



ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ: Π.5.3

«ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΛΛΕΡΓΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ (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:
Ανδρέακος Ευάγγελος

Επιμέλεια σύνταξης εγγράφου:

ΑΝΔΡΕΑΚΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

ΚΟΛΤΣΙΔΑ ΟΥΡΑΝΙΑ

ΓΑΛΑΝΗ ΙΩΑΝΝΑ

ΜΟΥΡΑΤΗΣ ΜΑΡΙΟΣ- ΑΓΓΕΛΟΣ

ΕΛΕΜΗΝΙΑΔΟΥ ΕΥΡΥΔΙΚΗ

ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ-

ΜΑΝΙΟΥΔΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

ΓΕΩΡΓΙΑ



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

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 5.3 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.

Συγκεκριμένα:

Αναπτύχθηκε πρωτόκολλο για τη μελέτη ρινοϊκής λοίμωξης σε νεογνικούς μύες και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η συμβολή της στην αλλεργική φλεγμονή.

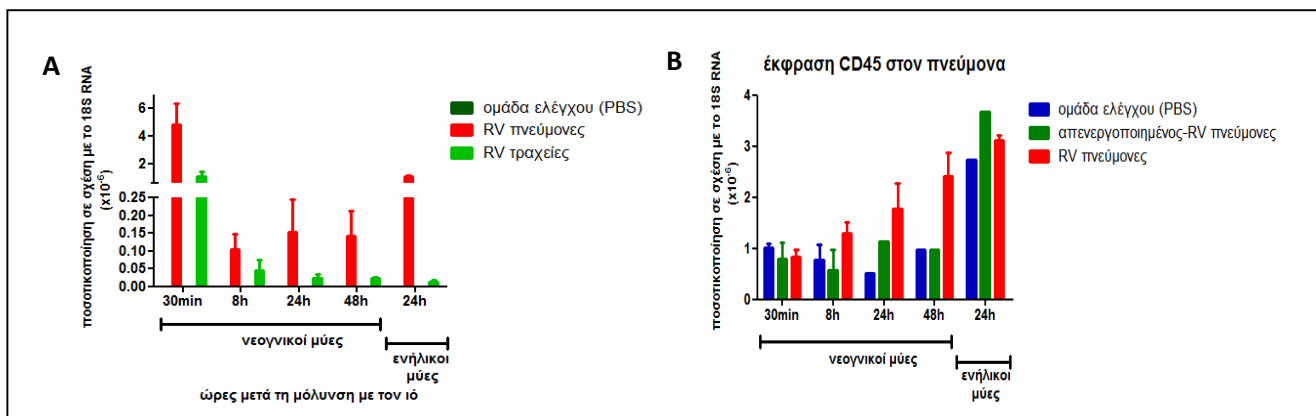
Δράση 5: «Επιρροή της ηλικιακής ωρίμανσης ανοσιακών αποκρίσεων στην ανάπτυξη αλλεργικής ευαισθητοποίησης και άσθματος σε πειραματικά μοντέλα μυών»

5.3 Ανάλυση της φυσικής ανοσίας στην αλλεργική φλεγμονή

Επιδημιολογικές μελέτες καταδεικνύουν τον πολύ σημαντικό ρόλο της πορείας ωρίμανσης του ανοσοποιητικού συστήματος στη μετέπειτα ανάπτυξη αλλεργικών παθήσεων. Ανεπαρκής δημιουργία Th1 και Treg ρυθμιστικών αποκρίσεων καθώς και μηχανισμών ανοσιακής ανοχής κατά τη νεογνική και προσχολική ηλικία έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη επαγωγή Th2 αποκρίσεων σε περιβαλλοντικά αντιγόνα και τελικά την ανάπτυξη αλλεργικών αποκρίσεων. Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί ωρίμανσης του ανοσοποιητικού συστήματος είναι ασαφείς, είναι φανερό ότι διάφορες ιογενείς και βακτηριακές λοιμώξεις είναι καθοριστικές τόσο για το σχηματισμό ειδικής ανοσίας εναντίον αλλεργιογόνων όσο και για την εμφάνιση αλλεργίας. Στόχος είναι 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.

