



## ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ: Π.5.2

### «ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΛΛΕΡΓΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ (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-

ΓΕΩΡΓΙΑ



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



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 5.2 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:

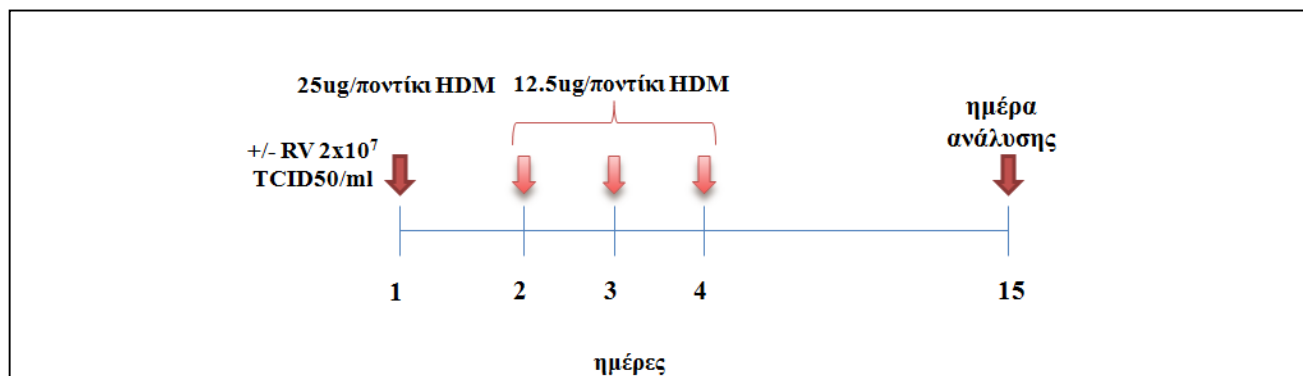
Αναπτύχθηκε πρωτόκολλο για τη μελέτη της επιρροής ρινοϊκής λοίμωξης στην αλλεργική ευαισθητοποίηση σε πειραματικό μοντέλο μυός και χαρακτηρίστηκαν οι ανοσιακές αποκρίσεις έπειτα από επανέκθεση στο αλλεργιογόνο.

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

## 5.2 Ανάλυση της φυσικής ανοσίας στην αλλεργική ευαισθητοποίηση

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 ευαισθητοποίηση 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) (Εικόνα 1). Στη συνέχεια, χαρακτηρίστηκαν οι ανοσολογικές αποκρίσεις στον σπλήνα και στους μεσοθωρακικούς λεμφαδένες έπειτα από επαναδιέγερση με HDM.

