



## ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ: Π.5.6

### «Ανάλυση-Ανακοίνωση αποτελεσμάτων (έκθεση)» (Δράση 5)

για το ΥΠΟΕΡΓΟ 1 της Πράξης:

**«ΘΑΛΗΣ- Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών-  
Ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας: επιρροή των λοιμώξεων και  
ρόλος τους στην ανάπτυξη ατοπίας και άσθματος» (MIS 377047)**

του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση»

Επιστημονικός Υπεύθυνος Πράξης και Υπεύθυνος Υποέργου 1:  
Ανδρέακος Ευάγγελος

Επιμέλεια σύνταξης εγγράφου: ΟΜΑΔΑ ΥΠΟΕΡΓΟΥ 1

ΕΛΕΜΗΝΙΑΔΟΥ ΕΥΡΙΔΙΚΗ

ΜΟΥΡΑΤΗΣ ΜΑΡΙΟΣ-ΑΓΓΕΛΟΣ

ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΑΝΔΡΕΑΚΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

ΜΑΝΙΟΥΔΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

ΨΑΡΡΑΣ ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ

ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΘΕΟΔΟΣΙΟΥ ΘΕΟΔΟΣΙΟΣ

ΓΑΛΑΝΗ ΙΩΑΝΝΑ

ΚΟΛΤΣΙΔΑ ΟΥΡΑΝΙΑ

ΠΑΥΛΟΠΟΥΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ



Η προαναφερθείσα συγχρηματοδοτούμενη πράξη ΕΚΤ-ΕΣΠΑ 2007-2013 έχει ως σκοπό να εξετάσει την υπόθεση ότι η ελαττωματική ωρίμανση της φυσικής ανοσίας νωρίς στη ζωή, επηρεαζόμενη από λοιμώξεις, συμβάλλει στην ανάπτυξη αλλεργικών παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος. Στόχοι της πράξης είναι να περιγραφεί η ωρίμανση της φυσικής ανοσίας σε υγιείς και ασθματικούς δότες, να διευκρινιστεί η επιρροή των λοιμώξεων στην ωρίμανση της φυσικής ανοσίας και την ανάπτυξη/επιμονή αλλεργικών αντιδράσεων στους αεραγωγούς, να προσδιοριστεί η συσχέτιση ιϊκών λοιμώξεων με τη μικροβιακή αποικιοποίηση του ανώτερου αναπνευστικού και να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του αναπνευστικού επιθηλίου και την αναδόμησης των αεραγωγών στην ανάπτυξη αλλεργίας και άσθματος. Σκοπός του προγράμματος είναι να αποκαλύψει σημαντικές βιολογικές διαδικασίες που ενεργοποιούνται στα πρώτα στάδια της ζωής και συμβάλλουν στην ανάπτυξη αλλεργικών παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος με σημαντική διαγνωστική και θεραπευτική σημασία.

Στο πλαίσιο της πράξης, υλοποιείται το Υποέργο 1 με τίτλο «Ωρίμανση της μη-ειδικής ανοσίας: επιρροή των λοιμώξεων και ρόλος τους στην ανάπτυξη ατοπίας και άσθματος» και θα εκτελεστούν οκτώ (8) Δράσεις.

Το παρόν παραδοτέο 5.6 αποτελεί μέρος της Δράσης 5: «Επιρροή της ηλικιακής ωρίμανσης ανοσιακών αποκρίσεων στην ανάπτυξη αλλεργικής ευαισθητοποίησης και άσθματος σε πειραματικά μοντέλα μυών» και περιλαμβάνει την πορεία ωρίμανσης της μη ειδικής ανοσίας του ανοσοποιητικού συστήματος των μυών από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωσή τους.

#### **Δράση 5: «Επιρροή της ηλικιακής ωρίμανσης ανοσιακών αποκρίσεων στην ανάπτυξη αλλεργικής ευαισθητοποίησης και άσθματος σε πειραματικά μοντέλα μυών»**

##### **5.6 Ανάλυση-Ανακοίνωση αποτελεσμάτων**

Οι ανοσιακές απαντήσεις οριοθετούν τον οργανισμό στον οποίο ανήκουν και τον προστατεύουν από εξωγενείς, λοιμωγόνους κυρίως, παράγοντες. Κατά τη γέννηση, το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ανώριμο, αφού η διαδικασία ωρίμανσης προϋποθέτει και εξαρτάται από την έκθεση και αναγνώριση δομών και ουσιών του περιβάλλοντος. Η ωρίμανση επιμέρους στοιχείων του ανοσοποιητικού συστήματος ακολουθεί διαφορετικούς ρυθμούς και καθορίζεται από το βαθμό και το ρυθμό έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, την ταυτότητα των παραγόντων αυτών, αλλά και το γενετικό υπόστρωμα του οργανισμού. Είναι πιθανόν η ανοσιακή ωρίμανση να έχει κομβικό

ρόλο στην ανάπτυξη ή και την επιμονή χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων όπως οι αλλεργίες του αναπνευστικού συστήματος και το άσθμα.

