγήσει σε υπερτροφία ηπάτων καθώς επίσης και να επηρεάσει την γονιμότητα της άγριας πανίδας [3]. Η βιομηχανία DuPont, που παρασκευάζει το PFOA επί 50 χρόνια στο εργοστάσιο Washington Works (Belpre, OHIO) έχει ξεκινήσει μεγάλη

επιδημιολογική έρευνα στους κατοίκους της περιοχής και εξετάζονται οι πιθανές μελλοντικές επιπτώσεις στην υγεία τους.



Σχήμα 1: Χημική δομή PFOA.

2.1.2 Χρήσεις των PFOA

Αρχικά η χρήση του PFOA είναι να βοηθήσει στην κατασκευή υλικών υψηλής απόδοσης, ανθεκτικών στη θερμότητα και στα χημικά, γνωστά ως υπερφθοριωμένα πολυμερή (fluoropolymers). Λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους, συμπεριλαμβανομένης της υψηλής αντίστασης και μεταβλητότητας, διάρκειας και αντοχής στην θερμότητα, τα υπερφθοριωμένα πολυμερή χρησιμοποιούνται για την παρασκευή προϊόντων που μεταξύ άλλων, βελτίωσαν την απόδοση και την ασφάλεια των αεροσκαφών, των αυτοκινήτων και της ναυτιλίας, μείωσαν τον κίνδυνο πυρκαγιάς στα πολυόροφα κτίρια και μείωσαν την βιομηχανική και αυτοκινητιστική ρύπανση [4].

Τα υπερφθοριωμένα πολυμερή έχουν πολλές σημαντικές χρήσεις στην υπεράσπιση και την εθνική ασφάλεια, στις τηλεπικοινωνίες, στην ηλεκτρονική, στους υπολογιστές και σε άλλους τομείς υψηλής τεχνολογίας. Λόγω της προσαρμοστικότητας και της αντοχής τους στην θερμότητα, χρησιμοποιούνται για την δημιουργία του προστατευτικού ιματισμού και τον εξοπλισμό για τους αστροναύτες, τους στρατιωτικούς και τους εθελοντές πυροσβέστες, καθώς επίσης και για τους καταναλωτές. Εν συντομία έχουν γίνει χρήσιμα σε πολλούς βασικούς τομείς της οικονομίας των εθνών, της ασφάλειας και της προστασίας του κοινού, στην μείωση της ρύπανσης του αέρα και των υδάτων και στη βελτίωση στην ποιότητα της ζωής.

Ένα από τα πλέον γνωστά υπερφθοριωμένα πολυμερή είναι το πολυτετραφθοροαιθυλένιο (polytetrafluoroethylene, PTFE), το οποίο έχει

πολύαριθμες εφαρμογές και είναι ευρύτερα γνωστό με την εμπορική ονομασία Teflon® (παράγεται από τη χημική βιομηχανία DuPont) [5]. Οι πλέον γνωστές εφαρμογές των πολυφθοριωμένων πολυμερών είναι τα αντικολλητικά τηγάνια και μαγειρικά σκεύη (όπως τα σκεύη με το εμπορικό όνομα TEFAL), τα ενδύματα από συνθετικές ίνες και υφάσματα για έπιπλα που είναι ανθεκτικά στο νερό και δεν συγκρατούν λεκέδες, διαφανή φιλμ, αφρώδη υλικά και υλικά συσκευασίας τροφίμων που δεν επηρεάζονται από τα λιπαρά συστατικά.

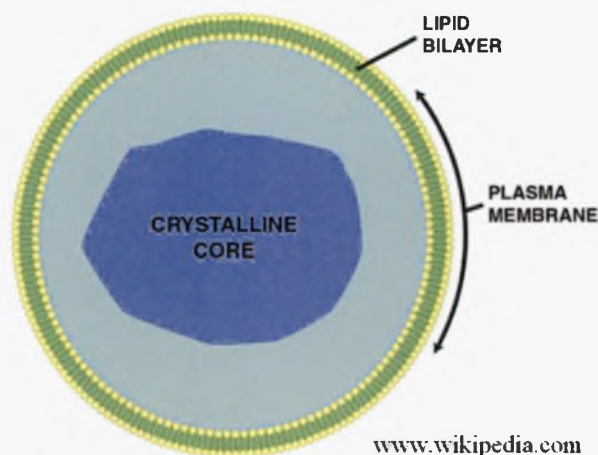
Το 2004, η Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (Environmental Protection Agency, EPA) ξεκίνησε ένα διευρυμένο ερευνητικό πρόγραμμα για πιθανές επιπτώσεις στην υγεία από μαγειρικά σκεύη, διάφορα προϊόντα με PFOA, όπως επίσης και στην εγκυμοσύνη γυναικών-εργατριών του εργοστασίου της DuPont. Επίσης, από το 2006 η EPA ανακοίνωσε εθελοντικό πρόγραμμα περιορισμού των εκπομπών στο περιβάλλον από βιομηχανικές και βιοτεχνικές εγκαταστάσεις που παρασκευάζουν ή επεξεργάζονται υπερφθοριωμένα προϊόντα. Η EPA τονίζει στο κύριο ανακοινωθέν ότι το PFOA είναι η αρχική ουσία από την οποία παρασκευάζονται τα πολυμερή αλλά δεν βρίσκεται ούτε σε ίχνη στα διάφορα προϊόντα (τηγάνια, ενδύματα, κ.λπ.). Όλες οι πληροφορίες που έχει η υπηρεσία δείχνουν ότι η καθημερινή χρήση των προϊόντων αυτών δεν συνεπάγεται αρνητικές ή βλαβερές επιπτώσεις για την υγεία του ανθρώπου. Η EPA θεωρεί ότι με βάση τις σημερινές γνώσεις δεν πρέπει να υπάρχει ανησυχία στον πληθυσμό και η χρήση προϊόντων Teflon δεν αποτελεί κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου [6].

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν πληροφορίες για βλάβες στην υγεία εργατών ή καταναλωτών. Τα επίπεδα PFOA στο αίμα που έχουν βρεθεί είναι εξαιρετικά χαμηλά (από την EPA η μέση συγκέντρωση PFOA στο αίμα εκτιμάται ότι είναι 5 µg/L) σε σχέση με τα πειραματόζωα που έχουν εκτεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, δεν έχει διαπιστωθεί αν το PFOA παρουσιάζει κάποια μεταλλαξιογόνο δράση. Ωστόσο, είναι φυσικό να υπάρχουν πολλές αμφιβολίες για την τοξικολογική του δράση.

2.2 Υπεροξειδώματα

Το υπεροξειδωμά είναι μονομεμβρανικό οργανίδιο παρών σχεδόν σε όλα τα ευκαριωτικά κύτταρα. Το υπεροξειδωμά περιέχει τουλάχιστον 50 διαφορετικά ένζυμα, τα οποία συμμετέχουν σε ποικίλα βιοχημικά μονοπάτια σε διαφορετικούς

τύπους κυττάρων, π.χ. στη β-οξείδωση της μακριάς αλυσίδας και πολύ μακριάς αλυσίδας λιπαρών οξέων, [7] στην επιμήκυνση των λιπαρών οξέων, στην σύνθεση της χοληστερόλης, στον καταβολισμό των πολυαμινών και των πουρινών και στον μεταβολισμό των αλκοολών [8].



Σχήμα 2: Βασική δομή ενός υπεροξεισώματος.

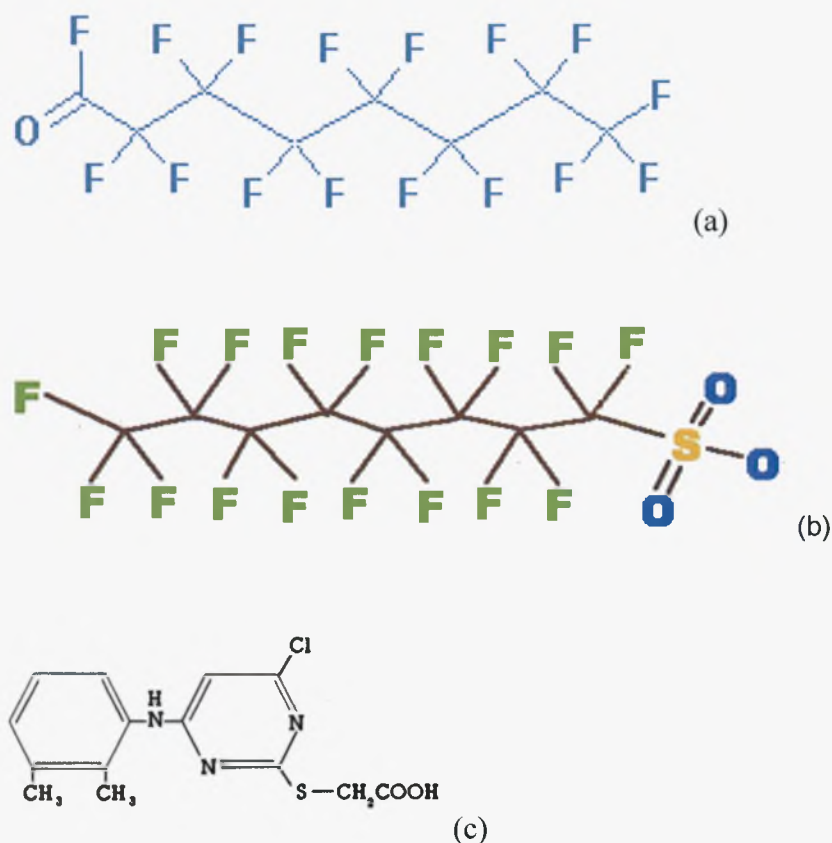
2.3 Πολλαπλασιαστές υπεροξεισωμάτων

Διάφορες περιβαλλοντικά επίμονες χημικές ουσίες που είναι ελεύθερες στο περιβάλλον μπορούν να επιβάλουν τοξικά αποτελέσματα στους ανθρώπους και στα υπόλοιπα ζώα. Τέτοιες ενώσεις είναι συνήθως σταθερές και δεν μεταβολίζονται εύκολα από το σώμα. Στις αρχές της δεκαετίας του '60, το clofibrate (φάρμακο κατά της χοληστερίνης) βρέθηκε να προκαλεί υπολιπιδαιμικά αποτελέσματα και στους ανθρώπους και στα ποντίκια [2, 9, 10, 11]. Μετέπειτα ανακαλύφθηκαν και άλλα αποτελέσματα αυτής της ένωσης στους αρουραίους, συμπεριλαμβανομένων των αυξήσεων στο μέγεθος και στον αριθμό των ηπατοκυττάρων και των υπεροξεισωμάτων [12], καθώς επίσης και στις δραστηριότητες των υπεροξεισωματικών ενζύμων στην β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Έκτοτε, οι ενώσεις με δομές ανάλογες με αυτή του clofibrate [13], αλλά και ενώσεις με δομή άσχετη από αυτή του clofibrate [14] έχουν αποδειχθεί ότι προκαλούν τα ίδια αποτελέσματα. Αυτές οι ουσίες αναφέρονται συλλογικά ως πολλαπλασιαστές υπεροξεισωμάτων (PPs).

Το αρχικό και καθοριστικό αποτέλεσμα ενός πολλαπλασιαστή υπεροξεισωμάτων είναι μια δραματική αύξηση στον αριθμό και το μέγεθος των ηπατικών

υπεροξεισωμάτων, που συνοδεύεται σχεδόν αμετάβλητα από την up-regulation της υπεροξεισωματικής β-οξειδωσης λιπαρών οξέων. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να ποικίλουν για τους διάφορους πολλαπλασιαστές υπεροξεισωμάτων. Μεταξύ αυτών των αποτελεσμάτων είναι η ανάπτυξη των όγκων στο ήπαρ τρωκτικών [15], όπου η επίπτωση της ανάπτυξης όγκων ποικίλλει, ανάλογα με τα είδη, την ένωση και τη δόση που χρησιμοποιείται [16] αλλά και τη διάρκεια της έκθεσης [17].

Κάποιοι πολλαπλασιαστές υπεροξεισωμάτων είναι: το PFOA, το PFOS και το Nafenopin.

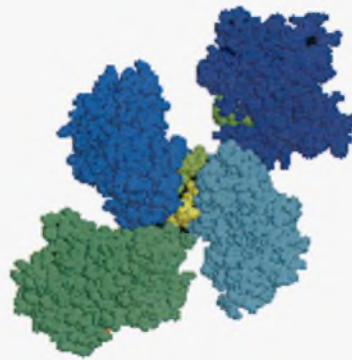


Σχήμα 3: Δομή του (a) (PFOA), (b) (PFOS) και (c) Nafenopin.

2.4 Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs)

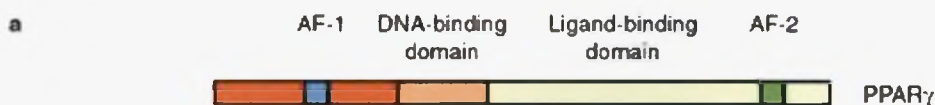
Η γρήγορη και συντονισμένη επαγωγή της υπερπλασίας, ο πολλαπλασιασμός υπεροξεισωμάτων και τα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό λιπιδίων από PPs παρείχαν μια πρόωρη ένδειξη ότι εμπλέκεται μηχανισμός με ενδιάμεσο υποδοχέα. Σε ήπαρ ποντικών βρέθηκε ένα μέλος της υπερ-οικογένειας πυρηνικών υποδοχέων το οποίο ενεργοποιείται από PPs, και ονομάστηκε υποδοχέας που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστές υπεροξεισωμάτων (PPAR).

Αυτή τη στιγμή τρεις ισομορφές αυτού του υποδοχέα έχουν προσδιοριστεί δηλ., PPAR α , PPAR β/δ και PPAR γ [18]. Αυτές οι ισομορφές εμπλέκονται σε διαφορετικές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως υποδεικνύεται από τα διάφορα πρότυπα ιστοειδικής έκφρασης, διαφορετικών προσδετο-δεσμευτικών ιδιομορφιών και διαφορετικών αποτελεσμάτων στην ενεργοποίηση.



Σχήμα 4: Δομή PPAR γ .

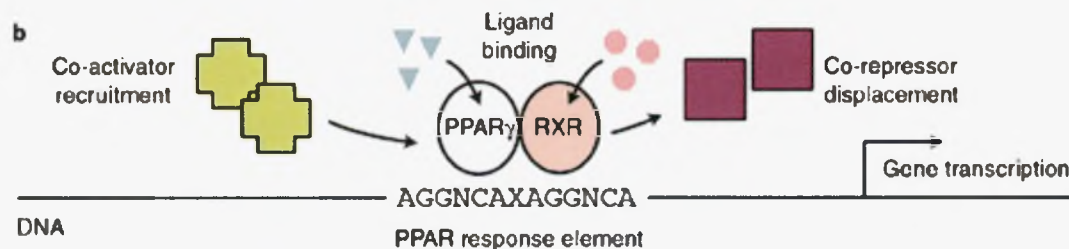
Η δομή των PPARs οργανώνεται σε λειτουργικές περιοχές (σχήμα 5) [19]. Η DNA-δεσμευτική περιοχή (DBD) και η περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (LBD) είναι οι πιο ιδιαίτερα συντηρημένες μεταξύ των διαφορετικών ισομορφών των PPARs. Η περιοχή DBD περιέχει δύο δακτύλους ψευδάργυρου που δεσμεύονται στην ρυθμιστική περιοχή του DNA όταν ενεργοποιείται ο υποδοχέας. Η περιοχή LBD έχει μια εκτενή δευτεροταγή δομή από αρκετές α -έλικες και ενός β -φύλλου. Συγκρινόμενοι με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς, αυτή η δεσμευτική "τσέπη" του προσδέτη φαίνεται να είναι πολύ μεγάλη και έτσι ικανή να δεσμεύσει πολλούς διαφορετικούς προσδέτες [20, 21].



