



ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ: Π.5.4

«Αξιολόγηση της φυσικής ανοσίας στην αναδόμηση των αεραγωγών (αναφορά)»

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

ΕΛΕΜΗΝΙΑΔΟΥ ΕΥΡΙΔΙΚΗ

ΚΟΛΤΣΙΔΑ ΟΥΡΑΝΙΑ

ΜΟΥΡΑΤΗΣ ΜΑΡΙΟΣ-ΑΓΓΕΛΟΣ

ΓΑΛΑΝΗ ΙΩΑΝΝΑ

ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΨΑΡΡΑΣ ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ

ΑΝΔΡΕΑΚΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ



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 5.4 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»

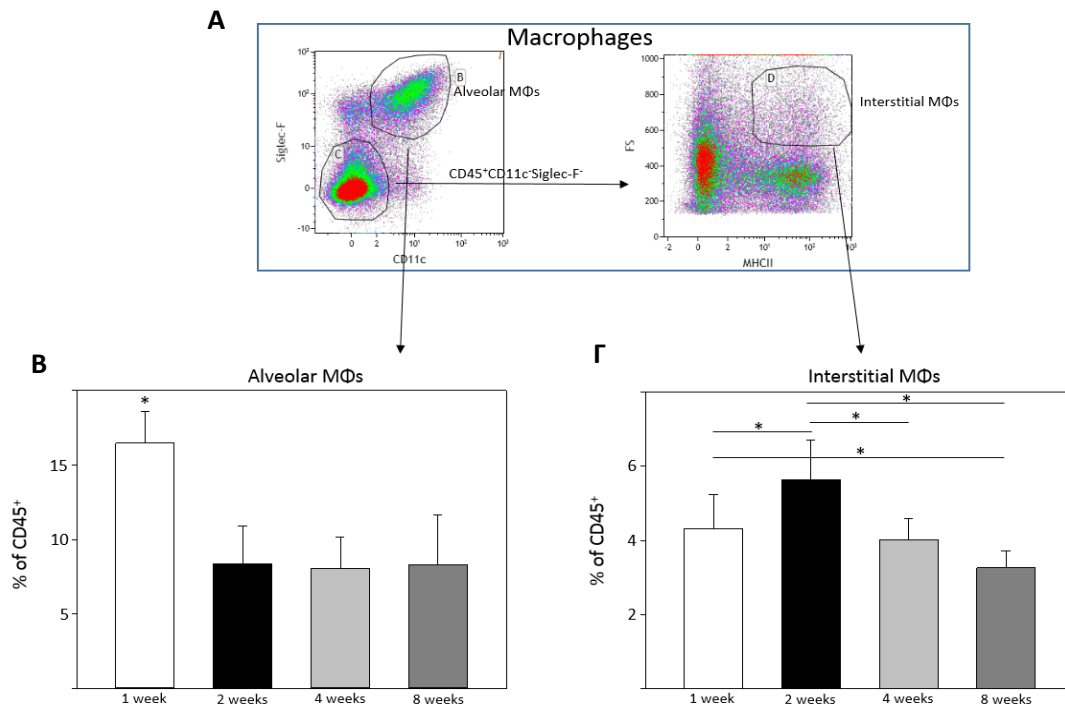
5.4 Αξιολόγηση της φυσικής ανοσίας στην αναδόμηση των αεραγωγών

Η αναδόμηση των αεραγωγών αποτελεί ένα επιπλέον χαρακτηριστικό του άσθματος που θεωρείται ότι συνεισφέρει στην βρογχική υπεραντιδραστικότητα και μπορεί να προϋπάρχει ακόμη και πριν τη συμπτωματολογία σε παιδιατρικούς ασθενείς συνεισφέροντας ενδεχομένως στην εγκαθίδρυση των δυσμενών ανοσιακών μεταβολών που συνδέονται με το άσθμα. Η λοίμωξη με ρινοϊό επάγει μονοπάτια της ιστικής αναδόμησης, όπως η ίνωση και η αυξημένη αγγείωση, όπως έδειξαν μεταξύ

άλλων και παλαιότερες δουλειές μας και μπορεί να συνεισφέρει και με αυτό τον τρόπο στην εγκαθίδρυση του άσθματος.

