



ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ: Π.1.4

«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ (ΑΝΑΦΟΡΑ)»

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:
Ανδρεάκος Ευάγγελος

Επιμέλεια σύνταξης εγγράφου: ΟΜΑΔΑ ΥΠΟΕΡΓΟΥ 1

ΔΟΥΛΑΡΙΔΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ	ΠΑΠΑΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ
ΚΟΚΚΙΝΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ	ΡΟΥΜΠΕΔΑΚΗ ΕΙΡΗΝΗ
ΜΑΓΓΙΝΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ	ΣΚΕΥΑΚΗ ΧΡΥΣΑΝΘΗ
ΜΕΓΡΕΜΗΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ	ΤΑΚΑ ΣΤΥΛΙΑΝΗ
ΞΕΠΑΠΑΔΑΚΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ	ΤΖΕΛΗ ΚΑΣΣΙΑΝΗ
ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ	ΤΣΟΛΙΑ ΜΑΡΙΑ



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.

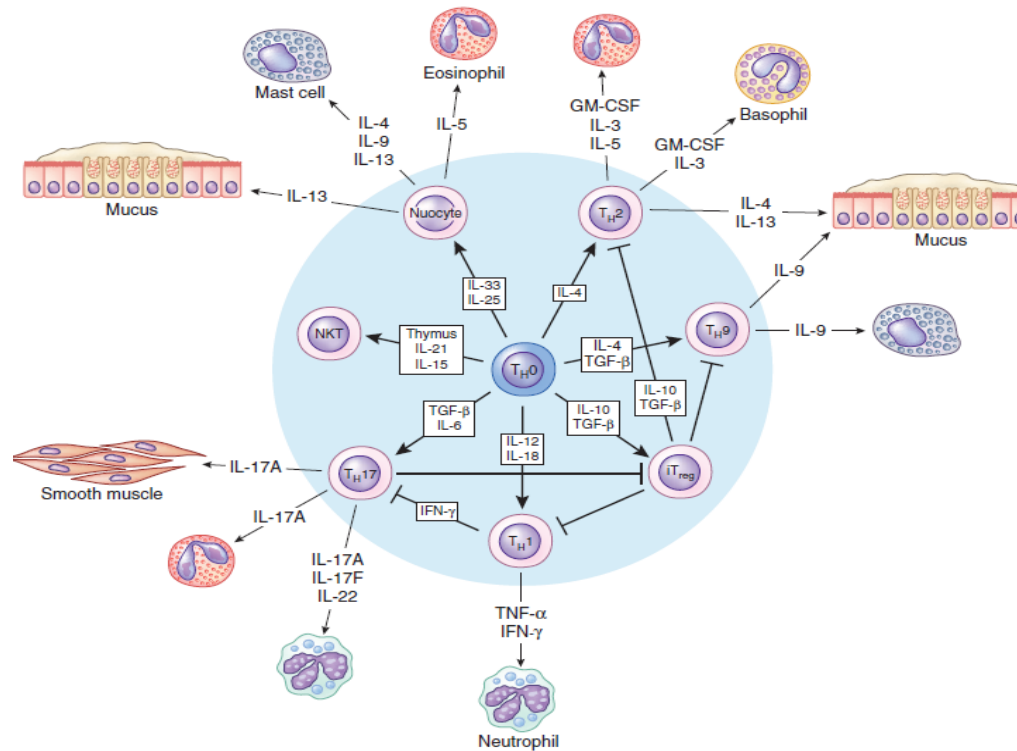
Στόχοι της πράξης είναι να περιγραφεί η ωρίμανση της φυσικής ανοσίας σε υγιείς και ασθματικούς δότες, να διευκρινιστεί η επιρροή των λοιμώξεων στην ωρίμανση της φυσικής ανοσίας και την ανάπτυξη/επιμονή αλλεργικών αντιδράσεων, να προσδιοριστεί η συσχέτιση ιικών λοιμώξεων με τη μικροβιακή αποικιοποίηση 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 ο ρόλος τους στην ανάπτυξη ατοπίας και άσθματος» και θα εκτελεστούν οκτώ (8) Δράσεις.