Σχήμα 5: Ο υποδοχέας PPAR γ έχει τις τυπικές δομικές περιοχές των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων, συμπεριλαμβανομένης μιας κεντρικής DNA-δεσμευτικής περιοχής, μίας COOH-τελικής περιοχής δέσμευσης του προσδέτη, και δύο περιοχές

ενεργοποίησης (AF-1, περιοχή ενεργοποίησης ανεξάρτητη του προσδέτη και AF-2, περιοχή ενεργοποίησης εξαρτώμενη από τον προσδέτη).

Όλοι οι PPARs υποδοχείς διμερίζονται με το ρετινοειδή υποδοχέα X (RXR) και δεσμεύονται σε συγκεκριμένες περιοχές στο DNA των γονιδίων στόχων (σχήμα 6). Αυτές οι ακολουθίες DNA καλούνται PPREs (Peroxisome Proliferator Response Elements). Οι PPRE αποτελούνται από δύο άμεσες επαναλήψεις έξι νουκλεοτιδίων που χωρίζονται από μια ενιαία βάση, η ακολουθία αυτή είναι η AGGTCA. Κατά τη δέσμευση ενός προσδέτη, οι PPARs ετεροδιμερίζονται με το ρετινοειδή υποδοχέα X (RXR), και αυτό το ετεροδιμερές δεσμεύεται στη συνέχεια στο PPRE και αλληλεπιδρά με συν-ενεργοποιητές προκειμένου να αυξηθεί το ποσοστό μεταγραφικής έναρξης [22, 23].



PPAR γ structure and mode of gene regulation

Expert Reviews in Molecular Medicine ©2005 Cambridge University Press

Σχήμα 6: Ο υποδοχέας PPAR γ δεσμεύεται στα στοιχεία απάντησης PPAR (PPREs) σαν ετεροδιμερές με το ρετινοειδή υποδοχέα X (RXR). Ο προσδέτης που δεσμεύεται είτε σε PPAR είτε σε RXR προκαλεί τη μετατόπιση των συν-καταστολέων, τη στρατολόγηση των συν-ενεργοποιητών και την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων.

Ο υποδοχέας PPAR α ρυθμίζει πολλές διαφορετικές πτυχές του μεταβολισμού λιπαρών οξέων στο ήπαρ και την καρδιά [24, 25, 26]. Η φυσιολογική λειτουργία του υποδοχέα PPAR β/δ παραμένει να διευκρινιστεί πλήρως, αλλά αυτός ο υποδοχέας έχει καταδειχθεί ότι παίζει ρόλο στην εμφύτευση εμβρύων και στην απόρριψη ιστών μετά την γέννα στα ποντίκια [27]. Ο PPAR γ είναι ένας ισχυρός ρυθμιστής της διαφοροποίησης λιποκυττάρων. Η εμπλοκή αυτών των υποδοχέων στη ρύθμιση του

μεταβολισμού των λιπαρών οξέων τους κάνει ενδιαφέροντες πιθανούς στόχους για τα φάρμακα ενάντια στις ασθένειες όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου-2, η αθηροσκλήρυνση και το μεταβολικό σύνδρομο, οι οποίες περικλύουν προβλήματα με την ομοιόσταση λιπαρών οξέων.

Τα ηπατικά αποτελέσματα που προκαλούνται από τους PPs μπορούν να αξιολογηθούν από το βαθμό ηπατομεγαλίας και πολλαπλασιασμού υπεροξεισωμάτων. Μορφολογικές μελέτες με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σε ήπαρ τρωκτικών που τους έχουν χορηγηθεί PPs αποκαλύπτουν μεγαλύτερα, και πολυάριθμα υπεροξεισώματα ποικίλης πυκνότητας. Εντούτοις, ο ποσοτικός προσδιορισμός από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι χρονοβόρος και προβληματικός [28, 12].

Η μακροπρόθεσμη έκθεση των τρωκτικών σε PPs, με συνέπεια την ηπατοκαρκινογένεση, έχει μελετηθεί εκτενώς για περίπου δύο δεκαετίες τώρα [29]. Διάφοροι ελλοχεύοντες μηχανισμοί έχουν προταθεί, συμπεριλαμβανομένου του αυξανόμενου οξειδωτικού stress, της μείωσης της απόπτωσης ηπατοκυττάρων και της αλλαγμένης μεταγωγής σημάτων. Η αγωγή των PPAR-null ποντικών με ισχυρό PFOA προκαλεί τον ίδιο βαθμό υπερτροφίας ήπατος όπως στα wild-type ποντίκια, ενώ δεν εμφανίστηκε πολλαπλασιασμός των ηπατικών υπεροξεισωμάτων και μειώθηκε η ατροφία του περιφερειακού ιστού [30].

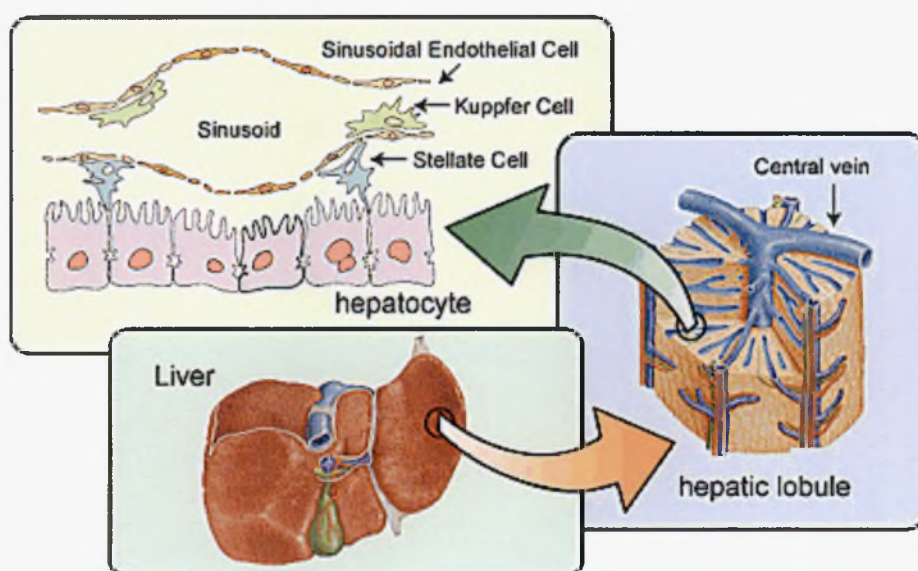
Τα προηγούμενα πειράματα με 0.02%w/w PFOA στη διατροφή των ποντικών για 10 ημέρες έχουν δείξει ότι έχουν συνδυαστικά αποτελέσματα. Αυτά τα αποτελέσματα είναι:

- ⓐ Θερμιδικός περιορισμός ή απώλεια όρεξης
- ⓐ Απώλεια βάρους σώματος
- ⓐ Απώλεια λιπώδους και μυώδους ιστού
- ⓐ Πολλαπλασιασμοί υπεροξεισωμάτων
- ⓐ Σφοδρή υπερτροφία συκωτιού
- ⓐ Εκτενής ατροφία του θύμου αδένος και της σπλήνας που οδηγούν στην απώλεια ανοσολογικών λειτουργιών
- ⓐ Καταστολή της απόπτωσης που οδηγεί σε όγκους
- ⓐ Αύξηση στη δραστηριότητα της β-οξειδωσης υπεροξεισωμάτων [31]

2.5 Η ανατομία του ήπατος

Το βάρος ενός ανθρώπινου ήπατος κυμαίνεται μεταξύ 1200-1800g ενώ στα ποντίκια ζυγίζει 1,3-1,6g, αποτελεί δηλαδή περίπου το 16% του βάρους του σώματος [31]. Είναι το δεύτερο μεγαλύτερο όργανο (το μεγαλύτερο είναι το δέρμα) και ο μεγαλύτερος αδένας μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Βρίσκεται στη δεξιά πλευρά της άνω κοιλιακής χώρας, στα δεξιά του στομαχιού και δημιουργεί ένα είδος «κρεβατιού» για τη χοληδόχο κύστη [32].

Είναι το σημαντικότερο κοιλιακό όργανο και αποτελείται από αριστερούς και δεξιούς λοβούς. Ο δεξιός λοβός είναι μεγαλύτερος από τον αριστερό λοβό. Κάθε λοβός διαιρείται περαιτέρω σε πολλά μικρότερα λοβίδια, κάθε ένα έχει το μέγεθος ενός κεφαλιού καρφίτσας, και αποτελείται από πολλά ηπατικά κύτταρα, ανάμεσα από τα οποία διαπερνούν τα κανάλια χολής και κανάλια αίματος. Έχει πολύ στενή σχέση με πολλά όργανα. Δεν συσχετίζεται μόνο με τη χοληδόχο κύστη αλλά και με το πάγκρεας και τον δωδεκαδάκτυλο [33].



Σχήμα 7: Το ήπαρ αποτελείται από τα ηπατοκύτταρα (παρεγχυματώδη κύτταρα) και τα μη-παρεγχυματώδη κύτταρα, όπως τα κύτταρα Kupffer, ενδοθηλιακά κοιλώειδη κύτταρα, από τα κύτταρα Stellate, και άλλα. Τα ηπατοκύτταρα είναι προσκολλημένα το ένα στο άλλο μέσω ενός συνδετικού συμπλέγματος που διαμορφώνεται μέσω χασμοσυνδέσμων. Αλληλεπιδράσεις περιβάλλοντος-κυττάρου και κυττάρου-κυττάρου συμβάλλουν στη συντήρηση των λειτουργιών του ήπατος και της αναγέννησης ήπατος.

2.6 Λειτουργίες ήπατος

Το ήπαρ είναι ένα σημαντικό όργανο μέσα στο σώμα που έχει έναν κεντρικό ρόλο στην μεταβολική ομοιόσταση, δεδομένου ότι είναι αρμόδιο για το μεταβολισμό, τη σύνθεση, την αποθήκευση και την ανακατανομή των θρεπτικών ουσιών, των υδατανθράκων, των λιπών και των βιταμινών. Είναι το κύριο αποτοξινωτικό όργανο του σώματος, το οποίο απομακρύνει τα απόβλητα και τις ξеноβιοτικές ουσίες [34]. Ο σχηματισμός της χολής είναι μια ουσιαστική λειτουργία του ήπατος, και η αποτυχία του σχηματισμού της χολής είναι μια παθολογική διαδικασία που ονομάζεται cholestasis. Η διατήρηση των συστατικών της χολής μέσα στο ηπατοκύτταρο κατά τη διάρκεια της cholestasis συνδέεται με την απόπτωση ηπατοκυττάρων [35]. Αν και οι μηχανισμοί της cholestasis που συνδέονται με την απόπτωση των ηπατοκυττάρων είναι πιθανόν σύνθετοι και πολυπαραγοντικοί, τα υδροφοβικά χολικά οξέα είναι ιδιαίτερα ηπατοτοξικά, και συσσωρεύονται στο ήπαρ στις cholestatic αναταραχές [36]. Η αποτυχία να εκκριθούν τα χολικά οξέα στη χολή οδηγεί στον τραυματισμό συκωτιού, την κίρρωση, και το θάνατο από την ανεπάρκεια ήπατος [37].

Μεταβολικές ηπατικές λειτουργίες:

- ⓐ Γλυκονεογένεση
- ⓐ Σύνθεση και αποθήκευση γλυκογόνου
- ⓐ Σύνθεση της ουρίας
- ⓐ Μεταβολισμός λιποπρωτεϊνών
- ⓐ Σύνθεση πρωτεϊνών πλάσματος
- ⓐ Σύνθεση χολικών οξέων
- ⓐ Αποικοδόμηση της αίμης και αποθήκευση σιδήρου
- ⓐ Μεταβολισμός των βιταμινών A και D
- ⓐ Αντιδράσεις εξαρτώμενες από την βιταμίνη K

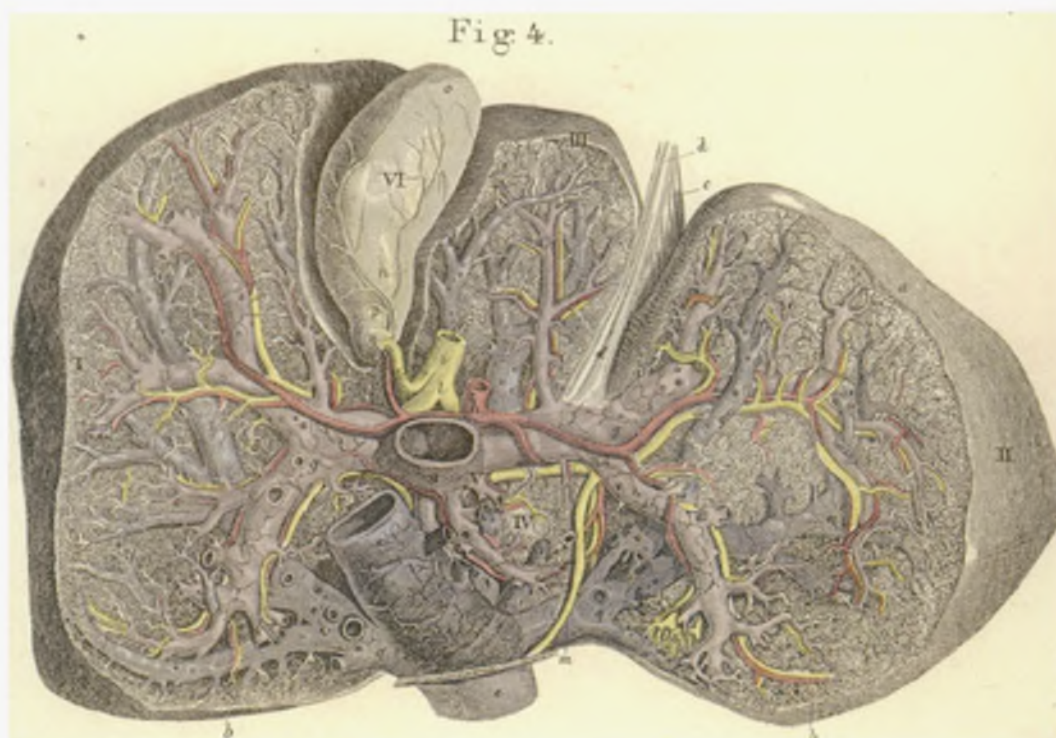
Οι ηπατικές λειτουργίες μπορούν να χωριστούν σε δύο ζώνες. Η πρώτη είναι η *περιφερειακή* και περιλαμβάνει τα κύτταρα που είναι κοντά στην πυλαία φλέβα, και άλλη είναι *κεντρική* και περιλαμβάνει τα κύτταρα που είναι στο κέντρο του ήπατος.