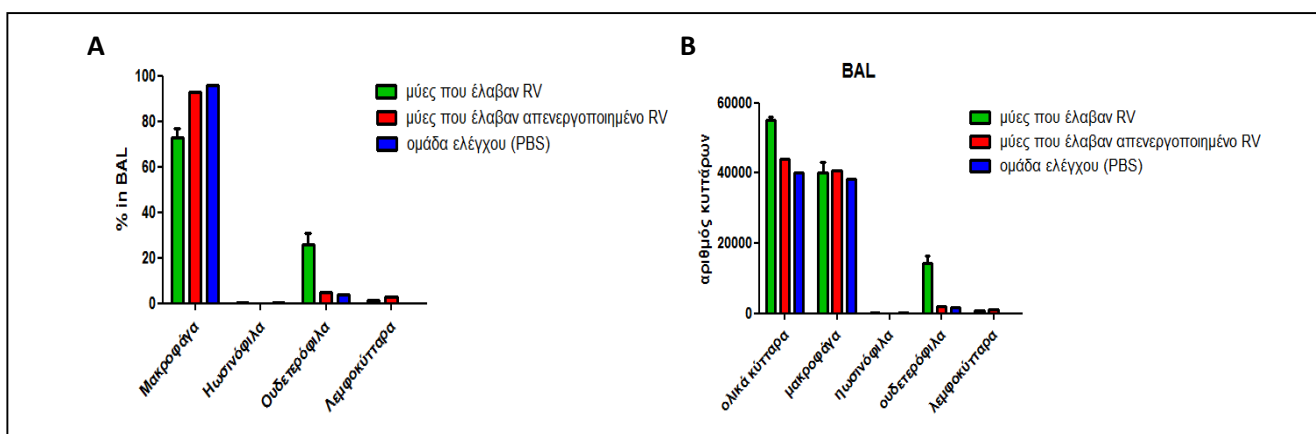
Για το σκοπό αυτό, αναπτύχθηκε μοντέλο ρινοϊκής λοίμωξης (human rhinovirus 1b, RV) σε νεογέννητους και ενήλικους μύες συνοδευόμενη από έκθεση στο αλλεργιογόνο ακάρεα σκόνης (house dust mite, HDM). Στη συνέχεια, χαρακτηρίστηκε η εισροή φλεγμονωδών κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL fluid) των μυών.

Αρχικά, ήταν απαραίτητο να βελτιστοποιηθεί ένα καλό μοντέλο ρινοϊκής λοίμωξης σε νεογνικούς μύες που να προσομοιάζει την έκθεση σε ιϊκές λοιμώξεις και αλλεργιογόνα στον άνθρωπο. Έπειτα από κρουοαναισθησία, χορηγήθηκε στα νεογνά μυών 2×10^6 TCID₅₀ Rhinovirus 1b (RV) και ελέγχθηκε ο τίτλος του ιού στον πνεύμονα και στην τραχεία, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα έπειτα από τη μόλυνση, ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ενδορινική χορήγηση του ιού (Εικόνα 1A). Επίσης, ελέγχθηκε η εισροή φλεγμονωδών κυττάρων στον πνεύμονα στα ίδια χρονικά διαστήματα με τη χρήση του μάρτυρα CD45 (Εικόνα 1B). Παράλληλα, χορηγήθηκε ενδορινικά σε ενήλικους μύες RV 1×10^7 TCID₅₀ και ελέγχθηκε το ιϊκό φορτίο και τα επίπεδα του CD45 μια μέρα μετά τη χορήγηση, χρονικό διάστημα που βιβλιογραφικά έχει δειχτεί ότι το ιϊκό φορτίο είναι το μέγιστο (Εικόνα 1A-B).



Εικόνα 1: Ανάλυση του ιϊκού φορτίου (A) και τα επίπεδα mRNA του CD45 (B) σε νεογνικούς και ενήλικους μύες έπειτα από τη ρινοϊκή μόλυνση.