Τα μακροφάγα έχουν συνδεθεί τόσο με την επιτυχημένη αποκατάσταση μέσω της φαγοκυττάρωσης και της έκκρισης επολυτικών αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών και πρωτεασών, όσο και με την ανεξέλεγκτη εναπόθεση στοιχείων της εξωκυττάριας μήτρας συνεισφέροντας έτσι στην παθοφυσιολογία των ασθενειών που χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη ίνωση. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει η ιδιαίτερη ικανότητα αυτών των κυττάρων να τροποποιούν τη δράση τους (plasticity), με τα συμβατικής ενεργοποίησης μακροφάγα (M1) να προωθούν σε γενικές γραμμές τη φαγοκυττάρωση και τροποποίηση της φλεγμονώδους απόκρισης και τα εναλλακτικής ενεργοποίησης (M2) να ρυθμίζουν την αποδρομή της φλεγμονής και την αποκατάσταση του εξωκυττάρου χώρου στην πορεία προς την αναδόμηση. Σημαντική στο επίπεδο αυτό είναι η ιδιότητα των κυττάρων αυτών να εκφράζουν παράγοντες που μπορούν να επάγουν παρακρινώς την ίνωση, όπως ο TGFβ1 και η γαλεκτίνη-3. Στο άσθμα, και ειδικότερα στο μεταλοιμώδες, ο ρόλος των μακροφάγων δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί και οι περιορισμένες μελέτες επικεντρώνονται στο ρόλο τους στη φλεγμονή, όπου τα μόνιμα πνευμονικά μακροφάγα μπορεί να δρουν προστατευτικά, ενώ τα διηθούμενα να την προάγουν. Επιπλέον, η ύπαρξη δύο τουλάχιστον τοπολογικά διακριτών υποπληθυσμών μόνιμων μακροφάγων του πνεύμονα (διάμεσα και κυψελιδικά) καθιστά αναγκαία την ανάλυση των επιπέδων, των χαρακτηριστικών τους, αλλά και των ενδεχόμενων διαφορετικών τους ρόλων στη φλεγμονή και την αναδόμηση του άσθματος κατά τη διάρκεια της ωρίμανσή τους.

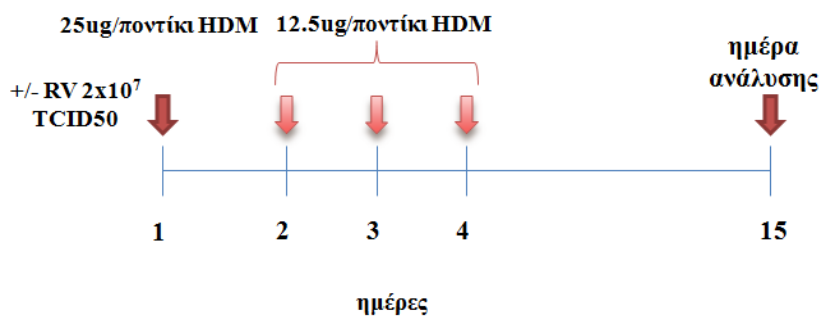
Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής τα κυψελιδικά και διάμεσα πνευμονικά μακροφάγα κατά τις 4 πρώτες εβδομάδες της ζωής των μυών. Παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα των κυψελιδικών μακροφάγων μετά την πρώτη εβδομάδα και διατήρηση των επιπέδων τους στη συνέχεια (Εικόνα 1B). Αντίθετα, τα διάμεσα μακροφάγα εμφάνισαν αρχικά μια αύξηση των σχετικών επιπέδων τους στον πνεύμονα μεταξύ πρώτης και δεύτερης εβδομάδας μετά τη γέννηση, ενώ στη συνέχεια μειώνονται σταδιακά, ακόμη και σε επίπεδα χαμηλότερα των νεογνικών (7 ημερών) μυών (Εικόνα 1Γ).