- ⓐ Περιφερειακή - οξειδωτικός μεταβολισμός, οξείδωση λιπαρών οξέων, γλυκονεογένεση, υψηλά επίπεδα γλουταθειόνης
- ⓐ Κεντρική - αντιδράσεις εστεροποίησης, αντιδράσεις του κυτοχρώματος P-450

2.7 Αγγεία αίματος του ήπατος

Τρεις τύποι αγγείων περνούν μέσω του ήπατος:

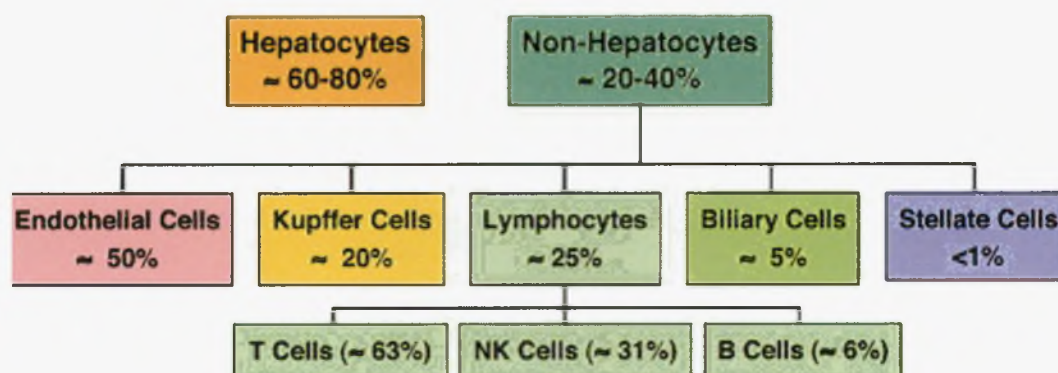
- ⓐ **Ηπατική αρτηρία.** Αυτή η αρτηρία είναι ένα κοντό αγγείο αίματος που παρέχει το οξυγονωμένο αίμα από την αορτή στο ήπαρ, στον πυλωρό (ένα μέρος του στομαχιού), στον δωδεκαδάκτυλο και στο πάγκρεας.
- ⓑ **Πυλαία φλέβα.** Είναι μια πυλαία φλέβα στο ανθρώπινο σώμα που παρέχει το μη-οξυγονωμένο αίμα από το πεπτικό σύστημα τους σχετικούς αδένες του. Η πυλαία φλέβα παρέχει αίμα στο ήπαρ και όχι από το ήπαρ. Το αίμα εισάγεται στο ήπαρ από την πυλαία φλέβα και έπειτα καθαρίζεται από το ήπαρ και ρέει σε άλλες φλέβες.
- ⓒ **Τριχοειδή.** Ένα ηπατικό τριχοειδές είναι ένας τύπος αιματικού αγγείου που χρησιμεύει ως μια θέση για το πλούσιο σε οξυγόνο αίμα από την ηπατική αρτηρία και το πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά αίμα από την πυλαία φλέβα. Είναι εξοπλισμένα με τα κύτταρα Kupffer που μπορούν να λάβουν και να καταστρέψουν το ξένο υλικό όπως για παράδειγμα τα βακτηρίδια που εισάγονται στα τριχοειδή [38].



Σχήμα 8: Μία τομή ήπατος. Με το κόκκινο χρώμα εμφανίζεται η ηπατική αρτηρία (η), με κίτρινο είναι ο χοληφόρος πόρος (ι). Η μεγάλη φλέβα κάτω από την ηπατική

αρτηρία είναι η πυλαία φλέβα (ζ). Στην κορυφή της εικόνας φαίνεται η χοληφόρος κύστη (VI).

www.anatomyatlases.org



Σχήμα 9: Σύνθεση κυττάρων ενός υγιούς ήπατος. Οι αριθμοί δείχνουν την κατ' εκτίμηση συχνότητα κάθε πληθυσμού σχετικά με το συνολικό αριθμό παρεγχυματικών και μη παρεγχυματικών κυττάρων στο ήπαρ.

2.8 Ηπατικά κύτταρα

• 2.8.1 Ηπατοκύτταρο

Ο κύριος τύπος κυττάρων του ήπατος που πραγματοποιεί τις περισσότερες λειτουργίες είναι το *παρεγχυματικό κύτταρο* ή το *ηπατοκύτταρο*. Τα ηπατοκύτταρα αποτελούν 70-80% της κυτταροπλασματικής μάζας του συκωτιού. Το υπόλοιπο 20% είναι τα μη-παρεγχυματικά κύτταρα που περιλαμβάνουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα Kupffer, τα λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα Stellate τα οποία είναι διεσπαρμένα μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, είναι μέρος του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος και φαγοκυτταρώνουν τα χρησιμοποιημένα ερυθροκύτταρα. Τα κύτταρα Stellate αποθηκεύουν τη βιταμίνη Α και παράγουν εξωκυτταρική θεμέλια ουσία και κολλαγόνο, διανέμονται επίσης μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά είναι δύσκολο να απεικονιστούν από το οπτικό μικροσκόπιο.

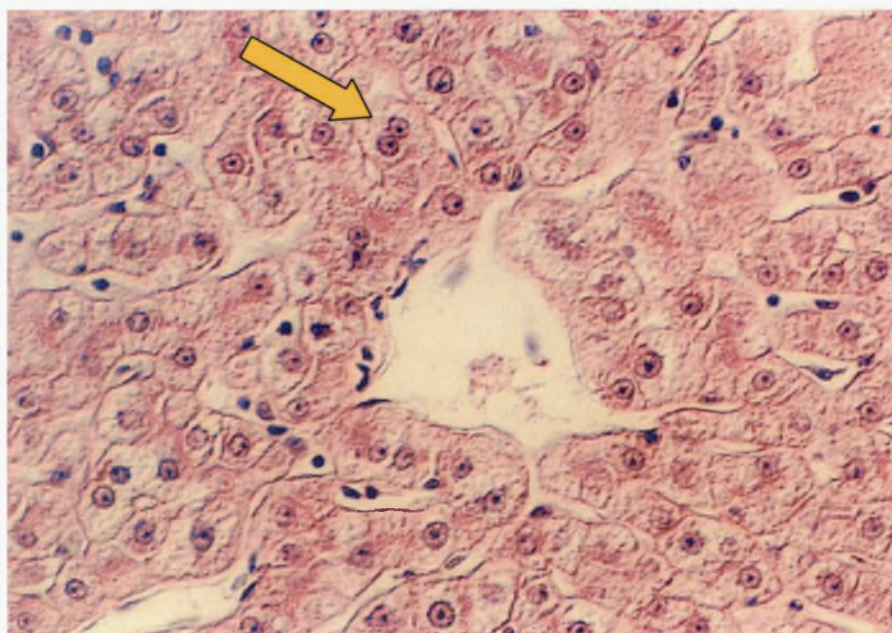
Τα ηπατοκύτταρα εμπλέκονται στην πρωτεϊνική σύνθεση, την πρωτεϊνική αποθήκευση και το μετασχηματισμό των υδατανθράκων, την σύνθεση της χοληστερόλης, των χολικών αλάτων και των φωσφολιπιδίων, και στην αποτοξίνωση,

τη τροποποίηση και την έκκριση των εξωγενών και ενδογενών ουσιών. Το ηπατοκύτταρο είναι υπεύθυνο για την έναρξη του σχηματισμού και της έκκρισης της χολής. Η μέση διάρκεια ζωής του ηπατοκυττάρου είναι 5 μήνες, αλλά είναι σε θέση να αναγεννηθούν.

Διπύρνα κύτταρα (σχήμα 10) είναι επίσης κοινά στα τριχοειδή αγγεία, μια ρύθμιση που υποστηρίζεται από ένα δίκτυο (δίκτυο τύπων III) κολλαγόνων. Τα τριχοειδή επιδεικνύουν μια ασυνεχή, θυριδωτή ενδοθηλιακή επένδυση κυττάρων. *Τα κύτταρα περιέχουν συνήθως κόκκους, μερικοί των οποίων είναι πρωτοπλασματικοί, ενώ άλλοι αποτελούνται από γλυκογόνο, λίπος, ή μια ένωση σιδήρου.* Τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν έχουν καμία βασική μεμβράνη και χωρίζονται από τα ηπατοκύτταρα από το διάστημα Disse, το οποίο παροχετεύει τη λέμφο στο πυλαίο λεμφαγγείο.

Τα ηπατοκύτταρα είναι ένα σημαντικό φυσιολογικό παράδειγμα της αξιολόγησης των βιολογικών αλλά και των μεταβολικών αποτελεσμάτων των ξενοβιοτικών ουσιών. Δεν πολλαπλασιάζονται στην καλλιέργεια, αλλά διατηρούν τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται σε απάντηση στον τοξικό τραυματισμό και τη μόλυνση. Η λέξη "αναγεννώ" δεν είναι κυριολεκτική επειδή οι λοβοί του ήπατος που αφαιρούνται δεν αυξάνονται πίσω, αντίθετα από ότι συμβαίνει κατά την αναγέννηση των άκρων στα μοντέλα των αμφιβίων. Έτσι η αναγέννηση ήπατος δεν απαιτεί τη στρατολόγηση των βλαστικών κυττάρων του ήπατος ή των προγονικών κυττάρων, αλλά περιλαμβάνει τον αναδιπλασιασμό των ώριμων λειτουργικών ηπατικών κυττάρων. Η αναγεννητική διαδικασία είναι ικανοποιητική επειδή το μέγεθος του επακόλουθου ήπατος καθορίζεται από τις απαιτήσεις του οργανισμού, και, μόλις επανεγκαθιδρυθεί η αρχική μάζα του ήπατος, διακόπτεται ο πολλαπλασιασμός.

Το ηπατοκύτταρο είναι κύτταρο στο σώμα που κατασκευάζει τη ορολευκωματίνη, το ινωδογόνο και την ομάδα προθρομβίνης των πηκτικών παραγόντων. Είναι η κύρια περιοχή για τη σύνθεση των λιποπρωτεϊνών, της σερουλοπλασμίνης, του συμπληρώματος και των γλυκοπρωτεϊνών. Τα ηπατοκύτταρα κατασκευάζουν τις δικές τους δομικές πρωτεΐνες και τα ενδοκυτταρικά τους ένζυμα [39, 40].



Σχήμα 10: Τα ηπατικά παρεγχυματώδη κύτταρα μπορούν να είναι διπύρρηνα.

• 2.8.2 *Κύτταρα Kupffer*

Τα κύτταρα *Kupffer* ή τα κύτταρα *Browicz - Kupffer* είναι εξειδικευμένα μακροφάγα και βρίσκονται στο ήπαρ όπου αποτελούν μέρος του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν πρώτα από τον Karl Wilhelm von Kupffer το 1876. Τα ονόμασε κύτταρα αστεριών ή stellate κύτταρα και σκέφτηκε ψευδώς ότι ήταν ένα αναπόσπαστο τμήμα του ενδοθηλίου των ηπατικών αγγείων του αίματος και ότι προήλθαν από αυτό. Το 1898, μετά από αρκετά έτη έρευνας, ο Tadeusz Browicz τα προσδιόρισε σωστά ως μακροφάγα.

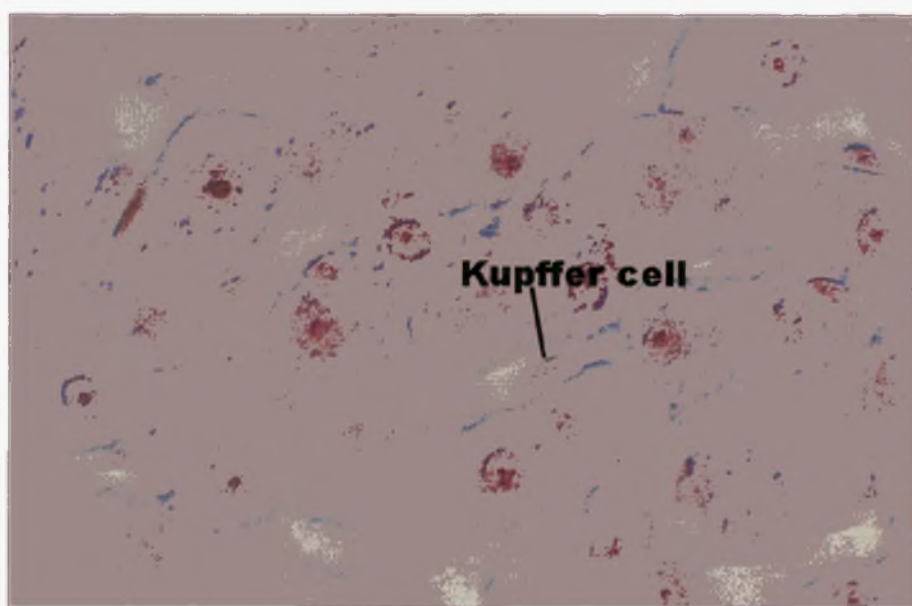
Η ανάπτυξή τους αρχίζει στο μυελό των οστών με τη γένεση των promonocytes και των μονοβλαστών σε μονοκύτταρα και έπειτα προς τα απομακρυσμένα μονοκύτταρα αίματος που ολοκληρώνουν τη διαφοροποίησή τους στα κύτταρα *Kupffer*. Καθώς εντοπίζονται μέσα στο ήπαρ, τα κύτταρα *Kupffer* “κατοικούν” μέσα στο τριχοειδικό αγγειακό διάστημα (σχήμα 11). Η αργή μετανάστευσή τους κατά μήκος των τριχοειδών αγγείων του ήπατος προκαλεί συχνές διαταραχές ακόμη και την προσωρινή διακοπή της τριχοειδικής ροής αίματος. Τα κύτταρα *Kupffer* περνούν επίσης μέσω του διαστήματος Disse, έχουν άμεση επαφή με τα ηπατοκύτταρα και φαγοκυτταρώνουν τα αποπτωτικά ηπατοκύτταρα.

Η πρωταρχική λειτουργία των κυττάρων *Kupffer* είναι να ανακυκλώνουν τα παλαιά ερυθρά αιμοσφαίρια που δεν είναι πλέον λειτουργικά, και να αφαιρούν τα βακτήρια και τις ξένες πρωτεΐνες από το αίμα. Αποθηκεύουν επίσης αιμοσιδερίνη έτσι ώστε

είναι διαθέσιμη για την παραγωγή της αιμογλοβίνης, που είναι υπεύθυνη για την μεταφορά του οξυγόνου στα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Πολυάριθμα μόρια, συμπεριλαμβανομένων των βακτηριακών ενδοτοξινών, μπορούν να ενεργοποιήσουν τα κύτταρα Kupffer. Όταν ενεργοποιούνται, τα κύτταρα Kupffer εκκρίνουν ποικίλες κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα νέκρωσης όγκων άλφα (TNF- α) και διάφορους τύπους ιντερλευκινών. Όλα αυτά τα μόρια μπορούν να ενεργήσουν σαν φλεγμονώδεις κυτοκίνες, προκαλούν μια φλεγμονώδη απάντηση απαραίτητη για να αφαιρέσει τα βλαπτικά τοξικά ή ξένα μόρια και να κινήσει τη θεραπευτική διαδικασία.

Υπάρχει ένας υποδοχέας στα κύτταρα Kupffer, ο υποδοχέας του συμπληρώματος της οικογένειας ανοσοσφαιρινών (CRIg). Τα ποντίκια χωρίς τον υποδεχέα CRIg δεν μπορούσαν να καθαρίσουν τα παθογόνα που ήταν καλυμμένα με το σύστημα του συμπληρώματος [39, 40].



Σχήμα 11: Ένα κύτταρο Kupffer εντοπισμένο σε ηπατικό τριχοειδές αγγείο.

• 2.2.3 Λεμφοκύτταρα ήπατος

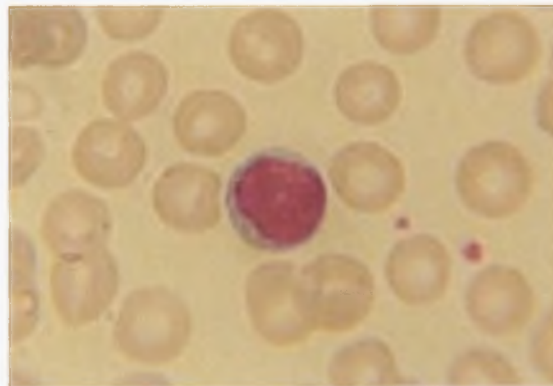
Ένα λεμφοκύτταρο είναι ένας τύπος λευκού κυττάρου αίματος στο ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών (Σχήμα 12). Υπάρχουν δύο ευρείες κατηγορίες λεμφοκυττάρων, που ονομάζονται μεγάλα κοκκώδη λεμφοκύτταρα και μικρά λεμφοκύτταρα. Τα μεγάλα κοκκώδη λεμφοκύτταρα είναι συχνότερα γνωστά ως φυσικά natural killer cells (NK cells). Τα μικρά λεμφοκύτταρα είναι τα κύτταρα T και

κύτταρα Β. Τα λεμφοκύτταρα διαδραματίζουν έναν σημαντικό και ακέραιο ρόλο στην υπεράσπιση του σώματος. Βρίσκονται διεσπαρμένα σε όλο το παρέγχυμα.