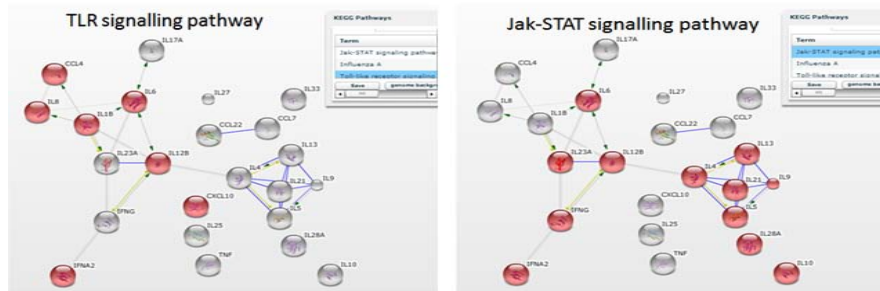
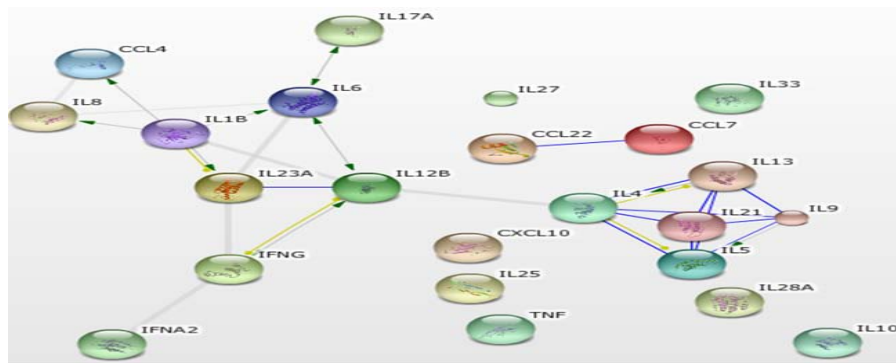
Το παρόν παραδοτέο 1.3 αποτελεί μέρος της **Δράσης 1: «Ωρίμανση της φυσικής ανοσίας και συσχέτιση με την ανάπτυξη αλλεργίας/άσθματος»** και περιλαμβάνει τον σχεδιασμό των πειραμάτων για την μελέτη της ωρίμανσης της φυσικής ανοσίας σε σχέση με τα αναπνευστικά συμπτώματα δηλαδή σε σχέση με την παρουσία ή μη αναπνευστικής αλλεργίας.

Για τον σκοπό αυτό, στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών από υγιείς και ατοπικούς δότες όλων των ηλικιών έχει πραγματοποιηθεί ο σχεδιασμός μετρήσεων κυτταροκινών/χημειοκινών που σχετίζονται με την μη ειδική ανοσία. Πιο συγκεκριμένα, η επιλογή των προς μέτρηση κυτταροκινών αποφασίστηκε βάση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας (Εικόνα 1& 2) αλλά και

από προκαταρκτικά αποτελέσματα μετρήσεων που ήδη έχουν διενεργηθεί στο εργαστήριο Αλλεργιολογίας & Κλινικής Ανοσολογίας της Β' Παιδιατρικής κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών (EAACI Annual Congress, Barcelona, Spain, 2008, Maggina P. *et al* 'Development of innate and adaptive responses against human rhinovirus infection during the first 11 years of life').



Εικόνα 1: Κυτταροκίνες/χημειοκίνες κομβικής σημασίας στα βασικά μονοπάτια μη ειδικής και ειδικής ανοσίας.



Εικόνα 2: Στα δίκτυα αλληλεπίδρασης των επιλεγμένων προς μέτρηση κυτταροκινών/χημειοκινών περιλαμβάνονται σημαντικά ‘μονοπάτια’ της μη ειδικής (φυσικής) ανοσίας (π.χ. TLR & JAK-STAT signaling pathways).