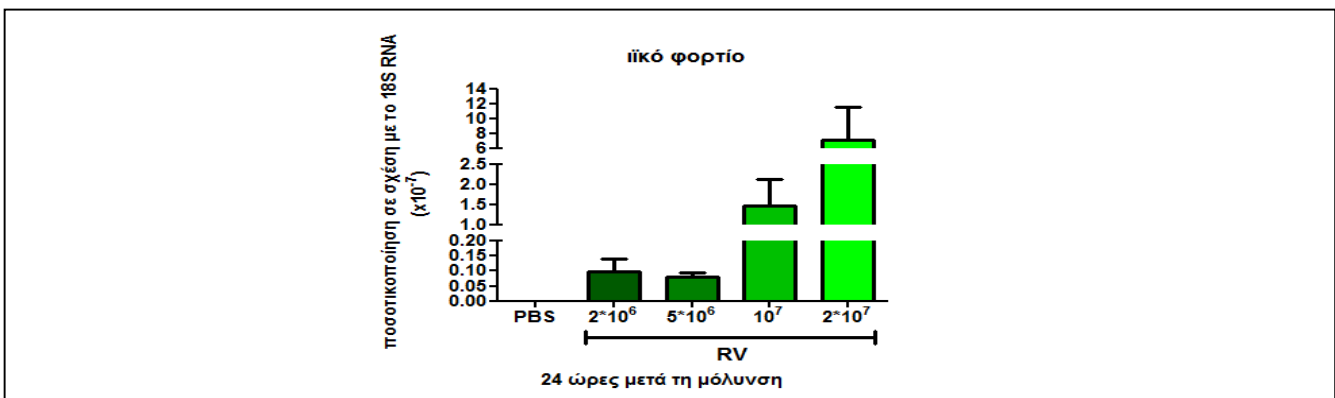
Μετά τη χορήγηση του ρινοϊού στους νεογνικούς μύες, παρατηρήθηκε το μέγιστο ιϊκό φορτίο μία μέρα μετά τη μόλυνση, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του CD45 αυξήθηκαν σταδιακά μετά από 48 ώρες. Να σημειωθεί πως ελέγχθηκαν τα επίπεδα των ιντερφερονών τύπου I και III στους μύες που μολύνθηκαν από τον ιό, νεογνικούς και ενήλικες, και δεν παρατηρήθηκε επαγωγή τους. Επιπλέον, καθώς δεν είναι εφικτό σε μύες επτά ημερών να πραγματοποιηθεί λήψη βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL), έγινε λήψη από τους ενήλικους μύες για να χαρακτηριστεί η εισροή φλεγμονωδών κυττάρων μετά τη μόλυνση (Εικόνα 2). Έπειτα από τη διαφορική καταμέτρηση των κυττάρων στο BAL, φαίνεται πως η μόλυνση από τον ρινοϊό οδήγησε σε αύξηση των ολικών κυττάρων εξαιτίας της εισροής ουδετεροφίλων στον πνεύμονα των μυών.



Εικόνα 2: Διαφορική καταμέτρηση των κυττάρων βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (A) ως απόλυτοι αριθμοί και (B) ως ποσοστά, μία μέρα μετά τη χορήγηση του ρινοϊού στους ενήλικους μύες.

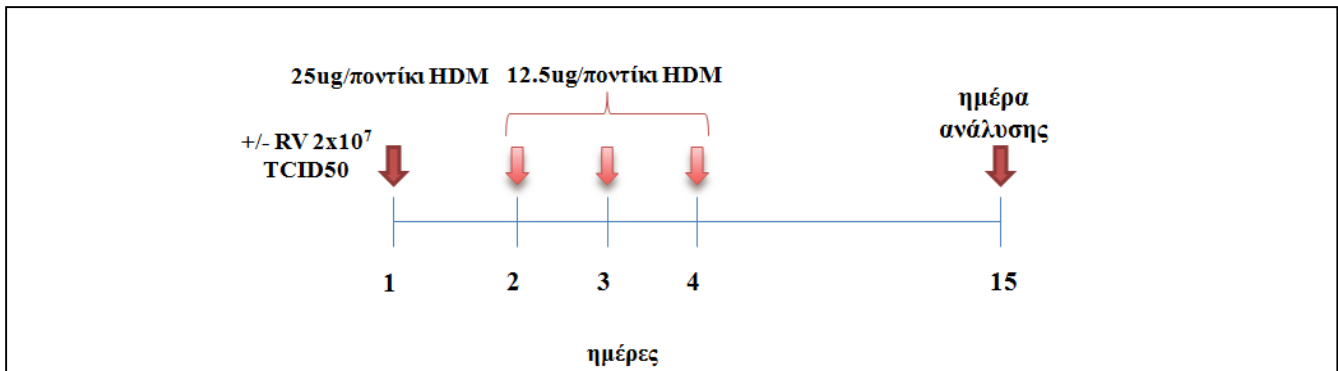
Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερό πως ο ρινοϊός, χορηγούμενος στις συγκεκριμένες δόσεις, μπορεί να προσβάλει τους νεογνικούς και ενήλικους μύες, προκαλώντας ωστόσο ήπια φλεγμονή.