Τα λεμφοκύτταρα είναι:

1. **Κύτταρα T**
2. **Κύτταρα B**
3. **Natural Killer cells**

Τα NK κύτταρα αποτελούν ένα μέρος του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος και διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην υπεράσπιση του ξενιστή και από τους όγκους και στα μολυσμένα κύτταρα από ιούς. Ενεργοποιούνται σε απάντηση στις πρωτεΐνες που ονομάζονται ιντερφερόνες. Τα κύτταρα T και τα κύτταρα B είναι τα σημαντικότερα κυτταρικά συστατικά της ειδικής ανοσίας. Τα κύτταρα T περιλαμβάνονται στη κυτταρική ανοσία ενώ τα κύτταρα B είναι πρώτιστα αρμόδια για τη χυμική ανοσία (σχετικά με τα αντισώματα).

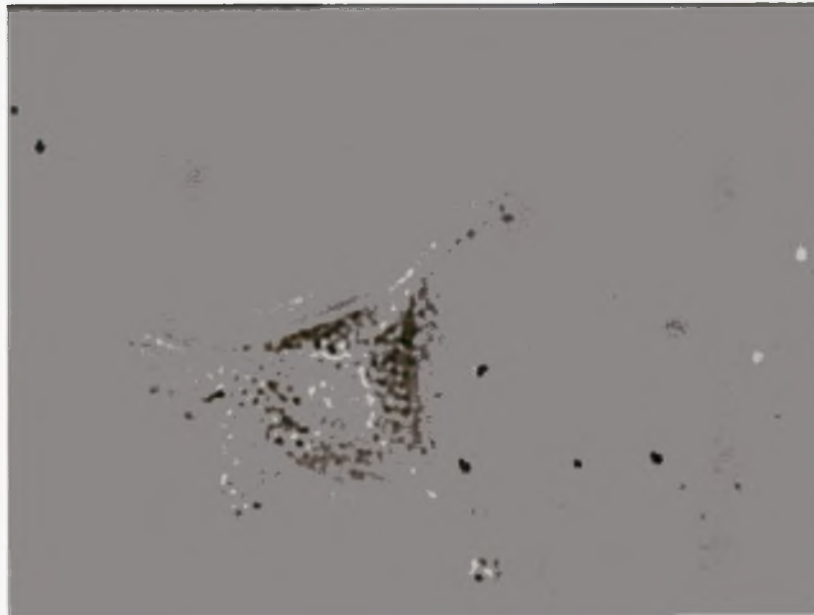


Σχήμα 12: Ένα χρωματισμένο λεμφοκύτταρο που περιβάλλεται από ερυθρά αιμοσφαίρια, ορατό με την χρήση ενός οπτικού μικροσκοπίου.

Το ήπαρ περιέχει επίσης διάφορους τύπους εδρευόντων αντιγόνων που παρουσιάζονται από τα κύτταρα που μπορούν να συλλάβουν τα αντιγόνα, τα οποία είτε περνούν μέσω του ήπατος είτε απελευθερώνονται υπό μορφή ταυτισμένου με κύτταρα αντιγόνου, όταν τα ηπατοκύτταρα μολύνονται από παθογόνα πεθαίνουν. Τα εδρεύοντα αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα περιλαμβάνουν τα κύτταρα Kupffer, τα οποία είναι μέλη των δικτυοενδοθηλιακών κυττάρων [39].

2.2.4 Stellate κύτταρα

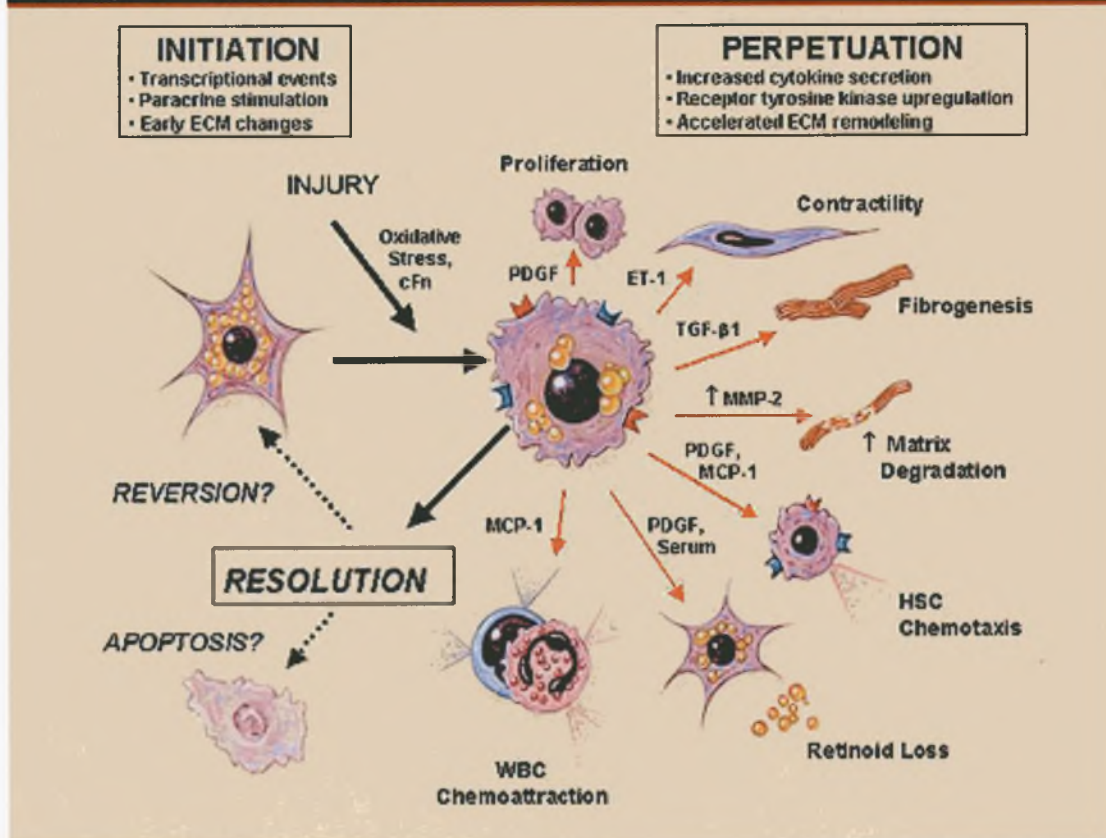
Τα Stellate κύτταρα, επίσης γνωστά ως κύτταρα Ito, βρίσκονται στο perisinusoidal διάστημα (μια μικρή περιοχή μεταξύ των τριχοειδών αγγείων και των ηπατοκυττάρων, αποκαλούμενη επίσης διάστημα Disse) του ήπατος. Το stellate κύτταρο είναι ο σημαντικότερος τύπος κυττάρων που περιλαμβάνεται στην ηπατική ίνωση, η οποία είναι ο σχηματισμός του ιστού σημαδιών σε απάντηση στη ζημία του ήπατος.



Σχήμα 13: Ένα stellate κύτταρο.

Στο φυσιολογικό ήπαρ, τα stellate κύτταρα περιγράφονται όντας σε ένα στάδιο ηρεμίας. Τα αδρανή stellate κύτταρα αντιπροσωπεύουν 5-8% του συνολικού αριθμού των ηπατικών κυττάρων. Κάθε κύτταρο έχει διάφορες επιμήκεις προεξοχές που επεκτείνονται από το κυτταρικό σώμα και περιβάλλονται γύρω από τα τριχοειδή. Τα σταγονίδια λιπιδίων στο κυτταρικό σώμα αποθηκεύουν βιταμίνη Α, η λειτουργία και ο ρόλος τους είναι ασαφή, αλλά πρόσφατα στοιχεία προτείνουν έναν ρόλο ως αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα που εδρεύουν στο ήπαρ.

Όταν το ήπαρ τραυματίζεται, τα stellate κύτταρα μπορούν να αλλάξουν σε μία ενεργοποιημένη κατάσταση (εικόνα 14). Το ενεργοποιημένο stellate κύτταρο χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό, τη συσταλτικότητα, και το χημειοτακτισμό. Το ποσό αποθηκευμένης βιταμίνης Α μειώνεται σταδιακά στον τραυματισμό ήπατος. Αυτός ο τύπος κυττάρου είναι επίσης αρμόδιος για την έκκριση του ιστού σημαδιών κολλαγόνων, ο οποίος μπορεί να οδηγήσει στην κίρρωση [40].



Σχήμα 14: Ένα αδρανοποιημένο stellate κύτταρο μπορεί να ενεργοποιηθεί μετά από τον τραυματισμό και με τους διαφορετικούς παράγοντες θα δώσει τα διαφορετικά αποτελέσματα.

2.9 Αναγέννηση ήπατος

Το ήπαρ έχει μια αξιοπρόσεκτη ικανότητα να αναπαράγεται μετά από τον τραυματισμό και να ρυθμίζει το μέγεθός του για να ταιριάζει με τον ξενιστή του. Μέσα σε μια εβδομάδα μετά από μερική ηπατεκτομή, η οποία, στις χαρακτηριστικές πειραματικές τοποθετήσεις συνεπάγεται τη χειρουργική αφαίρεση των δύο τρίτων του ήπατος, η ηπατική μάζα επιστρέφει ουσιαστικά σε αυτό που ήταν πριν από τη χειρουργική επέμβαση. Στις μελέτες, έχει καθιερωθεί ότι η μερική ηπατεκτομή οδηγεί σε ηπατική πολυπλοειδία, η οποία αναφέρεται στην αυξανόμενη περιεκτικότητα του πυρήνα σε DNA. Ο πολυπλοειδισμός ουσιαστικά είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των οργάνων και επιπλέον συνδέεται με τις υπερτροφικές απαντήσεις στους ιστούς [41]. Ένα φυσιολογικό ήπαρ περιέχει ηπατοκύτταρα με διαφορετικούς βαθμούς πλοειδίας. Ένας λόγος θα μπορούσε να είναι ότι τα πολυπλοειδή κύτταρα είναι σε πολλαπλασιαστική μειονεκτική θέση, όπως υποδεικνύεται από τις μελέτες σε

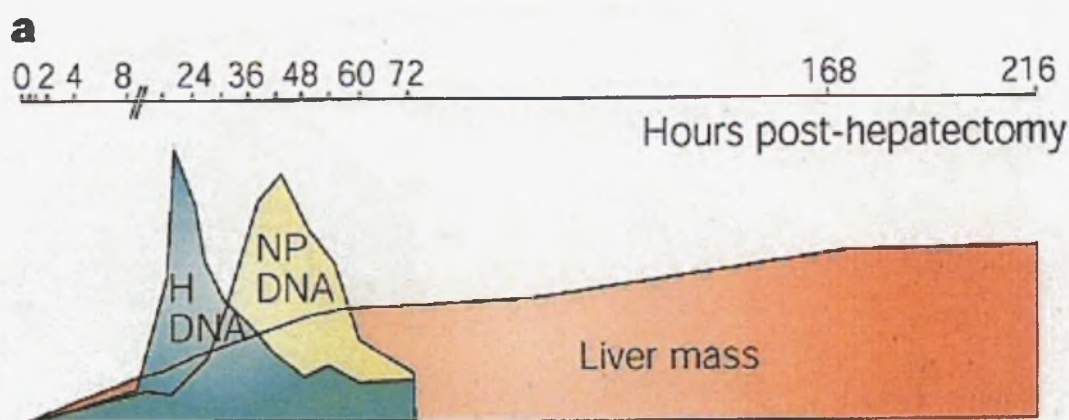
σωματικά κύτταρα θηλαστικών. Έχει διαπιστωθεί ότι η αρχή της πολυπλοειδίας αυξάνει την πιθανότητα του κυτταρικού θανάτου. Η αυξανόμενη κυτταρική πλοειδία θα μπορούσε να είναι επιβλαβής και μπορεί να προκαλέσει την απόρριψη οργάνων. Ομοίως, η αναπαραγωγική ικανότητα του ήπατος μειώνεται στα μεγαλύτερα σε ηλικία ζώα καθώς έχουν μεγαλύτερα ποσοστά των πολυπλοειδών ηπατοκυττάρων [42, 43].

Η κυτταροδιαίρεση είναι σπάνια στα ηπατοκύτταρα στο φυσιολογικό ενήλικο ήπαρ, δεδομένου ότι αυτά τα κύτταρα είναι στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου. Εντούτοις, μετά από το μερική ηπατεκτομή περίπου το 95% των ηπατικών κυττάρων γρήγορα ξαναμπαίνουν στον κυτταρικό κύκλο (σχήμα 15). Στο ήπαρ αρουραίων, το ποσοστό σύνθεσης DNA στα ηπατοκύτταρα αρχίζει να αυξάνεται μετά από περίπου 10-12 ώρες. Ακολούθως, τα επίπεδα σύνθεσης DNA στα ηπατοκύτταρα είναι χαμηλότερα, δεδομένου ότι η πλήρης αποκατάσταση της ηπατικής μάζας απαιτεί έναν μέσο όρο ~1,6 των κύκλων της αντιγραφής σε όλα τα κύτταρα. Η αρχή της σύνθεσης DNA είναι καλά συγχρονισμένη στα ηπατοκύτταρα, ξεκινώντας από τα κύτταρα που περιβάλλουν την πυλαία φλέβα του ηπατικού λοβού και προχωράει προς την κεντρική φλέβα. Η επίπτωση της μίτωσης (φάση M) είναι χαμηλότερη από αυτήν που προβλέπεται βάσει του αριθμού ηπατοκυττάρων που υποβάλλονται στη σύνθεση DNA, και της πλοειδίας των ηπατοκυττάρων και το ποσοστό των διπύρηνων κυττάρων αυξάνεται με τους διαδοχικούς κύκλους της σύνθεσης DNA, η οποία περιορίζει τελικά την περαιτέρω αναγέννηση [41, 42, 44, 45]. Επιπλέον, οι κερκάρδιοι ρυθμοί μπορεί να έχουν επιπτώσεις στο συγχρονισμό της σύνθεσης DNA και την έκφραση των κυκλινών μετά από τη μερική ηπατεκτομή [46]. Η μεγαλύτερη αύξηση στην ηπατική μάζα έχει πραγματοποιηθεί στις 3 πρώτες ημέρες μετά από μερική ηπατεκτομή και η αποκατάσταση μάζας είναι πλήρης σε 5-7 ημέρες [47].

Σε ζωικά πρότυπα, στα οποία τα ηπατοκύτταρα είναι άμεσα τραυματισμένα και με αυτόν τον τρόπο υποβλήθηκαν σε νέκρωση, ενεργοποιήθηκαν μονοπάτια αυξητικών παραγόντων και μονοπάτια που μεσολαβούν κυτοκίνες όπως συμβαίνει και μετά από μερική ηπατεκτομή [48]. Ο πολλαπλασιασμός των ηπατοκυττάρων εμπλέκεται επίσης στην αναγέννηση του ήπατος που πραγματοποιείται μετά από την μαζική νέκρωση ηπατοκυττάρων, ή την απόπτωση που προκαλούν οι ηπατικές τοξίνες. Όπως αναμένεται υπάρχουν επίσης και σημαντικές αλλαγές στην αρχιτεκτονική του ήπατος

κατά τη διάρκεια της αναγέννησής του και μετά από μερική ηπατεκτομή και μετά νέκρωση.

Τα μεμονωμένα ηπατοκύτταρα έχουν μια καταπληκτική αντιγραφική ικανότητα, καθώς μόνο μερικά ηπατοκύτταρα απαιτούνται για να αποκαταστήσουν την ηπατική μάζα μετά από βαθύ τραυματισμό του ήπατος [49, 50]. Πειράματα έδειξαν ότι οι παράγοντες αύξησης που είναι παρόντες στον ορό αρουραίων που έχουν υποστεί ηπατεκτομή μπορούν να προκαλέσουν την αντιγραφή ηπατοκυττάρων στα ζώα που έχουν φυσιολογικό ήπαρ [41].