Οι μετρήσεις θα πραγματοποιηθούν με την τεχνική της ταυτόχρονης μέτρησης μεγάλου αριθμού μεσολαβητών σε μικρή ποσότητα δείγματος με τη χρήση της τεχνολογίας LumineX, η οποία συνδυάζει την τεχνική της elisa με αυτή της Flow-Cytometry. Οι μεσολαβητές που πρόκειται να προσδιοριστούν είναι οι ακόλουθοι:

- IL-8 (innate)**
- IL-6 (innate)**
- IFN- α 2 (innate)**
- IFN- λ 2 (IL-28A) (innate)**
- IFN- γ , IL-12p70, IP-10 , TNF- α (Th1, innate)**
- IL-4, IL-5, IL-13 (Th2, innate)**
- IL-9 (Th9, innate)**
- IL-10 (Tregs, innate)**
- IL-1 β (innate)**
- MIP-1 β (CCL-4) (innate)**
- IL-21 (innate)**
- IL-23 (innate)**
- IL-27 (innate)**

IL-33 (innate)

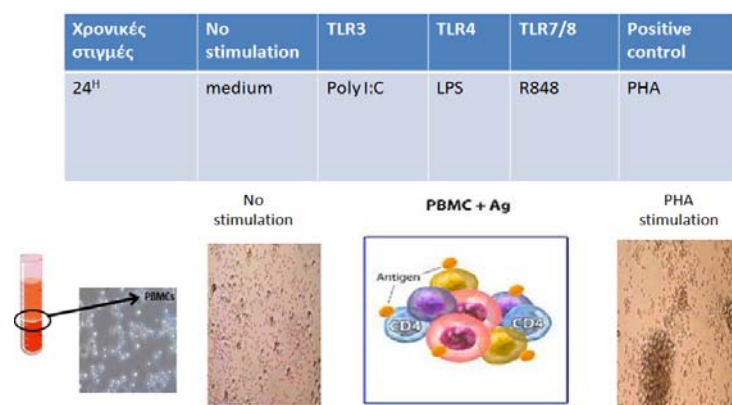
IL-17A, IL-17E (IL-25) (Th17, innate)

CCL-7 (MCP3) (innate)

CCL-22 (MDC) (innate)

Οι πρώτες μετρήσεις έχουν ήδη πραγματοποιηθεί για τον προσδιορισμό των κυτταροκινών IL-6 & IL-8 και με προσεκτικό σχεδιασμό επιλογής των δειγμάτων τόσο βάση των συνθηκών καλλιέργειας όσο και βάση των κλινικών χαρακτηριστικών των εθελοντών-δοτών (Εικόνες 3 & 4 & Πίνακας 1). Παράλληλα ήδη πραγματοποιούνται μετρήσεις με την τεχνική Luminex για τους υπόλοιπους μεσολαβητές που έχουν επιλεγεί, τα αποτελέσματα και οι αναλύσεις των οποίων θα είναι διαθέσιμα στο επόμενο Παραδοτέο (Σεπτέμβριος 2015).

Η προσεκτική επιλογή δειγμάτων και η σταδιακή πραγματοποίηση μετρήσεων βάση των πρώτων αποτελεσμάτων θεωρείται επιβεβλημένη για λόγους κόστους-οφέλους και θα καθορίσει τις τελικές μετρήσεις που θα επικεντρωθούν σε μεσολαβητές που φαίνεται να διαφοροποιούνται μεταξύ των ηλικιακών ομάδων καθώς μεταξύ ατοπικών και μη ατοπικών βάση των προκαταρκτικών αυτών μετρήσεων.



Εικόνα 3: Επιλογή συνθηκών καλλιέργειας PBMCs για τις πρώτες μετρήσεις μεσολαβητών φυσικής ανοσίας στα υπερκείμενα αυτών.