Στη συνέχεια, χορηγήθηκε ο ρινοϊός σε νεογνικούς μύες σε διαφορετικές δόσεις για να διαπιστωθεί εάν το ιϊκό φορτίο αυξάνεται με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 3). Όπως παρατηρήθηκε, η χορήγηση υψηλότερης δόσης ρινοϊού είχε ως αποτέλεσμα και υψηλότερο ιϊκό φορτίο 24 ώρες μετά τη μόλυνση, επομένως αποφασίστηκε στα πειράματα που ακολούθησαν να χρησιμοποιηθεί η μεγαλύτερη δόση (2×10^7 TCID₅₀) και για τις δύο ηλικιακές ομάδες.



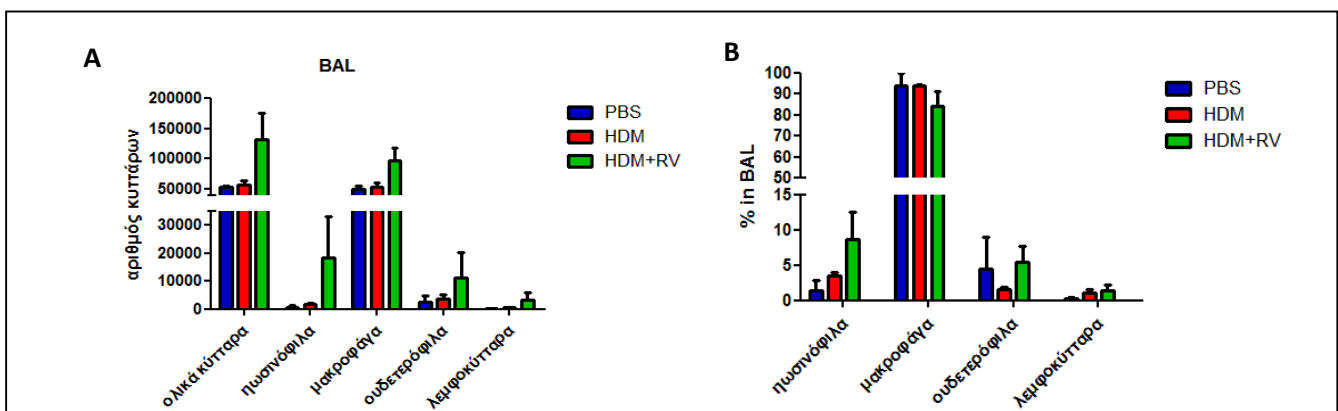
Εικόνα 3. Ανάλυση του ιϊκού φορτίου στους πνεύμονες νεογνικών μυών 24 ώρες μετά από τη χορήγηση διαφορετικών δόσεων του ρινοϊού.

Έπειτα από την επιλογή της δόσης του ρινοϊού, επόμενο βήμα ήταν η ανάπτυξη ενός μοντέλου ταυτόχρονης έκθεσης στο ρινοϊό και στο αλλεργιογόνο ακάρεα σκόνης (house dust mite, HDM) (Εικόνα 4). Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο εφαρμόστηκε σε νεογνικούς και ενήλικους μύες και χαρακτηρίστηκε η εισροή φλεγμονωδών κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL fluid) των μυών.