Σχήμα 15: Μετά από το μερική ηπατεκτομή, η σύνθεση DNA στα ηπατοκύτταρα (Hepatocytes: πράσινο χρώμα) οξύνει περίπου στις 24 ώρες, ενώ η σύνθεση DNA στα μη-παρεγχυματώδη κύτταρα (NP: κίτρινο χρώμα) οξύνει περίπου σε 36-48 ώρες. Η εκ νέου συσσώρευση της μάζας συκωτιού (κόκκινο χρώμα) είναι πλήρης μέσα σε μια εβδομάδα.

2.10 Στόχοι της μελέτης

Ο κύριος στόχος μας σε αυτήν την μελέτη είναι να εξετάσουμε τις κινητικές της ηπατομεγαλίας που προκαλούνται από την επεξεργασία με PFOA και να μελετήσουμε την απόκριση δόσεων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις PFOA. Θα προσπαθήσουμε επίσης να απαντήσουμε στην ερώτηση: "Είναι ηπατομεγαλία εξαρτώμενη από τον πολλαπλασιασμό κυττάρων ή πρόκειται απλώς για διευρυμένα κύτταρα;"

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Χημικές ουσίες

Το PFOA αγοράστηκε από την εταιρία Aldrich Chemical Company (Steinheim, Γερμανία). Όλα τα υπόλοιπα υλικά και χημικές ουσίες ήταν αναλυτικού βαθμού και αποκτήθηκαν από τις κοινές πηγές εμπορίου.

3.2 Ζώα και μεταχείριση

Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση αυτών των πειραμάτων ήταν αρσενικά C57 Bl6 ποντίκια (από B&K Universal AB, Sweden) ηλικίας 5 εβδομάδων και το βάρος τους ήταν 21-25g. Για κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 10 ποντίκια, πριν από την έναρξη του πειράματος κρατήθηκαν στα κλουβιά ανά 5, αλλά στην αρχή του πειράματος στεγάστηκαν σε μεμονωμένα κλουβιά. Αυτά διατηρήθηκαν κάτω από έναν κύκλο φωτός 12 ωρών και σκοταδιού 12 ωρών.

Για το πρώτο πείραμα χρησιμοποιήσαμε 12 ποντίκια και τα χωρίσαμε σε 6 ομάδες. Τα ποντίκια μεταχειρίστηκαν με τις παρακάτω συγκεντρώσεις για 10 ημέρες:

Ομάδα 1: Control που ταΐζεται με την κανονική τροφή

Ομάδα 2: Ποντίκια που ταΐζονται με τροφή που περιέχει 0.0005% (w/w) PFOA

Ομάδα 3: Ποντίκια που ταΐζονται με τροφή που περιέχει 0.001% (w/w) PFOA

Ομάδα 4: Ποντίκια που ταΐζονται με τροφή που περιέχει 0.002% (w/w) PFOA

Ομάδα 5: Ποντίκια που ταΐζονται με τροφή που περιέχει 0.004% (w/w) PFOA

Ομάδα 6: Ποντίκια που ταΐζονται με τροφή που περιέχει 0.02% (w/w) PFOA

Συνεχίσαμε τα πειράματά μας με συγκέντρωση 0.001% PFOA. Αν και είναι μια χαμηλή συγκέντρωση και ίσως δεν έχει επιπτώσεις σε άλλα όργανα, συνεχίζει να έχει ακόμα αξιοπρόσεκτα αποτελέσματα στο ήπαρ. Τα ποντίκια χωρίστηκαν σε 2 ομάδες πέντε ζώων κάθε μία βάσει του βάρους τους, προκειμένου να ληφθεί περίπου το ίδιο μέσο βάρος σε κάθε ομάδα.

Ομάδα 1: Control: Ποντίκια που ταΐζονται με τη κανονική τροφή.

Ομάδα 2: Ποντίκια που ταΐζονται με τροφή που περιέχει 0.001% (w/w) PFOA.

Η διάρκεια της επεξεργασίας ήταν διαφορετική για κάθε ποντίκι. Τα ποντίκια σκοτώθηκαν ανά δύο (ένα από κάθε ομάδα) στην 1^η, 2^η, 3^η, 5^η και 10^η μέρα του πειράματος.

3.3 Προετοιμασία τροφής

Για να προετοιμάσουμε την τροφή που περιέχει 0.001% (w/w) PFOA, χρησιμοποιήθηκαν 1mg PFOA που διαλύθηκε σε 20ml ακετόνης και αναμίχθηκε με 100g τροφή σε σκόνη. Κατόπιν αφήσαμε την τροφή να ξεραθεί σε έναν απαγωγό για περίπου 2 ώρες. Η τροφή παρασκευάστηκε υπό μορφή “κέικ” με την προσθήκη 200ml νερού για κάθε 100g τροφής. Αφήσαμε το “κέικ” να ξεραθεί σε ένα πλέγμα κατά τη διάρκεια τουλάχιστον 2 ημερών, έπειτα τα τρόφιμα αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι τη χρήση. Στην πρώτη, την δεύτερη, τρίτη, πέμπτη και δέκατη ημέρα του πειράματος το ποσό τροφίμων που απέμεινε στα κλουβιά καθώς και τα ποντίκια ζυγίστηκαν, προκειμένου να καθοριστούν οι αλλαγές στην κατανάλωση τροφίμων. Όλες οι διαδικασίες που υιοθετήθηκαν εδώ εγκρίθηκαν εκ των προτέρων από τη βόρεια ηθική Επιτροπή της Στοκχόλμης για το ζωικό πειραματισμό.

3.4 Πρωτόκολλο

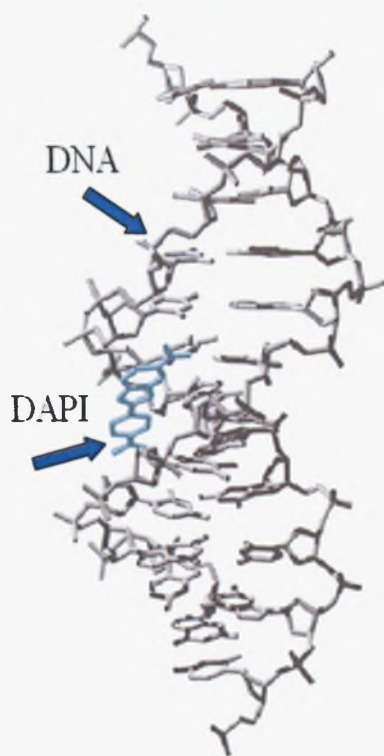
Τα ποντίκια σκοτώθηκαν κάτω από αναισθησία και θυσιάστηκαν έπειτα από αυχενική εξάρθρωση. Ποσότητα αίματος λήφθηκε από την καρδιά και το ήπαρ μετατέθηκε και κρατήθηκε σε PBS στον πάγο για να αποτραπεί η πιθανότητα θρόμβωσης.

Μετά από όλα αυτά ζυγίσαμε ολόκληρο το ήπαρ (υγρό βάρος), και το διαιρέσαμε σε 5 λοβούς. Ο μεγαλύτερος λοβός συμπίεστηκε σε δισκάκι, μονιμοποιήθηκε σε φορμαλίνη για 24 ώρες, κατόπιν μεταφέρθηκε στην αιθανόλη 70%, για τα φωτογραφικά slides μικροσκόπησης, και οι υπόλοιποι λοβοί ζυγίστηκαν και διατηρήθηκαν στους -70 ° C.

3.5 Προετοιμασία των ομογενοποιημάτων

Οι λοβοί κόπηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε Buffer A με σακχαρόζη 0,25M. Για την προετοιμασία των ομογενοποιημάτων, δοκιμάστηκαν δύο μέθοδοι. Η πρώτη ήταν με την βοήθεια μαχαιριών και η δεύτερη με υπέρηχους. Μετά από πολλές δοκιμές αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί η κατεργασία με υπέρηχους. Πρώτα επιλέχθηκε ένα από τα κομμάτια και κόπηκε σε μικρότερα κομμάτια. Σε κάθε δείγμα υπήρχε 20% ήπαρ και 80% Buffer A με σακχαρόζη 0,25M. Κατόπιν τα δείγματα αραιώθηκαν προς 1/40 και 1/80 και διαιρέθηκαν σε πολλά eppendorf προκειμένου αυτά να χρησιμοποιηθούν για τις μετρήσεις πρωτεΐνης και DNA.

3.6 Μέτρηση του DNA



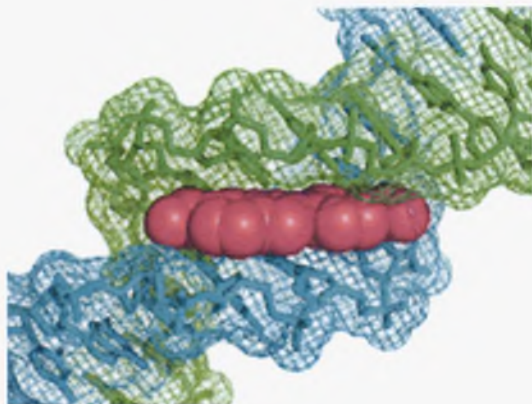
Η χρωστική ουσία φθορισμού 4,6-διαμίδιο-2-φαινοδολονικό (DAPI) συμπλέκεται με το DNA για να δώσει ένα προϊόν με ένταση φθορισμού 20 φορές μεγαλύτερη από αυτή της χρωστικής ουσίας μόνη της. Ο φθορισμός του συμπλέγματος DAPI-DNA είναι σχετικά απρόσβλητος από το pH μέσα στη κλίμακα του pH 5-10. Δεδομένου ότι το DAPI θα περάσει μέσω μιας άθικτης μεμβράνης κυττάρων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να χρωματίσει και τα ζωντανά και τα μονιμοποιημένα κύτταρα. Υπάρχουν επίσης στοιχεία ότι DAPI δεσμεύει στη μικρή αύλακα του DNA. Στη μικροσκόπηση φθορισμού, το DAPI διεγείρεται στο υπεριώδες φως.

Η αύξηση φθορισμού που παράγεται από το DNA των κυτταρικών ομογενοποιημάτων συγκρίνεται άμεσα με την αύξηση φθορισμού που παράγεται από τα πρότυπα DNA. Όλες οι μετρήσεις εκτελούνται στη σειρά χρησιμοποιώντας ένα απλό διάλυμα βαφής, παρέχοντας κατά συνέπεια έναν εσωτερικό έλεγχο. Αρχικά ο φθορισμός του Buffer A (2994 μ l) που περιέχει 6 μ l DAPI (50 μ g/ml) μετρήθηκε χωρίς ομογενοποίηση. Κατόπιν, προστέθηκε ένα υποπολλαπλάσιο (15 μ l) του κυτταρικού ομογενοποιήματος (που αραιώνεται 40 φορές) και ο φθορισμός ξαναμετρήθηκε. Αυτό ακολουθήθηκε από μία δεύτερη, τρίτη, και τέταρτη προσθήκη του ομογενοποιήματος έως ότου καθιερωθεί μια αξιόπιστη κλίση της αύξησης φθορισμού. Αφού καθοριστεί η κλίση για το ομογενοποίηση, υποπολλαπλάσια καθαρισμένων προτύπων DNA (DNA θύμων αδένων μόσχων 20 μ g/ml) προστίθεται και η κλίση για τα πρότυπα DNA καθορίζεται. Είναι εξαιρετικά σημαντικό τα πρότυπα DNA να έχουν μια σύνθεση βάσεων ίδια με αυτήν του DNA στο κυτταρικό ομογενοποίηση, γιατί το DAPI είναι ιδιαίτερα συγκεκριμένο για το ζευγάρι βάσεων αδερίνης-θυμίνης.

Μια σύγκριση της κλίσης του ομογενοποιήματος με την κλίση για τα πρότυπα DNA αποδίδει την περιεκτικότητα σε DNA του ομογενοποιήματος. Η χρήση εσωτερικών

προτύπων καθιστά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης DNA απλό, ακριβή αλλά ταυτόχρονα και πιο σημαντικό.

Δοκιμάσαμε επίσης μια άλλη μέθοδο για την μέτρηση του DNA χρησιμοποιώντας ένα black 96-well plate. Κάθε ένα “πηγαδάκι” γεμίστηκε με το τυποποιημένο διάλυμα (DNA θύμων αδένων μόσχων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις), κατόπιν προστέθηκε το Buffer A με DAPI, προκειμένου να υπάρξει η τυπική καμπύλη (standard curve). Για τα δείγματα τα “πηγαδάκια” γεμίστηκαν με Buffer A, με ομογενοποίηση και DAPI. Μετά από αυτήν την προετοιμασία, ο φθορισμός του πιάτου μετρήθηκε με φθορισμόμετρο. Κατόπιν εξετάζοντας την κλίση της standard curve υπολογίσαμε το περιεχόμενο του DNA στα ομογενοποιημένα.



Σχήμα 16: Το DAPI δέσμευεται στη μικρή αύλακα του DNA.

3.7 Μέτρηση των πρωτεϊνών

Προκειμένου να μετρηθεί η ποσότητα των πρωτεϊνών στο ήπαρ χρησιμοποιήσαμε την τυποποιημένη συσκευασία δοκιμής Bicinchoninic. Η αρχή της bicinchoninic όξινης δοκιμής (BCA) είναι παρόμοια με τη διαδικασία Lowry, δεδομένου ότι και οι δύο στηρίζονται στο σχηματισμό ενός Cu^{+2} - πρωτεϊνικού σύνθετου υπό τους αλκαλικούς όρους, που ακολουθείται από τη μετατροπή του Cu^{2+} σε Cu^{+} . Το ποσό μείωσης είναι ανάλογο προς την παρούσα πρωτεΐνη. Το BCA σχηματίζει ένα πορφυρό-μπλε (μοβ) σύνθετο με Cu^{+} στα αλκαλικά περιβάλλοντα, παρέχοντας κατά συνέπεια μια βάση για να ελέγξει τη μείωση του αλκαλικού Cu^{2+} από τις πρωτεΐνες.

Η δοκιμή BCA έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες πρωτεϊνικές τεχνικές προσδιορισμού:

- Ⓐ Είναι εύχρηστη
- Ⓐ Το έγχρωμο σύνθετο που σχηματίζεται, είναι σταθερό
- Ⓐ Υπάρχει λιγότερη ευαισθησία στα απορρυπαντικά
- Ⓐ Ισχύει σε μια ευρεία σειρά των πρωτεϊνικών συγκεντρώσεων.