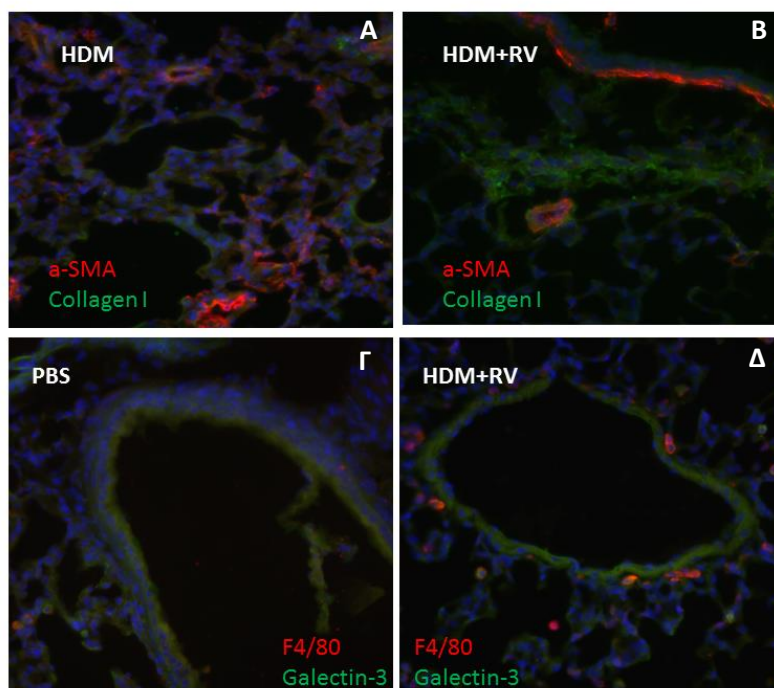
Εικόνα 1: **Ανάλυση των πνευμονικών μακροφάγων με κυτταρομετρία ροής.** Α. Στρατηγική διαχωρισμού των κυψελιδικών και διάμεσων μακροφάγων μετά από ενζυμική πέψη του πνεύμονα. Β. Σύγκριση των ποσοστών κυψελικών μακροφάγων κατά τα διάφορα ηλικιακά στάδια Γ. Σύγκριση των ποσοστών διαμέσων μακροφάγων κατά τα διάφορα ηλικιακά στάδια. * $p < 0.05$

Η διαφορική έκφραση των δύο υποπληθυσμών μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση του πνεύμονα στην αλλεργία και τις ιογενείς λοιμώξεις κατά το άσθμα, ανάλογα και με τους επιμέρους ρόλους τους που δεν έχουν ακόμη διευκρινισθεί.

Για την περαιτέρω ανάλυση της επιρροής των λοιμώξεων και του άσθματος στην ιστική αναδόμηση κατά την ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας και της συμμετοχής των μακροφάγων, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο ευαισθητοποίησης στο αλλεργιογόνο HDM συνοδευόμενο ή όχι από ρινοϊκή λοίμωξη (Εικόνα 2), όπως περιγράφηκε σε προηγούμενα παραδοτέα (Π5.2) και αναλύθηκε ο πνεύμονας με ανοσοφθορισμό για την ενδεχόμενη ενεργοποίηση των μονοπατιών της ίνωσης (εναπόθεση κολλαγόνου) και της έκφρασης μορίων που επάγουν την ίνωση από διηθούμενα μακροφάγα. Παρατηρήθηκε ότι ήδη σε αυτήν τη φάση επίδρασης του αλλεργιογόνου η λοίμωξη με ρινοϊό κατά τη νεογνική ηλικία διεγείρει ήπια αλλά υπαρκτή εναπόθεση κολλαγόνου τύπου I (Εικόνα 3B). Επιπλέον, παρατηρείται αυξημένη διήθηση μακροφάγων που εκφράζουν γαλεκτίνη-3, παράγοντας που μπορεί να εκκρίνεται και να διεγείρει παρακρινώς τα μονοπάτια της ίνωσης (Εικόνα 3Δ).