Επιλογή πρώτων ηλικιακών ομάδων

νεογνά: 3 ατοπικά - 3 μη ατοπικά
2-10 έτη : 8 ατοπικά- 8 μη ατοπικά
10-20 έτη : 6 ατοπικά – 6 μη ατοπικά
20-40 έτη : 4 ατοπικά - 4 μη ατοπικά

Αναμενόμενα πρώτα αποτελέσματα

- Μεταβολές επιπέδων 23 κυτταροκινών σε μη αλλεργικά άτομα 0-40 ετών
- Μεταβολές επιπέδων 23 κυτταροκινών σε αλλεργικά άτομα 0-40 ετών
- Επίδραση ατοπίας στην παραγωγή 23 κυτταροκινών για τις υπό μελέτη ηλικιακές ομάδες

Εικόνα 4: Επιλογή ηλικιακών ομάδων ατοπικών και μη ατοπικών δοτών για τις πρώτες μετρήσεις. Από τα αναμενόμενα προκαταρκτικά αποτελέσματα θα καθοριστούν τα τελικά πειράματα και οι οριστικές μετρήσεις για τον συνολικό πληθυσμό της μελέτης που αφορά στη Δράση 1.

	non-atopic neonates	atopic neonates	non-atopic 2-10yrs	Atopic 2-10yrs	non-atopic 10-20yrs	Atopic 10-20yrs	non-atopic 20-50yrs	Atopic 20-50yrs
Median age	5 days	11.5 days	4.88 yrs	4.75 yrs	12.39 yrs	13.8 yrs	33.68 yrs	37.08 yrs
Sex (female/male)	1/2	1/2	5/3	3/5	2/4	1/5	2/2	1/3
Chronic disease	-	-	-	-	-	-	-	-
Recent infection	-	-	-	-	-	-	-	-
Mean number of positive SPTs*	0	1.33**	0	2.04	0	4.5	0	3.8

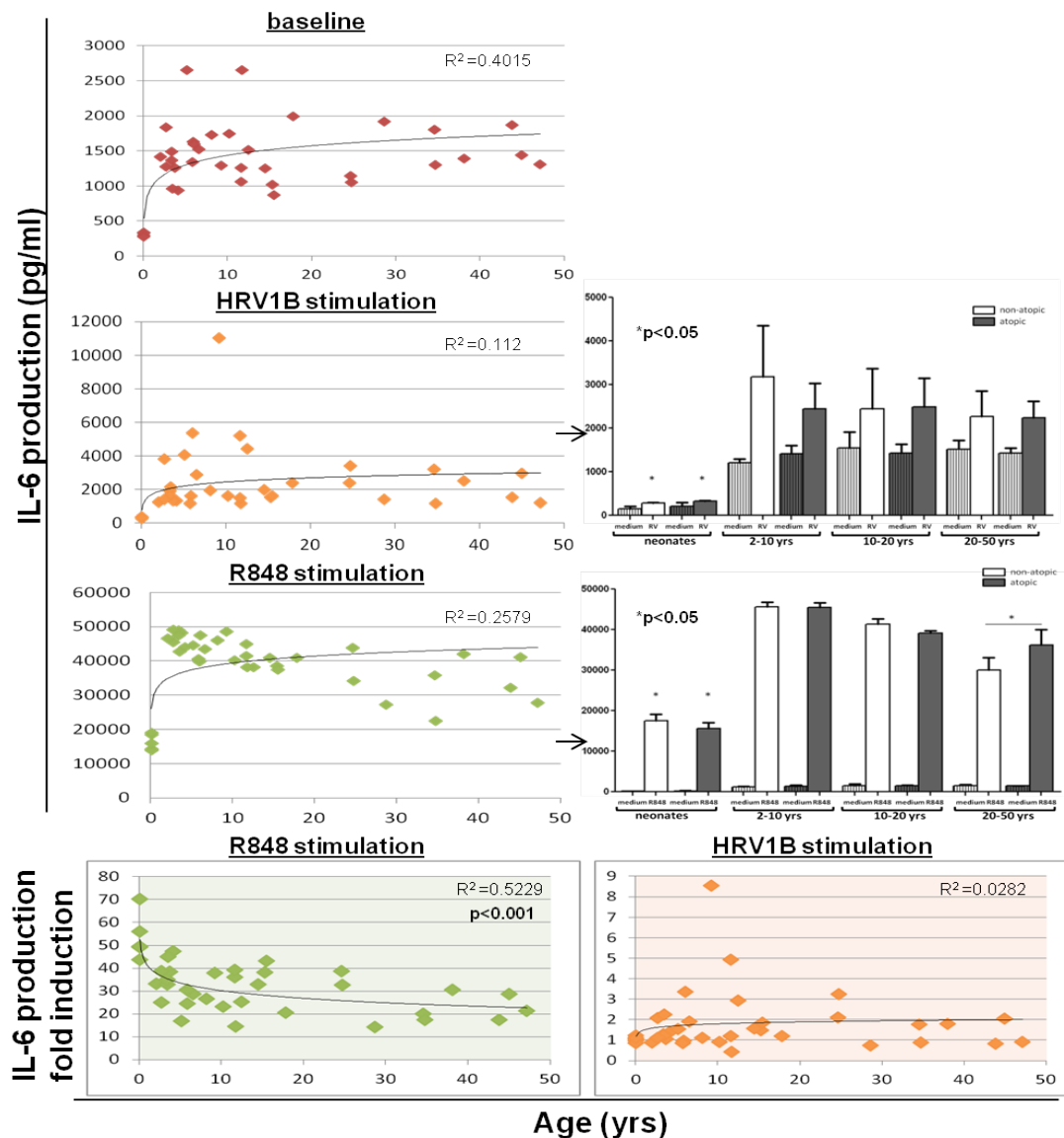
* Calculated from 9 common allergens; Mix, dog, cat, alternaria, grass mix, parietaria, olive, cockroach, hen's egg