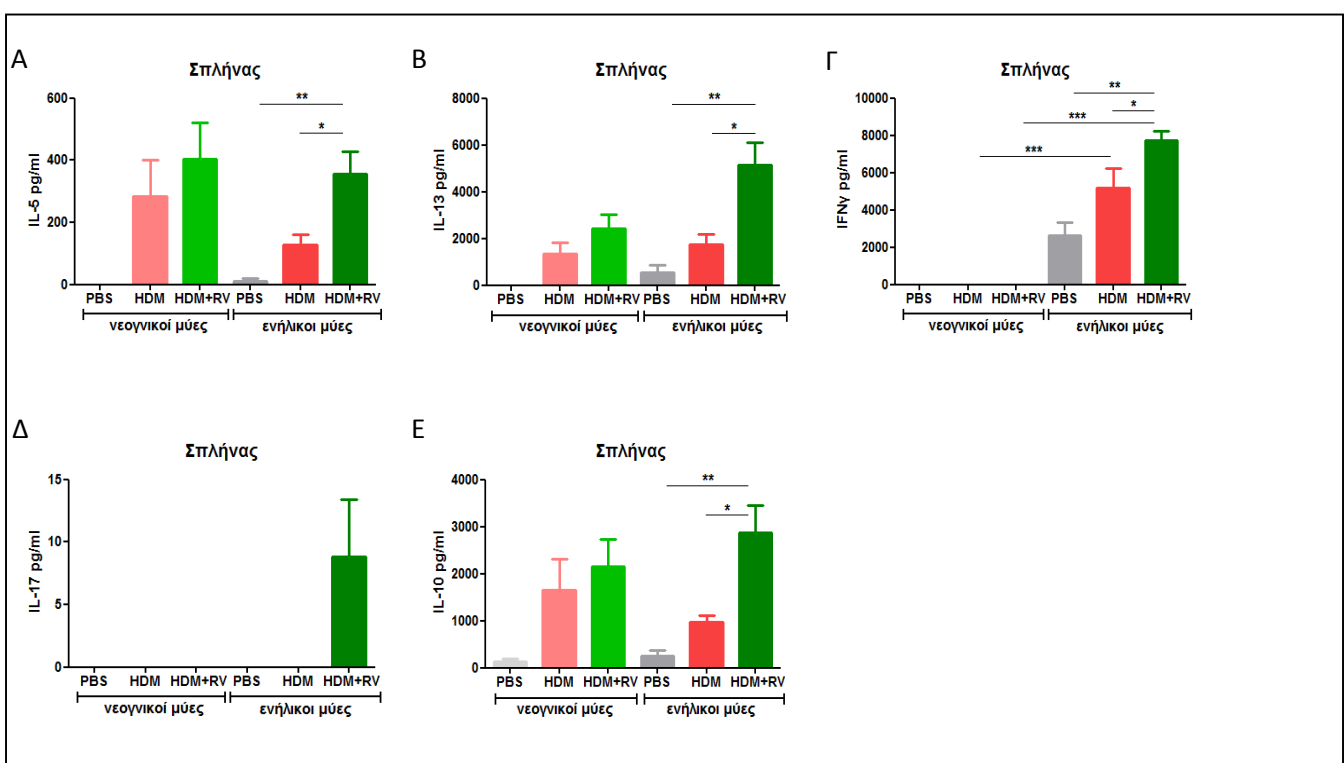


**Εικόνα 1:** Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού πρωτοκόλλου. Μύες ηλικίας πέντε έως επτά ημερών ή ενήλικοι μύες (δύο μηνών) εκτέθηκαν την πρώτη μέρα σε ρινοϊό (RV) και ακάρεα σκόνης (HDM). Ακολούθησαν τρεις επανεκθέσεις σε HDM και έντεκα μέρες μετά πραγματοποιήθηκε η ανάλυση.

Παρατηρήθηκε πως οι ειδικές Th2 ανοσιακές αποκρίσεις έναντι του αλλεργιογόνου HDM στο σπλήνα και στους μεσοθωρακικούς λεμφαδένες ήταν παρόμοιες μεταξύ των νεογνικών και ενήλικων μύων (Εικόνες 2A-B, 3A-B). 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 2Ε, 3Ε). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε επαγωγή της IL-17 στο σπλήνα και στους λεμφαδένες των νεογνικών μυών σε αντίθεση με τους ενήλικες (Εικόνες 2Δ, 3Δ).

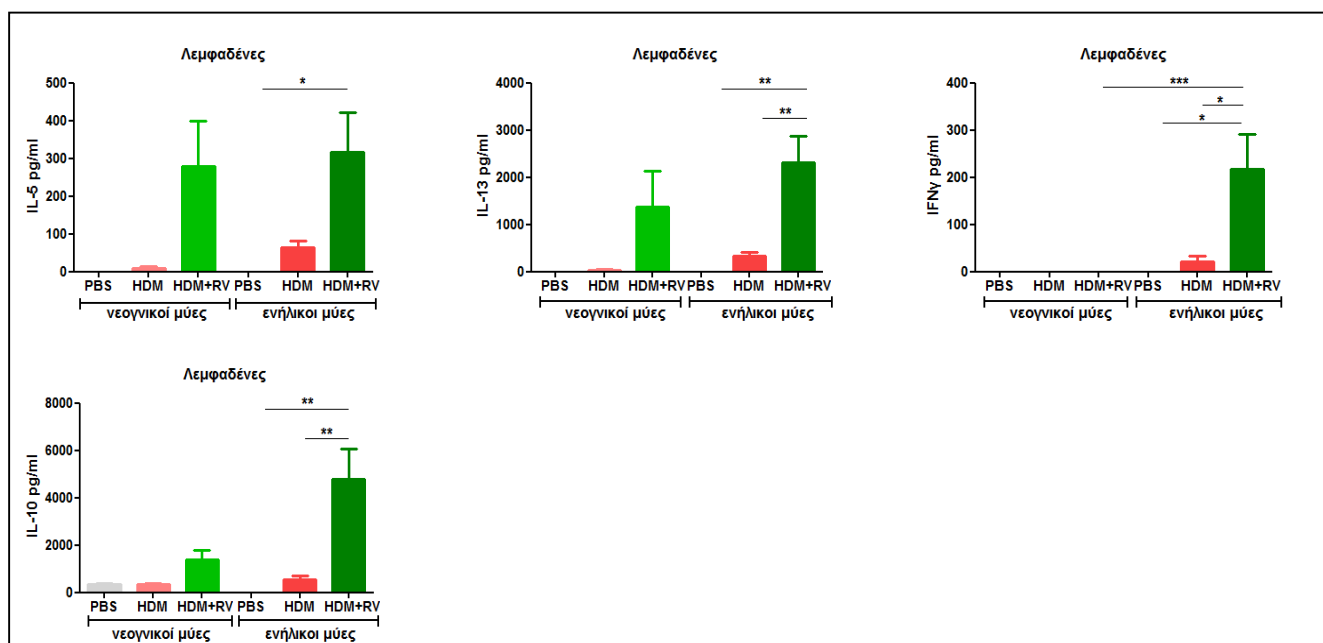
Η ευαισθητοποίηση στο αλλεργιογόνο HDM, όταν συνδυαστεί με ρινοϊκή λοίμωξη φαίνεται πως οδηγεί σε εντονότερη ανοσιακή απόκριση. Πιο συγκεκριμένα, η λοίμωξη από τον ρινοϊό τείνει να αυξάνει τα επίπεδα των κυτοκινών IL-5, IL-13 και IL-10 σε σχέση με το HDM στο σπλήνα και στους λεμφαδένες των νεογνικών μυών, ενώ τα αυξάνει σημαντικά στους ενήλικους μύες (Εικόνες 2Α-Β, 2Δ, 3Α-Β, 3Δ).