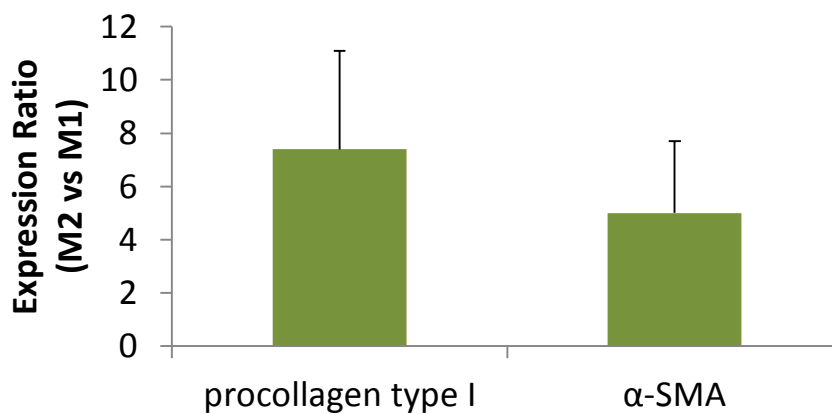


Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού πρωτοκόλλου. Μύες ηλικίας πέντε έως επτά ημερών (νεογνικοί) ή δύο μηνών (ενήλικοι) εκτέθηκαν την πρώτη μέρα σε ρινοϊό (RV) και ακάρεα σκόνης (HDM). Ακολούθησαν τρεις επανεκθέσεις σε HDM και έντεκα μέρες μετά πραγματοποιήθηκε η ανάλυση.



Εικόνα 3: Ανάλυση των πνευμόνων νεογνικών μυών έπειτα από χορήγηση PBS, HDM και HDM με ρινοϊό με ανοσοφθορισμό. Α-Β. Με α-SMA (κόκκινο) επισημαίνονται αγγειακές δομές και με κολλαγόνο τύπου I (πράσινο) τα ινίδια κολλαγόνου. Η εναπόθεση ινιδίων κολλαγόνου τύπου I στο παρέγχυμα είναι εμφανής μετά από λοίμωξη με ρινοϊό (Β). Γ-Δ. Η νεογνική λοίμωξη με ρινοϊό επάγει την διήθηση μακροφάγων (F4/80⁺, κόκκινο), πολλά εκ των οποίων εκφράζουν γαλεκτίνη-3 (πράσινο). Μπλε: πυρηνική χρώση Hoechst 33432, 40x μεγέθυνση

Τέλος, έγινε σειρά *in vitro* πειραμάτων αποτίμησης των μακροφάγων να επάγουν τις ινωτικές διεργασίες σε πνευμονικούς ινοβλάστες. Παρατηρήθηκε ότι τα εκκρίματα από τύπου M2 διεγερμένων κυψελιδικών μακροφάγων μπορούν να δειγείρουν την επούλωση *in vitro* πληγής περισσότερο από τα τύπου M1, ενώ αν η διέγερση συμπεριλαμβάνει έκθεση σε TGFβ1 οδηγεί σε περαιτέρω αυξημένη επούλωση, γεγονός που αντανακλά την αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης ή/και πολλαπλασιασμού των πνευμονικών ινοβλαστών υπό την επίδραση των κυψελιδικών μακροφάγων.



Εικόνα 4: Σύγκριση σχετικών επιπέδων έκφρασης προ-κολλαγόνου τύπου I και α-SMA σε πνευμονικούς ινοβλάστες που έχουν εκτεθεί σε εκρίματα περιτοναϊκών μακροφάγων τύπου M2 σε σχέση με έκθεση σε εκρίματα από τύπου M1 μακροφάγα.

Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με την αυξημένη ικανότητα που δείχνουν τα τύπου M2 διεγερμένα περιτοναϊκά μακροφάγα σε σχέση με τα τύπου M1 να επάγουν την έκφραση γονιδίων που μετάγουν ή ρυθμίζουν την ίνωση σε καλλιέργειες πνευμονικών ινοβλαστών (Εικόνα 4) υποδεικνύοντας ότι η κατάσταση ενεργοποίησης των κυψελιδικών και άλλων μακροφάγων παίζει σημαντικό ρόλο στην ινωτική συμπεριφορά των πνευμονικών ινοβλαστών. Αυτό έχει ακόμη ιδιαίτερη σημασία στο άσθμα όπου η ύπαρξη αυξημένων σχετικά επιπέδων εναλλακτικής ενεργοποίησης (τύπου M2) μακροφάγων στους πνεύμονες συσχετίζεται θετικά με τη δριμύτητα του άσθματος.

Συμπερασματικά, η νεογνική λοίμωξη με ρινοϊό και η έκθεση σε αλλεργιογόνα επάγει πνευμονική φλεγμονή και αναδόμηση. Η συμμετοχή των μακροφάγων και των παραγόντων επαγωγής της ίνωσης που παράγουν μπορούν να συνεισφέρουν στις διεργασίες αναδόμησης. Η παρουσία των τοπολογικά διακριτών υποπληθυσμών των πνευμονικών μακροφάγων διαφοροποιείται κατά τις 4 πρώτες εβδομάδες της ζωής του ποντικού και μπορεί να συνεισφέρει στην απόκριση στο αλλεργικό μεταλοιμώδες άσθμα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

1. Πειραματόζωα

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

2. Μοντέλο ρινοϊκής λοίμωξης και αλλεργικής ευαισθητοποίησης

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 και αλλεργικής ευαισθητοποίησης χορηγήθηκαν την πρώτη μέρα 2×10^7 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.

3. Ενζυμική πέψη του πνεύμονα και κυτταρομετρία ροής

Έπειτα από θυσία των ζώων, συλλέχθηκαν οι πνεύμονες και πραγματοποιήθηκε πέψη παρουσία των ενζύμων κολλαγενάση I και DNase I, στους 37°C για μία ώρα. Αποκτήθηκαν εναιωρήματα πνευμονικών κυττάρων με διήθηση από φίλτρο 40μm και έπειτα από καταμέτρηση ακολούθησε χρώση των κυττάρων με διάφορους δείκτες για να αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής.

4. Απομόνωση και καλλιέργεια πνευμονικών ινοβλαστών

Ενήλικες μύες αναισθητοποιήθηκαν και θυσιάστηκαν με κρανιοαυχενική παρεκτόπιση μετά από αναισθησία. Πραγματοποιήθηκε εξαγωγή και τοποθέτηση του πνευμονικού ιστού σε ψυχρό ρυθμιστικό διάλυμα (π.χ. HBSS). Χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των λοβών δεξιού και αριστερού πνεύμονα (σύνηθες πρωτόκολλο) ή διαχωρισμός του περιφερικού εξωτερικού τμήματος πλάτους περίπου 0.5 cm. Οι ιστοί επώαστηκαν σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει 0.1% collagenase IV, 0.2% trypsin και 0.4 mg/ml DNase I για 30 min/37°C υπό ανάδευση. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε φλάσκα κυτταροκαλλιέργειας 25 cm² και μετά από την παραμονή σε επωαστικό κλίβανο για 12-16 ώρες, προστέθηκε φρέσκο πλήρες θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ανακαλλιιεργήθηκαν (passaging) σε λόγο 1:2-1:3 μέχρι την χρήση τους (passage 2-4).