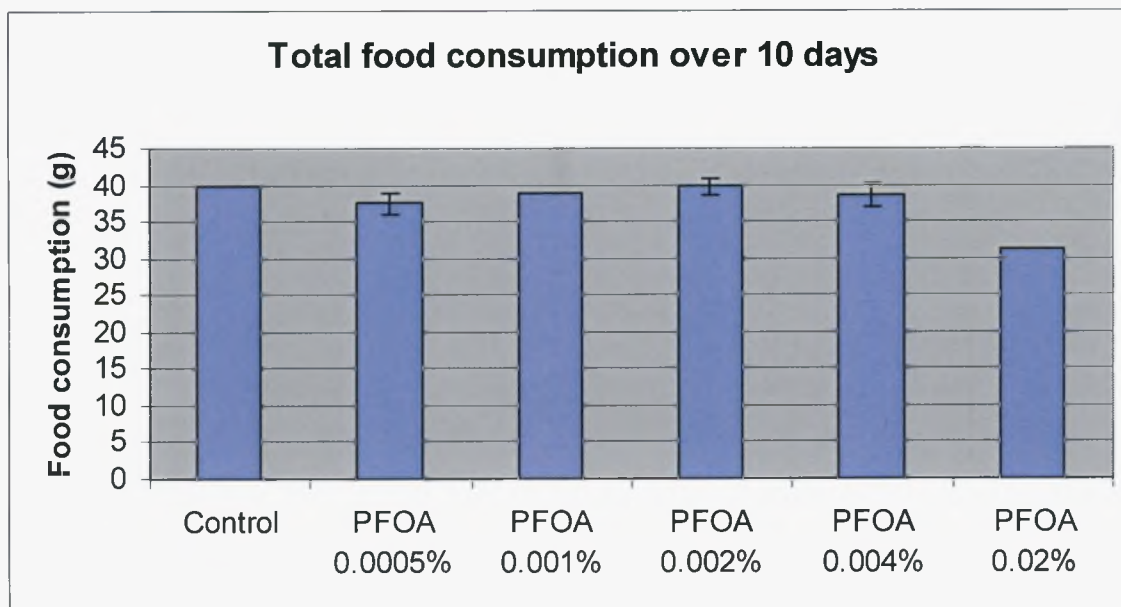
Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήσαμε για αυτήν την μέθοδο είναι:

- Ⓐ Διάλυμα οξέος Bicinchoninic (αντιδραστήριο A)
- Ⓐ Pentahydrate 4% θεικού άλατος χαλκού διάλυμα (αντιδραστήριο B)
- Ⓐ Πρωτεϊνικό τυποποιημένο διάλυμα

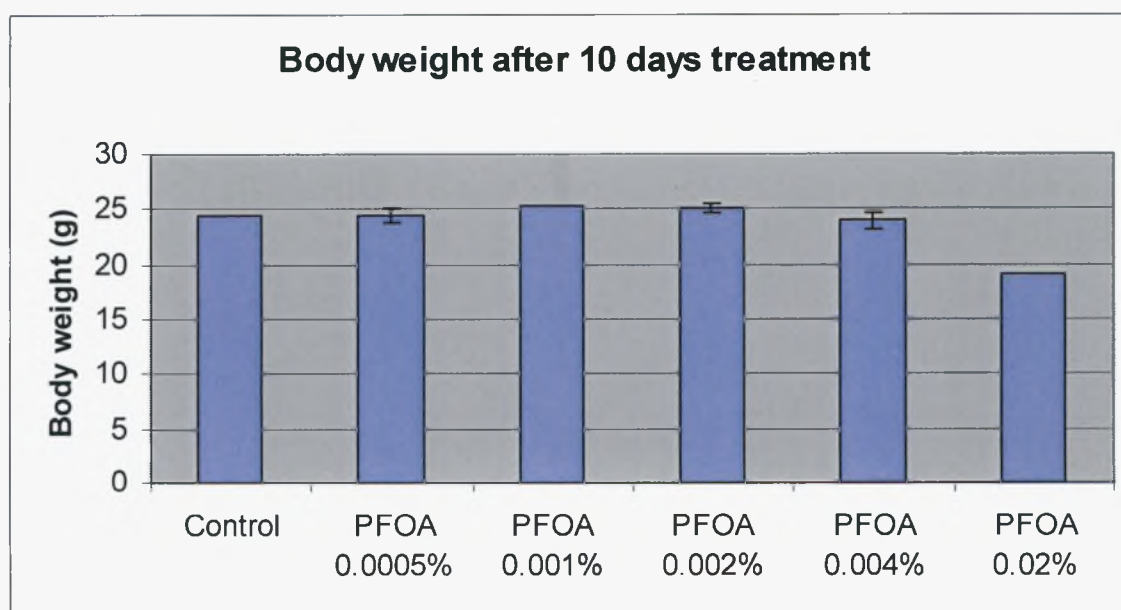
Το αντιδραστήριο BCA προετοιμάζεται με τη μίξη 50 μερών του αντιδραστηρίου A με 1 μέρος του αντιδραστηρίου B, που το αναμιγνύουμε έως ότου παίρνει ένα ανοικτό πράσινο χρώμα. Για το standard αναμιγνύουμε 20 μέρη του αντιδραστηρίου BCA με 1 μέρος ενός πρωτεϊνικού δείγματος και για το 96-well plate, 8 μέρη του αντιδραστηρίου BCA αναμιγνύονται με 1 μέρος ενός πρωτεϊνικού δείγματος. Οι δοκιμές BCA εκτελούνται συνήθως στους 37 ° C. Η ανάπτυξη του χρώματος αρχίζει αμέσως και μπορεί να επιταχυνθεί με επώαση σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Επώασαμε το πιάτο για 30 λεπτά και η απορροφητικότητα στα 562nm καταγράφεται. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση καθορίζεται σε σύγκριση με μια τυπική καμπύλη (standard curve).

4. Αποτελέσματα

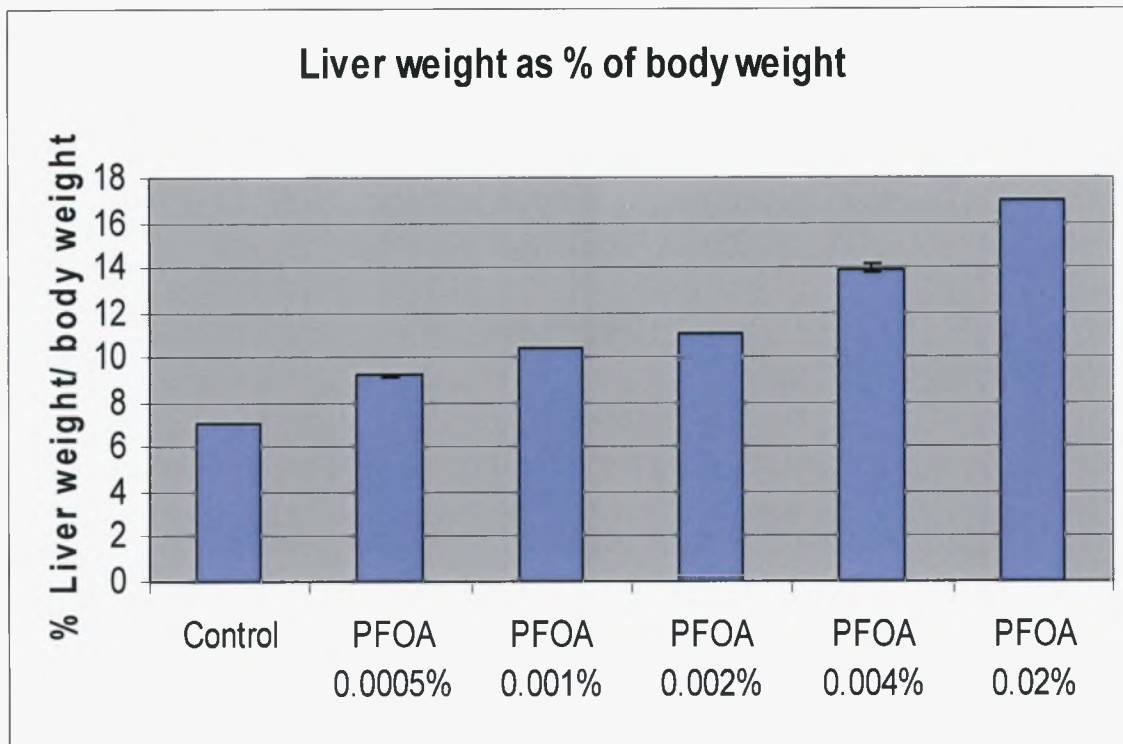
Στο πρώτο πείραμα θελήσαμε να ελέγξουμε τη διαφορά μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων PFOA στη διατροφή. Γι' αυτό, χωρίσαμε τα ποντίκια σε 6 ομάδες, σε καθεμία δόθηκε διαφορετική συγκέντρωση PFOA στην τροφή τους. Από το πείραμα διαπιστώσαμε ότι όλες οι ομάδες κατανάλωσαν τα ίδια ποσά τροφίμων, εκτός από την τελευταία ομάδα που είχε την υψηλότερη δόση PFOA (διάγραμμα 17). Επίσης ζυγίσαμε τα ποντίκια μετά από τις 10 ημέρες της επεξεργασίας και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο η τελευταία ομάδα με την υψηλότερη δόση έχασε βάρος (διάγραμμα 18).



Σχήμα 17: Η συνολική κατανάλωση τροφής σε διάστημα 10 ημερών των έξι ομάδων ποντικών που μεταχειρίστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις PFOA.

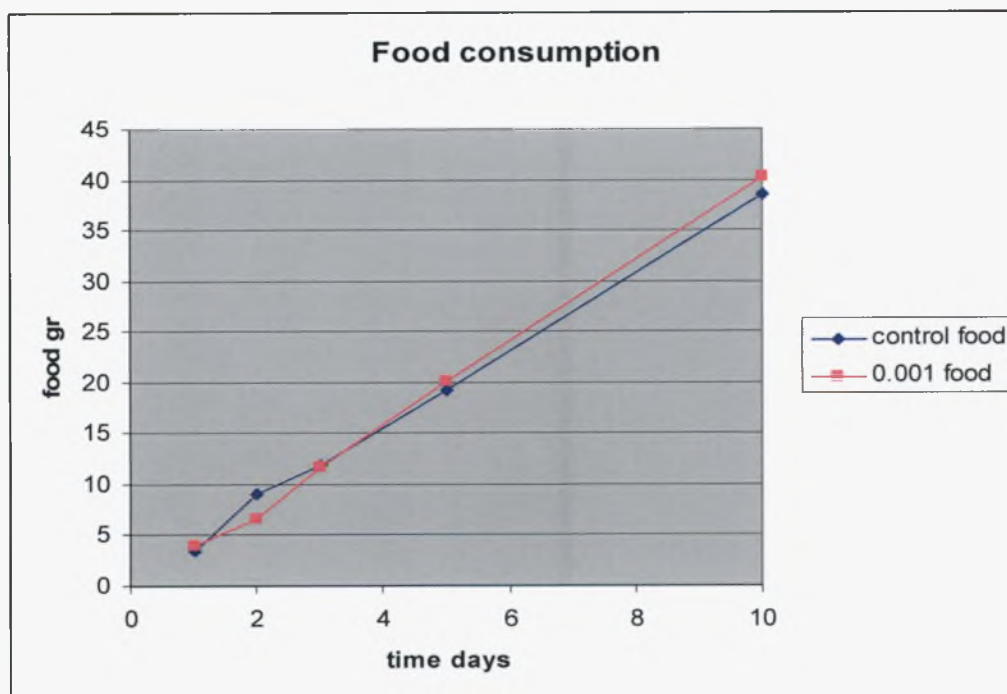


Σχήμα 18: Τα βάρη σωμάτων των ποντικών μετά από την επεξεργασία 10 ημερών με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις PFOA.

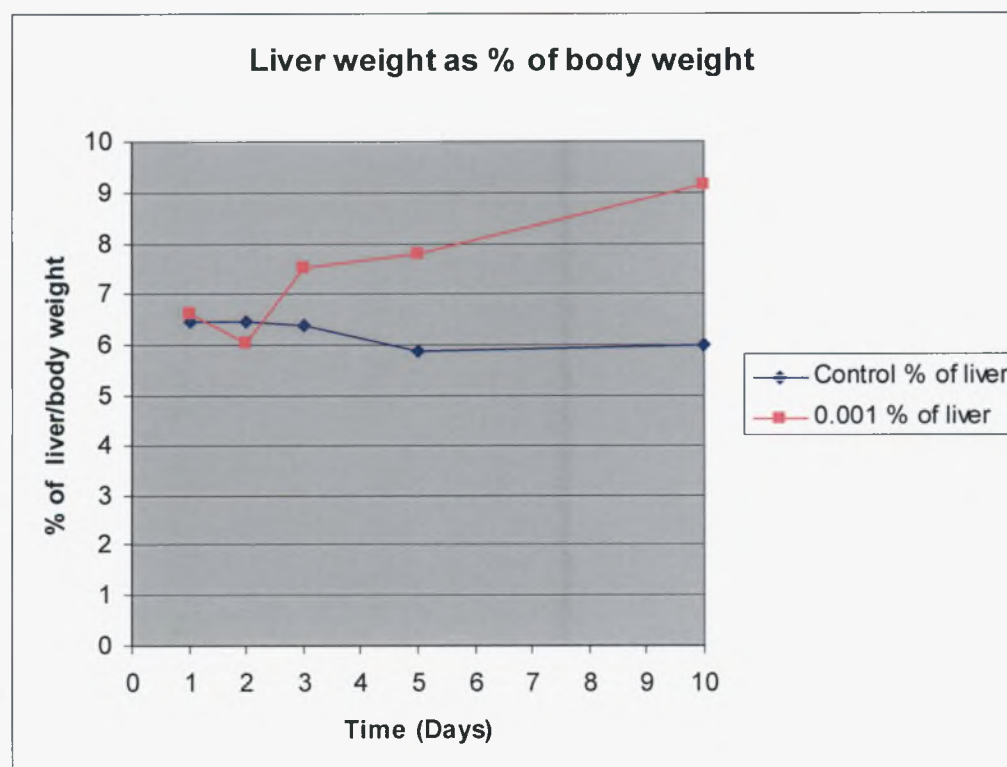


Σχήμα 19: Το ηπατικό βάρος που εκφράζεται ως ποσοστό του βάρους σωμάτων. Σε αυτό το διάγραμμα μπορούμε να δούμε ότι το ήπαρ γίνεται μεγαλύτερο καθώς το σωματικό βάρος μειώνεται. Έτσι φαίνεται ότι τα ποντίκια της τελευταίας ομάδας έχουν το μεγαλύτερο ήπαρ.

Μετά από αυτό το πρώτο πείραμα αποφασίστηκε να συνεχιστούμε με ένα άλλο με τη χαμηλότερη δόση PFOA που όμως έχει αξιοπρόσεκτα αποτελέσματα στο ήπαρ. Υπήρξαν 5 ποντίκια σε κάθε μια από τις 2 ομάδες. Ένα control και ένα PFOA (0,001%). Τα ποντίκια σκοτώθηκαν ανά 2 (ένα από κάθε ομάδα) μετά από 1, 2, 3, 5 και 10 ημέρες. Τα αποτελέσματα δίνονται κατωτέρω.

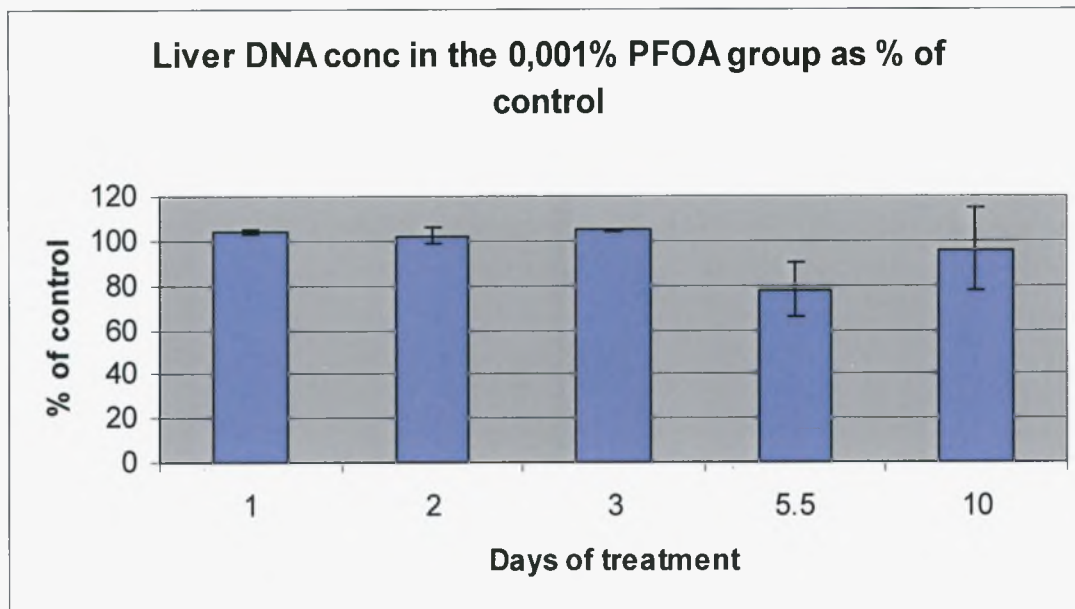


Σχήμα 20: Σε αυτό το διάγραμμα παρουσιάζεται η κατανάλωση τροφής των δύο ομάδων. Όπως μπορούμε να δούμε, οι δύο ομάδες κατανάλωσαν σχεδόν ίδια ποσότητα τροφής.