**Εικόνα 2:** Χαρακτηρισμός των ειδικών ανοσιακών απαντήσεων έναντι του αλλεργιογόνου HDM και του ρινοϊού στον σπλήνα. Ενωίωρημα κυττάρων σπληνός καλλιεργήθηκε παρουσία 30 $\mu$ g/ml HDM για τέσσερις ημέρες. Στα υπερκείμενα των καλλιεργείων ελέγχθηκε η παρουσία των Th2 (Α, Β), Th1 (Γ) και Th17 (Δ) κυτοκινών IL-5, IL-13, IFN $\gamma$  και IL-17 αντίστοιχα και της αντι-φλεγμονώδους IL-10 (Ε) 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 IFN $\gamma$  στο σπλήνα και στους λεμφαδένες των νεογνικών μυών. Αντίθετα, στους ενήλικες μύες παρατηρήθηκε περιορισμένη παραγωγή IFN $\gamma$  έπειτα

από έκθεση στο HDM στο σπλήνα και στους λεμφαδένες, η οποία αυξήθηκε σημαντικά μετά από τη συνδυαστική λοίμωξη με τον ρινοϊό (Εικόνες 2Γ, 3Γ).



**Εικόνα 3:** Χαρακτηρισμός των ειδικών ανοσιακών απαντήσεων έναντι του αλλεργιογόνου HDM και του ρινοϊού στους λεμφαδένες. Εναιώρημα κυττάρων από τους μεσοθωρακικούς λεμφαδένες καλλιεργήθηκε παρουσία 30ug/ml HDM για τέσσερις ημέρες. Στα υπερκείμενα των καλλιεργειών ελέγχθηκε η παρουσία των Th2, Th1 και Th17 κυτοκινών IL-5, IL-13, IFN $\gamma$  και IL-17 αντίστοιχα και της αντι-φλεγμονώδους IL-10 με τη μέθοδο της ELISA. N= 5-9 μύες ανά ομάδα. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Συνολικά, η έκθεση στο αλλεργιογόνο HDM επάγει παρόμοιες Th2 ανοσολογικές αποκρίσεις στον σπλήνα και τους λεμφαδένες των νεογνικών και ενήλικων μύων 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.

Ιούλιος 2015, Αθήνα

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### 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 4000 rpm, 15min, 4 °C.

## **3. 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  $2 \times 10^7$  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 μεσοθωρακικών λεμφαδένων και σπληνός**

Κατόπιν θυσίας των μυών συλλέχθηκαν οι μεσοθωρακικοί λεμφαδένες και ο σπλήνας.

#### Συλλογή μεσοθωρακικών λεμφαδένων:

1. Μετατροπή των λεμφαδένων σε εναιώρημα μονών κυττάρων σε RPMI (RPMI+Glutamax 61870 Gibco, 10% FCS –10500 Gibco , 1% P/S, 15070 Gibco) έπειτα από διήθηση με 70μm cell strainer
2. Καλλιέργεια  $5 \times 10^6$  κυττάρων/ml σε 96 well plate (U-bottom 96-well plate 92097, TRP)
3. Προσθήκη 30μg/ml HDM στην καλλιέργεια για 96 ώρες
4. Συλλογή υπερκείμενων των καλλιεργείων και μέτρηση των επιπέδων IL-13, IL-5, IL-10, IL-17 και IFN $\gamma$  με ELISA.

#### Συλλογή σπληνός:

1. Μετατροπή του σπλήνα σε εναιώρημα μονών κυττάρων σε RPMI (RPMI+Glutamax 61870 Gibco, 10% FCS –10500 Gibco , 1% P/S, 15070 Gibco) έπειτα από διήθηση με 70μm cell strainer
2. Καλλιέργεια  $5 \times 10^6$  κυττάρων/ml σε 96 well plate (U-bottom 96-well plate 92097, TRP)
3. Προσθήκη 30μg/ml HDM στην καλλιέργεια για 96 ώρες
4. Συλλογή υπερκείμενων των καλλιεργείων και μέτρηση των επιπέδων IL-13, IL-5, IL-10, IL-17 και IFN $\gamma$  με ELISA.