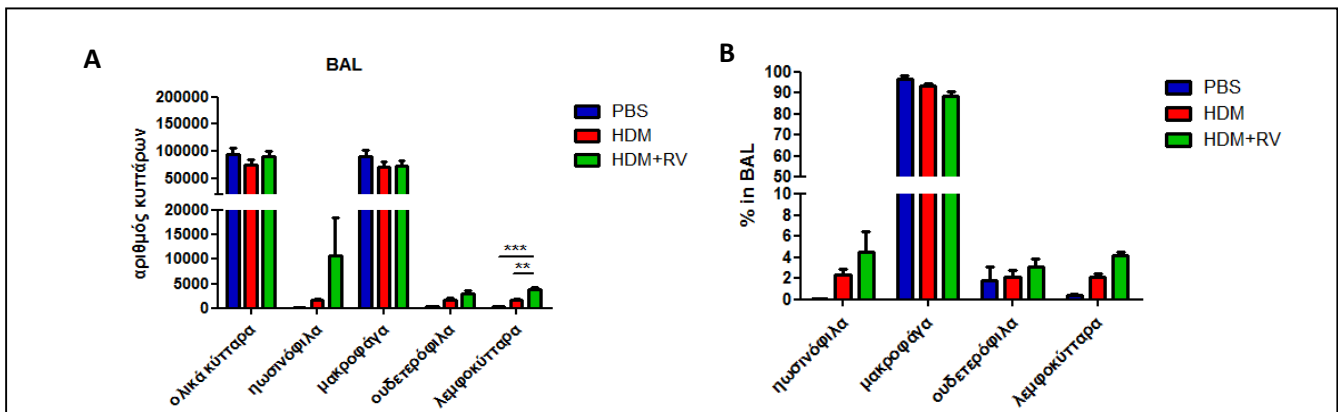
Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού πρωτοκόλλου. Μύες ηλικίας πέντε έως επτά ημερών (νεογνικοί) ή δύο μηνών (ενήλικοι) εκτέθηκαν την πρώτη μέρα σε ρινοϊό (RV) και ακάρεα σκόνης (HDM). Ακολούθησαν τρεις επανεκθέσεις σε HDM και έντεκα μέρες μετά πραγματοποιήθηκε η ανάλυση.

Η διαφορική καταμέτρηση των κυττάρων που συλλέχθηκαν από το BAL των νεογνικών μυών την ημέρα της ανάλυσης κατέδειξε πως η χορήγηση του HDM δεν οδήγησε σε αύξηση των ολικών κυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (PBS) (Εικόνα 5). Αντίθετα, η ταυτόχρονη έκθεση των νεογνών στο αλλεργιογόνο και στο ρινοϊό οδήγησε σε αύξηση των ολικών κυττάρων, λόγω της αύξησης των ηωσινοφίλων και ουδετεροφίλων.



Εικόνα 5. Διαφορική καταμέτρηση των κυττάρων βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (A) ως απόλυτοι αριθμοί και (B) ως ποσοστά, έντεκα μέρες μετά την τελευταία έκθεση στο HDM σε νεογνικούς μύες.

Στους ενήλικους μύες, ενώ δε σημειώθηκε καμία διαφορά στον αριθμό των ολικών κυττάρων μεταξύ των τριών ομάδων, παρατηρήθηκε διαφορά στη σύσταση τους (Εικόνα 6). Παρουσία του RV, σημειώθηκε αύξηση των ηωσινοφίλων καθώς επίσης και σημαντική αύξηση των λεμφοκυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα που εκτέθηκε μόνο στο αλλεργιογόνο. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί και βασική διαφορά μεταξύ των δύο ηλικιακών ομάδων, καθώς υποδεικνύει την έλλειψη ωρίμανσης του ανοσοποιητικού συστήματος των νεογνικών μυών.



Εικόνα 6. Διαφορική καταμέτρηση των κυττάρων βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (A) ως απόλυτοι αριθμοί και (B) ως ποσοστά, έντεκα μέρες μετά την τελευταία έκθεση στο HDM σε ενήλικους μύες. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Συνολικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται φανερό πως η έκθεση στο αλλεργιογόνο HDM προκαλεί μια ήπια φλεγμονή στους νεογνικούς και ενήλικους μύες, η οποία όμως ενισχύεται όταν συνδυαστεί με έκθεση στον ρινοϊό κυρίως κατά την νεογνική ηλικία. Έχοντας ως εργαλείο το συγκεκριμένο μοντέλο 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.

Ιούλιος 2015, Αθήνα

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί μύες πέντε έως επτά ημερών (νεογνικοί μύες) και δύο μηνών (ενήλικοι μύες) της φυλής C57BL/6.

2. Παραγωγή ανθρώπινου ρινοϊού

Η παραγωγή καθώς και η τιτλοδότηση του ρινοϊού αναπτύχθηκε σε ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα HeLa H1 και HeLa Ohio αντίστοιχα (NW. Bartlett et al. *Nature Medicine* **14**, 199 - 204 (2008)). Η απομόνωση του ρινοϊού πραγματοποιείται έπειτα από λύση των μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων και η συμπύκνωση του σε PBS έπειτα από διαδοχικές υπερφυγοκεντρίσεις στις 4000g, 15min, 4 °C.