** Skin prick testing (SPTs) was performed on mothers.

Πίνακας 1: Κλινικά χαρακτηριστικά των ατόμων που επιλέχθηκαν για τις πρώτες μετρήσεις.

Τα μέχρι σήμερα αποτελέσματα σχετικά με την **ανάπτυξη των φλεγμονωδών παραμέτρων με την επίδραση της ηλικίας**, παρουσιάστηκαν στην μορφή αναρτημένης ανακοίνωσης στο ετήσιο Πανευρωπαϊκό συνέδριο της Ακαδημίας Αλλεργιολογίας & Κλινικής Ανοσολογίας (Kokkinou D. *et al*, EAACI, Barcelona, Spain, 2015, 'TLR mediated changes of pro-inflammatory cytokine production in relation to atopy and age') και είναι τα ακόλουθα:

1. IL-6 production upon TLR stimulation

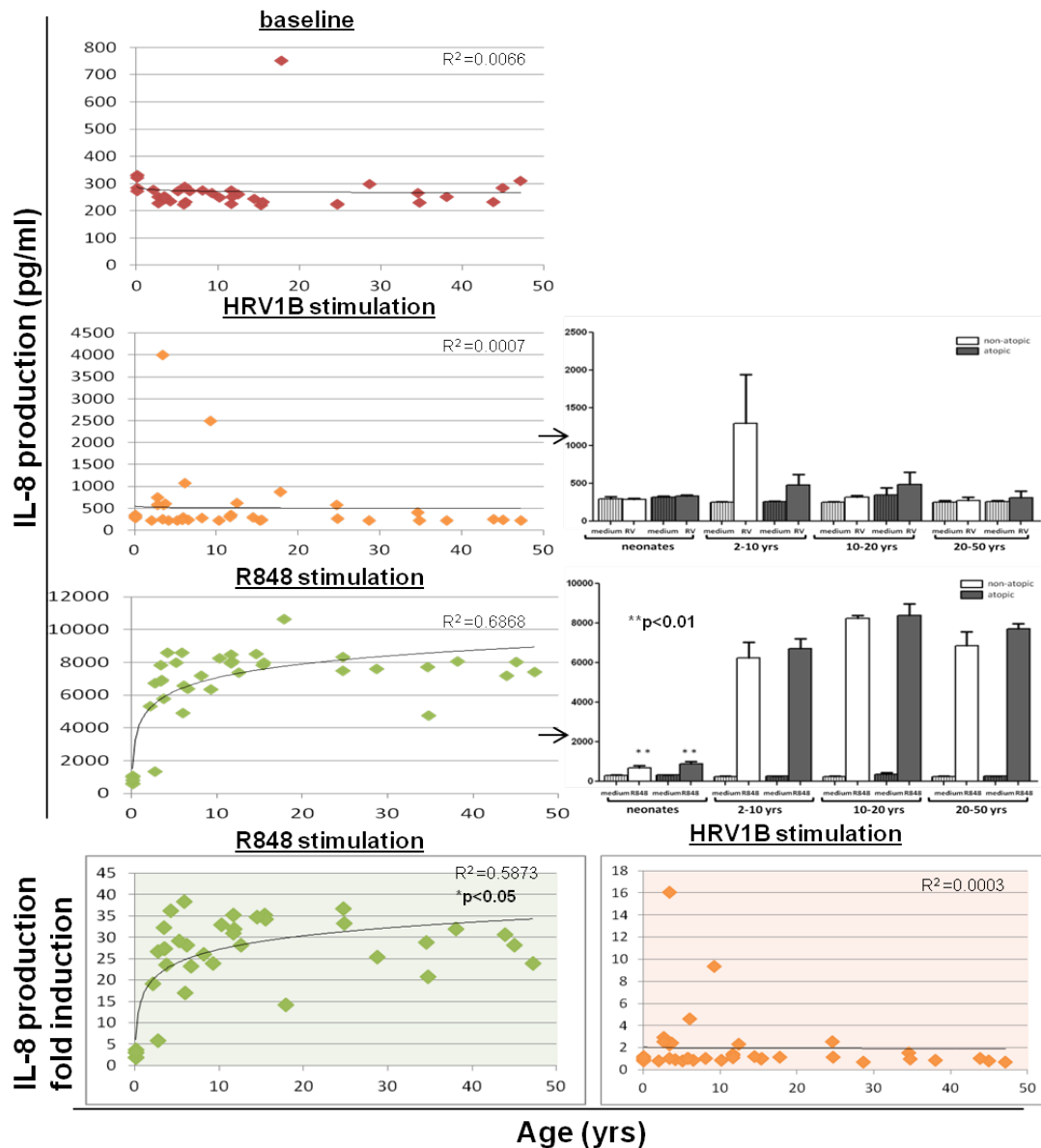


Αναφορικά με την IL-6, παρατηρούμε τα ακόλουθα:

1. Μεταβολή των επιπέδων της IL-6 μεταξύ της βασικής κατάστασης (άνευ διέγερσης) και κατόπιν επίδρασης των διεγερτών της φυσικής ανοσίας R848 (TLR-7/8) & HRV1B (TLR-3) τόσο στα ατοπικά όσο και στα μη ατοπικά άτομα.
2. Τα νεογνά παράγουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα IL-6 κατόπιν διέγερσης των μονοπατιών της φυσικής ανοσίας TLR συγκριτικά με όλες τις άλλες ηλικιακές ομάδες.