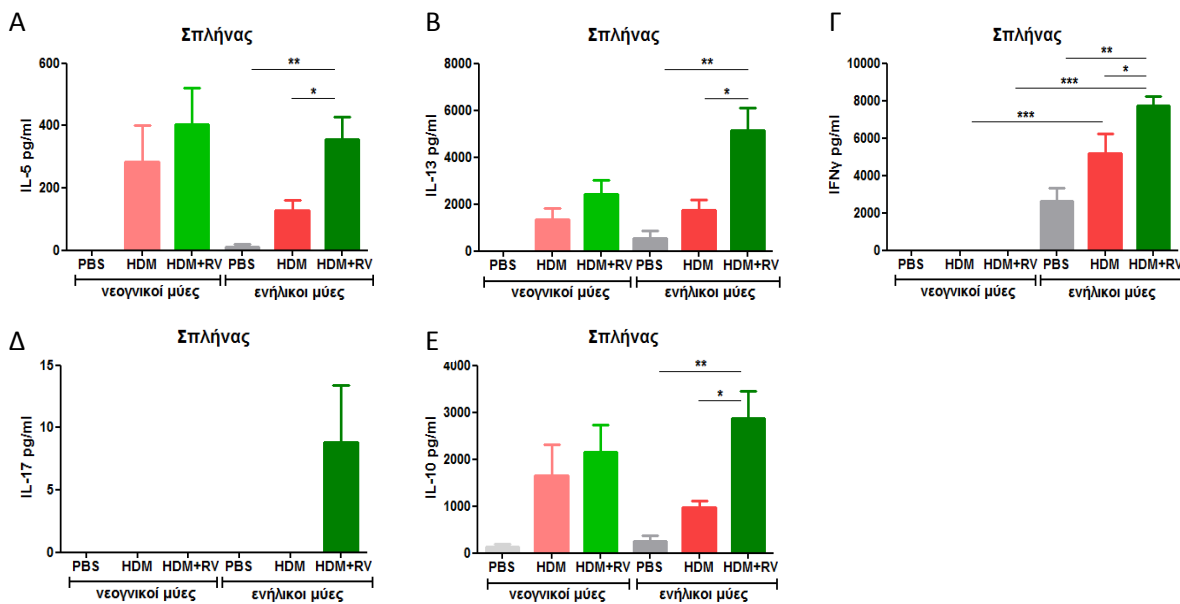
Το άσθμα χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών που συνοδεύεται από επεισοδιακά ή χρόνια συμπτώματα απόφραξης όπως δύσπνοια, συριγμό και βήχα. Στα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου περιλαμβάνονται η απογύμνωση του επιθηλίου των αεραγωγών, η εναπόθεση κολλαγόνου κάτω από τη βασική μεμβράνη, το οίδημα των αεραγωγών, η ενεργοποίηση σιτευτικών κυττάρων και η διήθηση με φλεγμονώδη κύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και λεμφοκύτταρα (ιδιαίτερα T λεμφοκύτταρα). Το άσθμα οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην αντίδραση των Th2 λεμφοκυττάρων σε συνήθη αεροαλλεργιογόνα σε γενετικά ευπαθείς ανθρώπου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση κυτταροκινών βοηθητικού τύπου 2 (Th2) όπως των ιντερλευκινών IL-4, IL-5 και IL-13 που ενορχηστρώνουν την ασθματική αντίδραση προάγοντας την παραγωγή αντισωμάτων IgE και τον πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και στρατολόγηση των κυττάρων της φλεγμονής.

Πρόσφατες προοπτικές μελέτες έδειξαν ότι λοιμώξεις από ρινοϊούς κατά τη βρεφική ηλικία παίζουν καθοριστικό ρόλο για την ανάπτυξη άσθματος στη μετέπειτα ζωή. Η συσχέτιση μάλιστα αυτή είναι εντυπωσιακή καθώς RV λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού κατά τη διάρκεια των τριών πρώτων ετών της ζωής αυξάνουν τον κίνδυνο των παιδιών να αναπτύξουν άσθμα έως και 40 φορές, πολύ περισσότερο δηλαδή από τον κίνδυνο λόγω ευαισθητοποίησης με αλλεργιογόνο ή από λοιμώξεις από αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV), που επίσης είναι συχνές στα παιδιά. Οι ιογενείς λοιμώξεις μπορεί να αυξήσουν την ευαισθητοποίηση σε αλλεργιογόνο σε προδιατεθειμένους ατοπικούς ξενιστές.