3. Μοντέλο ρινοϊκής λοίμωξης και αλλεργικής φλεγμονής

Η ενδορρινική χορήγηση του ρινοϊού και του αλλεργιογόνου σε νεογνικούς μύες πραγματοποιήθηκε έπειτα από κρυοαναισθησία. Συνοπτικά, ένα φύλλο αλουμινίου τοποθετήθηκε σε θρυμματισμένο πάγο και διαμορφώθηκε για να σχηματίσει μία στενή αυλάκωση, αρκετά μεγάλη για να φιλοξενήσει ένα νεογέννητο μυ, μεγιστοποιώντας έτσι την έκθεσή του σε χαμηλή θερμοκρασία. Έπειτα από 10 λεπτά παραμονής στον πάγο, τα νεογνά βρίσκονται υπό αναισθησία, οπότε καθίσταται δυνατή η ενδορρινική χορήγηση. Αντίθετα, η ενδορρινική χορήγηση στους ενήλικους μύες πραγματοποιήθηκε έπειτα από αναισθητοποίηση με τη χρήση κεταμίνης/ξυλαζίνης.

Στο μοντέλο ρινοϊκής λοίμωξης χορηγήθηκαν ενδορρινικά 10μl και 40μl ρινοϊού (ποσότητα ιού ανάλογη με τον πειραματικό σχεδιασμό) σε νεογνικούς και ενήλικους μύες αντίστοιχα. Για την ανάλυση του ιϊκού φορτίου και τα επίπεδα mRNA του CD45 στον πνεύμονα των μυών, συλλέχθηκαν οι πνεύμονες σε υγρό άζωτο και έπειτα από RNA extraction και cDNA σύνθεση, έγινε η ποσοτικοποίηση με Real-Time PCR. Όσον αφορά την πειραματική οργάνωση, οι μύες (νεογνικοί και ενήλικες) χωρίστηκαν σε τρεις πειραματικές ομάδες:

1. Μύες που τους χορηγήθηκε ενδορρινικά PBS (PBS ομάδα)
2. Μύες που τους χορηγήθηκε ενδορρινικά απενεργοποιημένος ρινοϊός (boiled-RV)
3. Μύες που τους χορηγήθηκε ενδορρινικά ενεργός ρινοϊός (RV)

Στο μοντέλο ρινοϊκής λοίμωξης και αλλεργικής φλεγμονής χορηγήθηκαν την πρώτη μέρα $2 \cdot 10^7$ TCID50/ml RV και 25μg HDM ανά ποντίκι (10μl στους νεογνικούς μύες και 40μl στους ενήλικους). Ακολούθησαν τρεις διαδοχικές επανεκθέσεις σε 12.5μg HDM ανά ποντίκι. Όσον αφορά την πειραματική οργάνωση, οι μύες (νεογνικοί και ενήλικες) χωρίστηκαν σε τρεις πειραματικές ομάδες:

1. Μύες που τους χορηγήθηκε ενδορρινικά PBS (PBS ομάδα)
2. Μύες που τους χορηγήθηκε ενδορρινικά HDM (HDM ομάδα)
3. Μύες που τους χορηγήθηκε ενδορρινικά την πρώτη μέρα RV με HDM (HDM+RV ομάδα)

Η θυσία των μυών και η συλλογή ιστών πραγματοποιήθηκε έντεκα μέρες μετά την τελευταία έκθεση σε HDM.

4. Απομόνωση βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος BAL

1. Ενδοτραχειακή χορήγηση 0.3ml και 0.5ml 1xPBS (2φορές) για τους νεογνικούς και ενήλικους μύες αντίστοιχα
2. Φυγοκέντρηση σε 2000rpm, 5min, 4 °C
3. Επαναδιάλυση των κυττάρων σε PBS 1% FCS για μέτρηση του ολικού αριθμού κυττάρων
4. Φυγοκέντρηση 10^5 κυττάρων σε 600rpm, 3min στο Shandon Cytospin 4
5. Χρώση με May-Grumwald (352624X, BDH) και Giemsa (350865P, BDH) για να διευκρινιστούν οι κυτταρικοί υποπληθυσμοί.