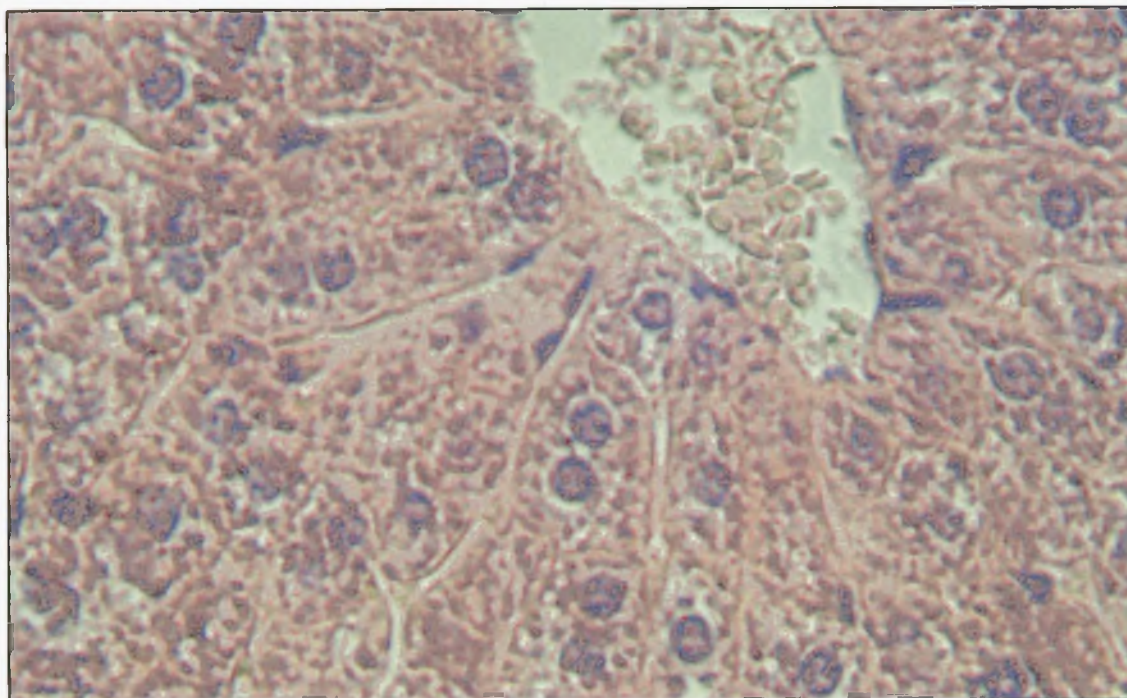
Σχήμα 21: Το ηπατικό βάρος που εκφράζεται ως ποσοστό του βάρους σωμάτων. Το αποτέλεσμα είναι ότι μετά από την τρίτη ημέρα το ήπαρ γίνεται μεγαλύτερο.

Έπειτα μετρήσαμε τη συγκέντρωση DNA στο ήπαρ με φθορισμόμετρο.

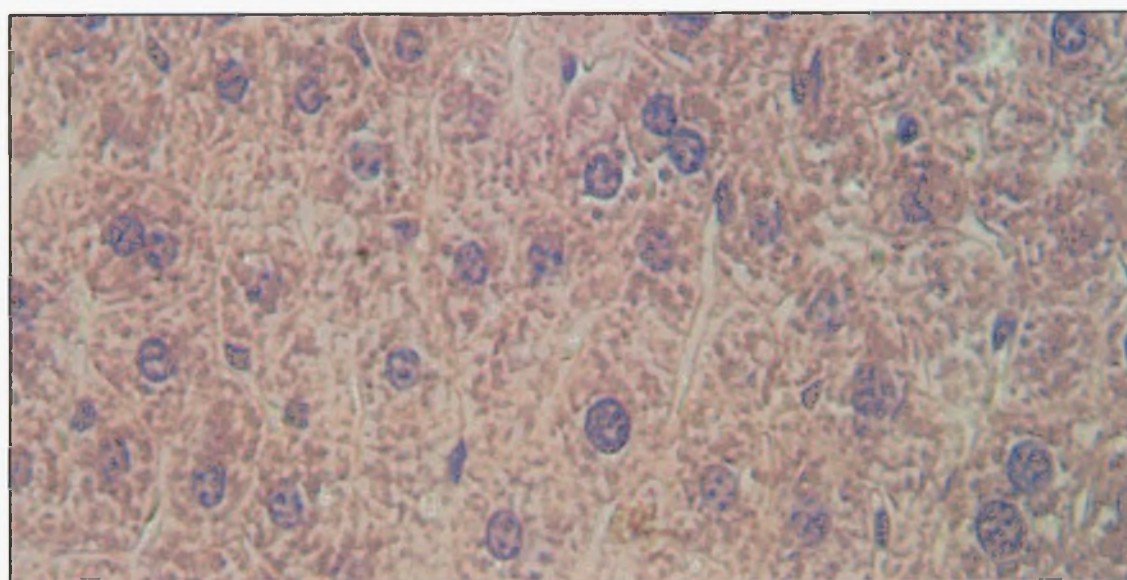


Σχήμα 22: Σύγκριση της συγκέντρωσης του DNA στο ήπαρ ποντικών που ταΐστηκαν με PFOA (0,001%) με αυτήν του control και εδώ εκφράζεται ως ποσοστό.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος κρατήσαμε έναν λοβό από κάθε συκώτι σε δισκάκι που μονιμοποιήθηκε σε φορμαλίνη και που διατηρήθηκε έπειτα στην αιθανόλη. Αυτοί οι λοβοί στάλθηκαν στο ίδρυμα Karolinska, τμήμα Ογκολογίας & Παθολογίας προκειμένου να γίνουν τα φωτογραφικά slides μικροσκόπησης. Κατωτέρω παρουσιάζονται δύο από αυτές, μία control και μια PFOA.



Σχήμα 23: Στην φωτογραφία φαίνεται ένα τμήμα ήπατος ενός ποντικιού control.



Σχήμα 24: Μια εικόνα από ήπαρ ποντικού που τράφηκε με PFOA 0,001%.

5. Συζήτηση

Τα προηγούμενα συμπεράσματα- ευρήματα από το εργαστήριο έχουν αποδείξει ότι οι διαιτητικές εκθέσεις των “επίμονων” περιβαλλοντικών ρύπων ειδικά του PFOA στα ποντίκια προκαλούν συνδυαστικά αποτελέσματα, όπως σοβαρούς πολλαπλασιασμούς υπεροξεισωμάτων, ηπατομεγαλία ή υπερτροφία ήπατος, απώλεια όρεξης ή

θερμιδικούς περιορισμούς. Αυτά τα αποτελέσματα φάνηκαν κυρίως κατά τις διαιτητικές επεξεργασίες των ποντικιών με 0,02% PFOA για 10 ημέρες.

Υπάρχουν αρκετά στοιχεία για να αποδειχθεί η ύπαρξη PFOA στο περιβάλλον. Αυτό το ξеноβιοτικό είναι πολύ σημαντική πρώτη ύλη που ήταν σε χρήση από τη δεκαετία του '50 και ακόμη χρησιμοποιείται παγκοσμίως στην τεχνολογικά-κατακλυσμένη εποχή μας λόγω της χημικής σταθερότητας και της αντοχής της, γι' αυτό αυτή η ένωση θα εμμένει ακόμη για πολλά περισσότερα έτη.

Το πρώτο πείραμα έγινε προκειμένου να συγκριθούν οι διαφορετικές συγκεντρώσεις PFOA στα ποντίκια. Αρχίσαμε με τη χαμηλότερη συγκέντρωση 0,0005% και τελειώσαμε με την υψηλότερη 0,02%. Δεν θελήσαμε να χρησιμοποιήσουμε μια υψηλότερη δόση από αυτή, επειδή γνωρίζουμε από προηγούμενα πειράματα ότι τα ποντίκια πεθαίνουν σε υψηλότερες δόσεις. Τα ποντίκια ταΐστηκαν με αυτές τις συγκεντρώσεις για 10 ημέρες. Από αυτό το πείραμα συνειδητοποιήσαμε ότι τα ποντίκια που κατανάλωσαν τροφή με συγκέντρωση PFOA 0,0005%, 0,001%, 0,002% και 0,004% δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε απώλεια όρεξης, αντίθετα με τα ποντίκια που ταΐστηκαν με 0,02% PFOA (διάγραμμα 17). Στην πρώτη και στην τελευταία ημέρα του πειράματος ζυγίσαμε τα ποντίκια προκειμένου να φανεί η διαφορά όσο αναφορά το βάρος τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ποντίκια δεν κέρδισαν ή έχασαν βάρος εκτός από αυτά που ταΐστηκαν με 0,02% PFOA (διάγραμμα 18). Αυτά τα ποντίκια έχασαν βάρος λόγω της απώλειας όρεξης που προκαλούν τα PFOA.

Αφού σκοτώσαμε τα ποντίκια ζυγίσαμε το ήπαρ τους, επειδή θελήσαμε να δούμε εάν υπήρξε οποιαδήποτε διαφορά. Φάνηκε ότι τα ποντίκια που ταΐστηκαν με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις PFOA είχαν τα βαρύτερο και μεγαλύτερο ήπαρ. Προκειμένου να υπάρξει μια καλύτερη άποψη εκφράσαμε το ηπατικό βάρος ως ποσοστό του βάρους σωμάτων (διάγραμμα 19). Από το διάγραμμα 19 είναι προφανές ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση PFOA αυξάνεται και το ποσοστό επίσης. Κατά συνέπεια μπορούμε να καταλάβουμε ότι τα ποντίκια που ταΐστηκαν με την υψηλότερη δόση PFOA είχαν διευρύνει το ήπαρ τους και επίσης έχασαν βάρος. Έτσι τα στοιχεία από αυτό το πείραμα επιβεβαιώνουν τα προηγούμενα συμπεράσματα της ομάδας (απώλεια όρεξης και υπερτροφία ήπατος στα ποντίκια που αντιμετωπίζονται με 0,02% PFOA).

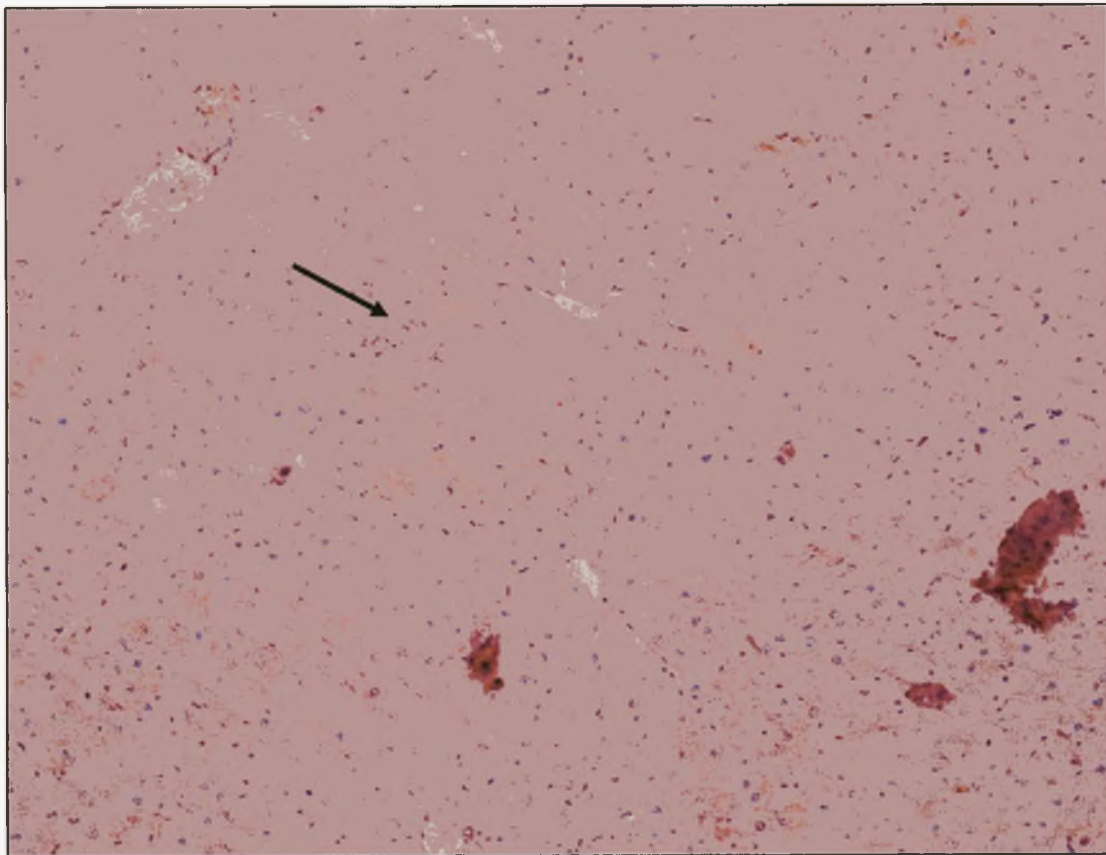
Υπήρξε έτσι η ανάγκη για μας να εκθέσουμε τα ζώα στις χαμηλότερες ή ελάχιστες δόσεις για να μελετήσουμε τα αποτελέσματα που βλέπουμε στα ποντίκια και επίσης για να ερευνήσουμε εάν αυτά τα αποτελέσματα που φάνηκαν στις βέλτιστες εκθέσεις

δόσεων θα μπορούσαν ή όχι να αποσυνδεθούν μεταξύ τους. Με αυτόν τον τρόπο συνεχίσαμε με το επόμενο πείραμα που ήταν μια κινητική μελέτη PFOA 0,001%. Τα ποντίκια χωρίστηκαν σε 2 ομάδες με πέντε ποντίκια κάθε μία, ένα control και ένα 0,001% PFOA σε κάθε ομάδα. Ένα ζώο από κάθε ομάδα σκοτωνόταν μετά από την 1^η ημέρα του πειράματος, την 2^η, την 3^η, την 5^η και 10^η της θεραπείας.

Αυτή η επεξεργασία με την χαμηλότερη συγκέντρωση PFOA (μόνο 0.001%) έδειξε ότι δεν έχει επιπτώσεις στην κατανάλωση τροφίμων (διάγραμμα 20). Είναι σαφές ότι η ομάδα control και η ομάδα PFOA είχαν το ίδιο σχέδιο σίτισης. Δεν υπήρξε καμία απώλεια όρεξης σε καμία από τις δύο ομάδες. Επαναλάβαμε αυτό το πείραμα και τα αποτελέσματα ήταν ακριβώς τα ίδια, οι δύο ομάδες κατανάλωσαν τα ίδια ποσά τροφίμων.

Η διαδικασία ήταν η ίδια με το πρώτο πείραμα, ζυγίσαμε το ήπαρ και τα αποτελέσματα που πήραμε ήταν αξιοπρόσεκτα. Για μια καλύτερη άποψη το ηπατικό βάρος εκφράστηκε ως ποσοστό του σωματικού βάρους (διάγραμμα 21). Είναι προφανές ότι 0,001% PFOA οδηγεί σε υπερτροφία ήπατος.

Τα προηγούμενα πειράματα της ομάδας δείχνουν ότι υψηλότερες συγκεντρώσεις PFOA, προκαλούν απόπτωση στα κύτταρα ήπατος (εικόνα 25). Αυτός ήταν και ο λόγος για τον οποίο επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε συγκέντρωση 0,001% PFOA, για να αποφύγουμε την απώλεια βάρους όπως επίσης και την απόπτωση. Τα αποτελέσματα που παίρνουμε μετά από την κατεργασία με 0,001% PFOA είναι: κανένα σημάδι απόπτωσης ή νέκρωσης αλλά όμως υπάρχει ακόμη υπερτροφία, που αποδεικνύει ότι δεν χρειάζεται να υπάρχει ζημία στο συκώτι όσο αναφορά την απόπτωση ή την νέκρωση, κυτταρικός θάνατος για να προκληθεί υπερτροφία.