Για να μελετηθεί λεπτομερώς η επιρροή ιογενών λοιμώξεων στην αλλεργική φλεγμονή σε διαφορετικές ηλικιακές περιόδους και να συσχετιστεί με τη διαφοροποίηση της ωρίμανσης του ανοσοποιητικού συστήματος και την ανάπτυξη αλλεργικού άσθματος, αναπτύχθηκε μοντέλο ρινοϊκής λοίμωξης (human rhinovirus 1b, RV) σε νεογέννητους και ενήλικους μύες συνοδευόμενη από έκθεση στο αλλεργιογόνο ακάρεα σκόνης (house dust mite, HDM) (Εικόνα 1). Στη συνέχεια, χαρακτηρίστηκε η εισροή φλεγμονωδών κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL fluid) των μυών (Εικόνα 2), καθώς και οι ανοσολογικές αποκρίσεις στο σπλήνα και στους μεσοθωρακικούς λεμφαδένες έπειτα από επαναδιέγερση με HDM (Εικόνα 3).

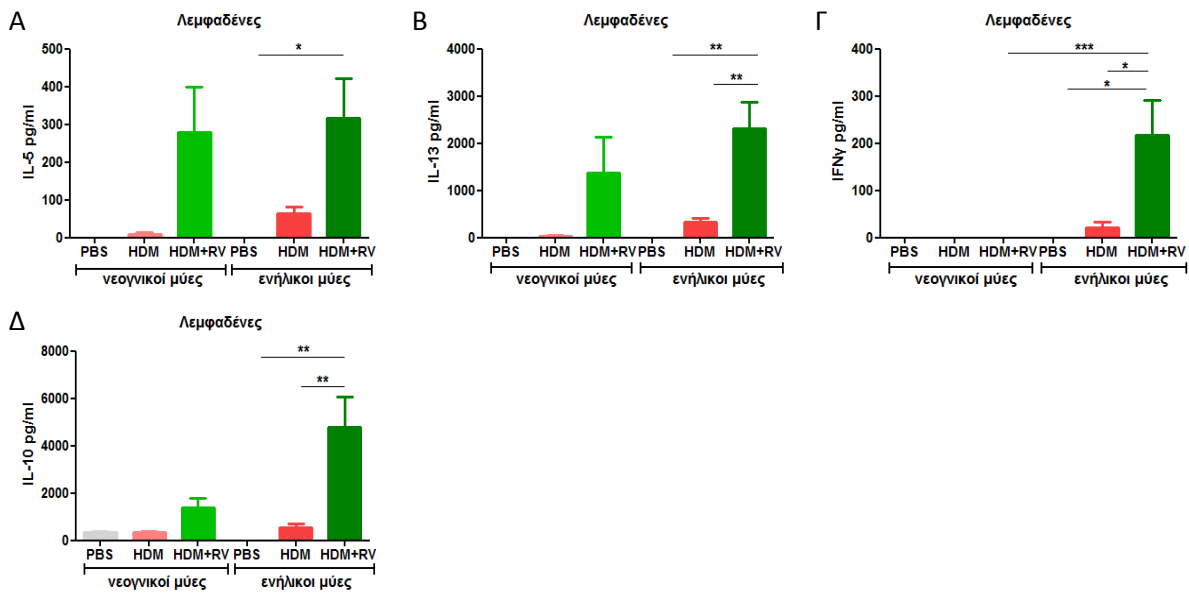


Παρατηρήθηκε επιπλέον πως οι ειδικές Th2 ανοσιακές αποκρίσεις έναντι του αλλεργιογόνου HDM στο σπλήνα και στους μεσοθωρακικούς λεμφαδένες ήταν παρόμοιες μεταξύ των νεογνικών και ενήλικων μυών (Εικόνες 3Α-Β, 4Α-Β). Επιπλέον, δε σημειώθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα της αντι-φλεγμονώδους IL-10 μεταξύ νεογνικών και ενήλικων μυών, τόσο στο σπλήνα όσο και στους λεμφαδένες (Εικόνες 3Ε, 4Ε). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε επαγωγή της IL-17 στο σπλήνα και στους λεμφαδένες των νεογνικών μυών σε αντίθεση με τους ενήλικες (Εικόνες 3Δ, 4Δ).