3. Η ικανότητα παραγωγής IL-6 μετά από διέγερση της οδού TLR-7/8 μειώνεται σημαντικά με την αύξηση της ηλικίας τόσο στα ατοπικά όσο και στα μη ατοπικά άτομα.

2. IL-8 production upon TLR stimulation



Αναφορικά με την IL-8, παρατηρούμε τα ακόλουθα:

1. Τα επίπεδα της IL-8 κατόπιν επίδρασης των διεγερτών των μονοπατιών της φυσικής ανοσίας που μεσολαβούνται από τους TLR-7 & TLR-8 αυξάνονται με την ηλικιακή ωρίμανση, τόσο στα ατοπικά όσο και στα μη ατοπικά άτομα.

2. Τα νεογνά παράγουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα επαγόμενης από τους διεγέρτες της οδού των TLR-7 & TLR-8 IL-8 συγκριτικά με όλες τις άλλες ηλικιακές ομάδες.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η ηλικία είναι παράγοντας κομβικής σημασίας για τις παρατηρούμενες μεταβολές στην απελευθέρωση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-6 & IL-8) που παράγονται στα μονοπάτια της φυσικής ανοσίας με την επίδραση TLR-διεγερτών, τόσο στα ατοπικά όσο και στα μη ατοπικά άτομα.

Αθήνα, Ιούνιος 2015