Σχήμα 25: Μια εικόνα ενός προηγούμενου πειράματος της ομάδας. Τα ποντίκια ταΐστηκαν με 0,02% PFOA. Η ροζ περιοχή είναι αποπτωτικά κύτταρα.

Τα slides από το πείραμα δεν παρουσιάζουν κανένα σημάδι απόπτωσης, και επίσης μπορούμε να δούμε τις διαφορές μεταξύ της control και της ομάδας που ταΐστηκε με PFOA (σχήμα 23 και σχήμα 24). Αρχικά το ήπαρ των ποντικών που τράφηκαν με 0,001% PFOA είχε μεγαλύτερα ηπατοκύτταρα. Δεύτερον στο ήπαρ του ποντικιού που ήταν στην ομάδα των control μπορούμε να δούμε κύτταρα με γλυκογόνο (άσπρος ιστός στα κύτταρα) αλλά υπάρχει λιγότερο ή καθόλου γλυκογόνο στο κατεργασμένο με PFOA ήπαρ. Τέλος, στο κατεργασμένο με PFOA ήπαρ υπήρξαν έγκλειστα σωματίδια άγνωστης προέλευσης.

Ένας από τους στόχους μας ήταν να καθοριστεί εάν η ηπατομεγαλία εξαρτάται από τον πολλαπλασιασμό κυττάρων ή πρόκειται απλώς για διευρυμένα κύτταρα. Προκειμένου να απαντηθεί αυτή η ερώτηση μετρήσαμε την περιεκτικότητα σε DNA. Αυτό ολοκληρώθηκε με DAPI, μία χρωστική φθορισμού που δεσμεύεται έντονα στο DNA. Συγκρίναμε τη συγκέντρωση DNA στο ήπαρ ποντικών που τράφηκαν με PFOA με αυτήν του control και το εκφράσαμε ως ποσοστό (σχήμα 22). Τα

αποτελέσματα δεν ήταν αυτή τη φορά τόσο σαφή, η συγκέντρωση DNA έμεινε σταθερή κατά τη διάρκεια των τριών πρώτων ημερών του πειράματος. Η μόνη διαφορά είναι στην δέκατη ημέρα όπου φαίνεται ότι το ποσοστό αυξήθηκε. Αυτό σημαίνει ότι ίσως η σύνθεση DNA αρχίζει την δέκατη ημέρα. Από το σχήμα 20 μπορούμε να δούμε ότι η υπερτροφία ήπατος αρχίζει την ημέρα 3, έτσι συμπεραίνουμε ότι η σύνθεση DNA έρχεται αργότερα από την ηπατική υπερτροφία. Μετρήσαμε επίσης τις ποσότητες της πρωτεΐνης στα ηπατικά κύτταρα, αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν σαφή παρά τις πολλές επαναλήψεις και αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο δεν περιλαμβάνονται σε αυτήν την έκθεση.

6. Συμπεράσματα

Αυτό που επιτυγχάνεται από αυτήν την εργασία είναι ίσως μια αρχή στη μελέτη των αποτελεσμάτων από τους πολλαπλασιαστές υπεροξεισωμάτων, πώς αυτοί εμπλέκονται στην πιθανή βιοσυσσώρευση και φυσιολογικά και περιβαλλοντικά, πώς μπορούν να υπολογιστούν οι συνέπειες στους ζωικούς και στους ανθρώπινους ιστούς και στο μεταβολισμό σωμάτων, ποιες θα είναι οι συνέπειες σε πιο μακροχρόνια διάρκεια έκθεσης όπως μήνες, έτη και τέλος πόσο υψηλός είναι ο κίνδυνος ότι η χαμηλότερη συγκέντρωση βαθμιαία με το χρόνο προκαλεί τα αποτελέσματα που βλέπουμε στις εκθέσεις σε υψηλότερες δόσεις.

Λαμβάνοντας υπόψη τις τάσεις των PPs στην βιοσυσσώρευση, εν τούτοις μπορεί να υπάρξουν κίνδυνοι υγείας στη χαμηλότερη συγκέντρωση ή σε εκθέσεις ελάχιστων δόσεων καθώς οι πολλαπλασιαστές υπεροξεισωμάτων βιοσυσσωρεύονται στα όργανα όπου εκφράζονται οι υποδοχείς PPARα όπως είναι ο νεφρός, η καρδιά, και ειδικά το ήπαρ, προκαλώντας τα αποτελέσματα που φαίνονται στις εκθέσεις σε μεγαλύτερες δόσεις δηλαδή ένας κίνδυνος χαμηλής-ισόπεδης-καθυστερημένης-επίδρασης. Αυτή η διαδικασία εντούτοις θα εξαρτηθεί από το μεταβολισμό του οργανισμού όσον αφορά την ηλικία, το φύλο, και το είδος όπως επίσης και το περιβάλλον.

Τα στοιχεία που συλλέγονται από αυτήν την ανάλυση προτείνουν ότι η σύνθεση DNA έρχεται αργότερα από την υπερτροφία του ήπατος. Οι τομές που χρησιμοποιήθηκαν για παρατήρηση στο μικροσκόπιο έδειξαν ότι τα ποντίκια που μεταχειρίστηκαν με PFOA είχαν διευρυμένα ηπατοκύτταρα, είχαν λιγότερο ή καθόλου γλυκογόνο, κανένα σημάδι απόπτωσης, νέκρωσης ή μίτωσης αλλά περιείχαν έγκλειστα σωματίδια άγνωστης προέλευσης.

Οι μελλοντικές μελέτες θα αποδείξουν εάν η υπερτροφία ήπατος εξαρτάται από τον πολλαπλασιασμό κυττάρων ή τη διεύρυνση των κυττάρων με αυξανόμενη περιεκτικότητα σε DNA. Τα πειράματα συνεχίζονται και οι μελέτες που πρέπει να ακολουθήσουν τώρα είναι κυτταρομετρία ροής - ανάλυση FACS και Western blot για τις πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου.

7. Ευχαριστίες

Θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω βαθιά όλους τους ανθρώπους που με βοήθησαν για να πραγματοποιήσω αυτό το πρόγραμμα, ειδικότερα:

- ☉ Τους Καθηγητές Joe DePierre, Δημήτριο Κουρέτα και Stefan Nobel που μου έδωσαν την ευκαιρία να εργαστώ σε αυτό το πρόγραμμα, για την εποπτεία και τη διόρθωση της εργασίας μου.
- ☉ Τον Διδάκτωρ Manucher Abedi-Valugerdι, την διδακτορική φοιτήτρια Mousumi Rahman Qazi, τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Kim Blom και Hedvig Idhammar που μου έδειξαν όλες τις τεχνικές στο εργαστήριο και ήταν πάντα τόσο ευγενικοί και υπομονετικοί μαζί μου.
- ☉ Τους συμφοιτητές μου Jose, Cynthia και ειδικά την Έφη που όλοι τους έκαναν την εργασία μου και την περίοδο στην “ομάδα-PFOA” ευχάριστη και διασκεδαστική που θα θυμάμαι πάντα.

8. Βιβλιογραφία

- [1] N. Kudo and Y. Kawashima, Toxicity and toxicokinetics of Perfluorooctanoic acid in humans and animals. *J. Toxicol. Sci.*, **28**:49-57, 2003
- [2] Q. Yang, Y.Xie and J.W.DePierre Effects of peroxisome proliferators on the thymus and spleen of mice, *Clin Exp Immunol*, **122**:219-26, 2000
- [3] J.M. Thorp and W.S. Waring, Modification of metabolism and distribution of lipids by ethyl chlorophenoxyisobutyrate, *Nature*, **194**:948-949, 1962
- [4] www.pfoa.com
- [5] www.pfoa-facts.com
- [6] www.epa.gov
- [7] P.B. Lazarow and C. Deduve, A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug, *Proc. Natl. Acad. Science USA*, **73**:2043-2046, 1976

- [8] B. Chance, H. Sies and A. Boveris, Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs, *Physiol. Rev.*, **59**:527-605, 1976
- [9] Qian Yang, Modulation of Adaptive Immune Responses in Mice upon Exposure to Peroxisome Proliferators, 2001 PhD Dissertation thesis Stockholm University
- [10] Qian Yang, Yi Xie, Anna Messing Eriksson, B. Dean Nelson and Joseph W. DePierre, Further evidence for the involvement of inhibition of cell proliferation and development in thymic and splenic atrophy induced by the peroxisome proliferators Perfluorooctanoic acid in mice, *Biochemical Pharmacology*, **62**:8:1133-1140, 2001
- [11] Exposure to Peroxisome Proliferators: Reassessment of the Potential Carcinogenic Hazard, *Environmental Health perspectives*, **109**:10, 2001
- [12] G.E. Paget Experimental studies of the toxicity of atomid with particular reference to the fine structural changes in the livers of rodents. *J. Atheroscler. Res.*, **3**:729-736, 1963
- [13] J.K. Reddy, D.L. Azarnoff, D.J. Svoboda and J.D. Prasad, Nafenopin-induced hepatic microbody (peroxisome) proliferation and catalase synthesis in rats and mice. *J.Cell Biol.*, **61**:344-358, 1974
- [14] J.K. Reddy and Krishnakantha, Hepatic peroxisome proliferation: induction by two novel compounds structurally unrelated to clofibrate, *Science*, **190**:787-789, 1975
- [15] L. Gelman, J.C. Fruchart and J. Auwerx, An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol. Life Sci.*, **55**:932-943, 1999
- [16] R.C. Cattley, J. DeLuca, C.Elcombe, P. Fenner-Crisp, B.G. lake, D.S. Marsman, T.A. Pastoor, J.A. Popp, D.E. Robinson, B. Schwetz, J.Tugwood and W.Wahli, Do peroxisome proliferating compounds pose a hepatocarcinogenic hazard to humans? *Regul. Toxicol.Pharmacol*, **27**:47-60, 1998
- [17] S. Sorof , Modulation of mitogenesis by liver fatty acid binding protein. *Cancer Met. Rev*, **13**:317-336, 1997
- [18]Lemberger T, Desvergne B and Wahli W, Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signalling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**:335-63, 1996
- [19] V. Laudet, C.Hanni, J. Coll, F. Catzeflis and D. Stehelin, Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.*, **11**:1003-1013, 1992
- [20] Jeffrey M. Peters, Ivan Rusyn, Michelle L.Rose, Frank J. Gonzalez, Ronald G. Thurum, peroxisome proliferator-activated receptor α is restricted to hepatic parenchymal

cells, not Kupffer cells: implications for the mechanism of action of peroxisome proliferator in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* Vol **21**, 823-826, 2000

[21] H.E. Xu, M.H. Lambert, V.G. Montana, D.J. Parks, S.G. Blanchard, P.J. Brown, D.D. Sternbach, J.M. Lehmann, G.B. Wisely, T.M. Willson, S.A. Kliewer and M.V. Milburn, Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol. Cell*, **3**:397-403, 1999

[22] Y. Zhu, C. Qi, C. Calandra, M.S. Rao and J.K. Reddy, Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Gene Expr.*, **6**:185-195, 1996

[23] Y. Zhu, C. Qi, S. Jain, M.S. Rao and J.K. Reddy, Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J. Biol. Chem.*, **272**:25500-25506, 1997

[24] Gelman L, Fruchart JC and Auwerx J, An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol Life Sci* **55**: 932-43, 1999

[25] Pineda Torra I, Gervois P and Staels B, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging. *Curr Opin Lipidol* **10**:151-9, 1999

[26] Neve BP, Fruchart JC and Staels B, Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol* **60**:1245-50, 2000

[27] Lim H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM and Dey SK, Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev* **13**:1561-74, 1999

[28] Jihan Youssef & Mostafa Bads, Biology of senescent hier Peroxisomes: Role in Hepatocellular Aging and Disease. University of Missouri-Kansas City, Kansas City, Missouri, USA, *Environmental Health Perspectives* Volume **107**, Number 10, October 1999

[29] R.A. Roberts, S. Chevalier, S.C. Haslam, NoH. James, S.C. Cosulich, N. Macdonald, PPAR α and the regulation of cell division and apoptosis, *Toxicology* **181-182**, 167-170, 2002

[30] Naomi kudo, Erika Suzuki-Nakajima, Atsushi Mitsunoto, Yoichi Kamashima, Responses of the liver to perfluorinated fatty acids with different carbon chain length in male and female mice: In Relation to induction of Hepatomegaly, Peroxisomal β -

oxidation and Microsomal 1-Acylglycerophosphocholine Acyltransferase, *Biological Pharmacology Bull* , **29** (9) 1952-1957, 2006

[31] Yi Xie, Qian Yang and Joseph W. DePierre, The effects of peroxisome proliferator on global lipid homeostasis and the possible significance of these effects to other responses to these xenobiotics: An hypothesis. *Ann. N. Acad. Sci.*, **973**:17-25, 2002

[32] Rudoff Hebel, M.W. Stromberg, Anatomy of the laboratory rat, C:50

[33] Lalwani ND, MK Reddy, SA Qureshi, JK Reddy, Development of hepatocellular carcinomas and increased peroxisomal fatty acid β -oxidation in rats fed poetic acid (Wy-14.643) in the semipurified drag. *Carcinogenesis* **2**:645-650, 1981

[34] www.mamashealth.com

[35] Patel, T., Roberts, L. R., Jones, B. A., and Gores, G. J. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: An overview. *Semin. Liver Dis.*, **18**:105-114, 1998

[36] Rodrigues, C. M. P., Fan, G., Ma, X., Kren, B. T., and Steer, C. J., A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation, *J. Clin. Invest.* **101**:2790-2799, 1998

[37] Strautnieks, S. S., Bull, L. N., Knisely, A. S., Kocoshis, S. A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M. S., KAgalwalla, A. F., Nemeth, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, N. B., Gardiner R. M., and Thompson, R. J., A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic choleostasis, *Nat. Genet.*, **20**:233-238, 1998

[38] www.greenfield.fortunecity.com

[39] Vito Racanelli and Barbara Rehmann, The liver as an immunological organ, *Hepatology*, Vol **43**, No 2, 2006

[40] www.wikipedia.com

[41] Michalopoulos GK, DeFrances MC: Liver regeneration, *Science*, 276:60-66, 1997

[42] Samuel H. Sigal, Pankaj Rajvanshi, Giridhar R. Gorle, Rana P. Sokhi, romil Saxena, David R. Gebhard, JR, Loha M. Reid, Savijeev Gupta, Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activator cell aging events, *The American Physiological Society*, **276**:1260-1272, 1999

[43] Arnaud Gantillet, Eliare Alexandre, Vincent Holl, Cathy Royer, Pierre Bischoff, Jacquer Cinquelbre, Philippe Wolf, Daniel Jacck, Lysiane Richert, Hepatocyte ploidy in normal young rat, *Comparative Biochemistry & Physiology, Part A* **134**:665-673, 2003

[44] Rebecca Taub, Liver Regeneration: From myth to mechanism, *Nature*, **5**:836-847, 2004

- [45] Fausto, N. & Webber, E. M., *The liver: Biology and Pathobiology*, Raven Press Ltd, 53-68, 1994
- [46] Matsuo, T. et al. Control Mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo, *Science*, **302**:255-259, 2003
- [47] Grisham, J. W. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver: autoradiography with thymine-H, *Cancer Res*, **22**:842-849, 1962
- [48] Dabeva, M. D. & Shafritz, D. A. Activation, proliferation and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration, *Am. J. Pathol.*, **143**:1606-1620, 1993
- [49] Sandgren, E. P. et al. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene, *Cell*, **66**:245-256, 1991
- [50] Overturf, K., Al-Dhalimy, M., Finegold, M. & Grompe, M. The repopulation potential of hepatocyte populations differing in size and prior mitotic expansion, *Am. J. Pathol.*, **155**:2135-2143, 1999