**Εικόνα 3:** Χαρακτηρισμός των ειδικών ανοσιακών απαντήσεων έναντι του αλλεργιογόνου HDM και του ρινοϊού στον σπλήνα. Ελαιώρημα κυττάρων σπληνός καλλιεργήθηκε παρουσία 30ug/ml HDM για τέσσερις ημέρες. Στα υπερκείμενα των καλλιεργείων ελέγχθηκε η παρουσία των Th2 (A, B), Th1 (Γ) και Th17 (Δ) κυτοκινών IL-5, IL-13, IFNγ και IL-17 αντίστοιχα και της αντι-φλεγμονώδους IL-10 (E) με τη μέθοδο της ELISA. N= 5-9 μύες ανά ομάδα. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η έλλειψη παραγωγής IFNγ στο σπλήνα και στους λεμφαδένες των νεογνικών μυών. Αντίθετα, στους ενήλικες μύες παρατηρήθηκε περιορισμένη παραγωγή IFNγ έπειτα από έκθεση στο HDM στο σπλήνα και στους λεμφαδένες, η οποία αυξήθηκε σημαντικά μετά από τη συνδυαστική λοίμωξη με τον ρινοϊό (Εικόνες 3Γ, 4Γ).



**Εικόνα 4:** Χαρακτηρισμός των ειδικών ανοσιακών απαντήσεων έναντι του αλλεργιογόνου HDM και του ρινοϊού στους λεμφαδένες. Ενωίωμα κυττάρων από τους μεσοθωρακικούς λεμφαδένες καλλιεργήθηκε παρουσία 30ug/ml HDM για τέσσερις ημέρες. Στα υπερκείμενα των καλλιεργείων ελέγχθηκε η παρουσία των Th2, Th1 και Th17 κυτοκινών IL-5, IL-13, IFN $\gamma$  και της αντι-φλεγμονώδης IL-10 με τη μέθοδο της ELISA. N= 5-9 μύες ανά ομάδα. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001

Επιπλέον, σημαντική ήταν η παρατήρηση ύπαρξης κυτταρικών διηθήσεων γύρω από τους βρόγχους και τα αγγεία στην ομάδα των μύων που εκτέθηκαν στον ρινοϊό και στο αλλεργιογόνο, σε σχέση με την ομάδα που εκτέθηκε μόνο στο HDM και την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5:** Ιστολογική ανάλυση των πνευμόνων νεογνικών μύων έπειτα από χορήγηση PBS (A), HDM (B) και HDM με ρινοϊό (Γ). Χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη, 10x μεγέθυνση.

## Συμπεράσματα

Συνολικά, γίνεται φανερό πως η έκθεση στο αλλεργιογόνο HDM προκαλεί μια ήπια φλεγμονή στους νεογνικούς και ενήλικους μύες, όπως αποτυπώνεται στο BAL και ιστολογικά, η οποία όμως ενισχύεται σημαντικά όταν συνδυαστεί με έκθεση στον ρινοϊό. Επιπλέον, η έκθεση στο αλλεργιογόνο HDM επάγει παρόμοιες Th2 ανοσολογικές αποκρίσεις στον σπλήνα και τους λεμφαδένες των νεογνικών και ενήλικων μυών και οι αποκρίσεις αυτές ενισχύονται σημαντικά παρουσία ρινοϊκής λοίμωξης. Η βασική διαφορά των δύο ηλικιακών ομάδων έγκειται στην αδυναμία επαγωγής Th1 αποκρίσεων στους νεογνικούς μύες, οδηγώντας τελικά σε αυξημένη Th2 ανοσολογική απάντηση. Καθίσταται φανερό πως η ανοσιακή ανωριμότητα των νεογνικών μυών παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων, καθώς λοιμώξεις από ρινοϊούς συνοδευόμενες από ένα αλλεργικό περιβάλλον μπορούν να οδηγήσουν σε μόνιμες αλλαγές στην ανοσιακή απόκριση και προδιάθεση για ανάπτυξη αλλεργικής ευαισθητοποίησης και αλλεργικών νόσων. Έχοντας ως εργαλείο το μοντέλο αλλεργικής ευαισθητοποίησης που ανάπτυχθηκε και εφόσον συνδυαστεί με ένα πρωτόκολλο μακροχρόνιας έκθεσης των μυών στο HDM, θα είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η συμβολή της ρινοϊκής λοίμωξης στη μετέπειτα ανάπτυξη αλλεργικού άσθματος.

Σεπτέμβριος 2015, Αθήνα