



Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Θετικών Επιστημών – Τμήμα Βιολογίας
Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου

**Μηχανισμοί ενεργοποίησης λευκοκυττάρων με ανοσοενισχυτικά πεπτίδια
του θύμου αδένου. Ανάπτυξη μεθόδου αξιολόγησης της δραστηριότητας
των πεπτιδίων**

Διδακτορική Διατριβή
της
Πηνελόπης Σαμαρά
Βιολόγου

Αθήνα 2014



National and Kapodistrian University of Athens
School of Sciences – Faculty of Biology
Department of Animal and Human Physiology

Mechanisms of leukocyte activation by immunoenhancing thymic peptides.
Development of an assay for the evaluation of the activity of the peptides

PhD Thesis
of
Pinelopi Samara
Biologist

Athens 2014

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Τσιτσιλώνη Ουρανία Επίκουρη Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Βοργιάς Κωνσταντίνος Καθηγητής, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Γερμενής Αναστάσιος Καθηγητής, Τομέας Κλινικοεργαστηριακός, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τσιτσιλώνη Ουρανία Επίκουρη Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Βοργιάς Κωνσταντίνος Καθηγητής, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Γερμενής Αναστάσιος Καθηγητής, Τομέας Κλινικοεργαστηριακός, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Ευθυμιόπουλος Σπυρίδων Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Θυφρονίτης Γεώργιος Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Σιδεράς Πασχάλης Ερευνητής Α', Διευθυντής Κέντρου Ανοσολογίας και Μεταμοσχεύσεων, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών
Μαστέλλος Δημήτριος Ερευνητής Β', Ι/ΠΡΕΤΕΑ, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος»
Τσιτσιλώνη Ουρανία Επίκουρη Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

N.5343/1932 άρθρο 202

Στους γονείς μου

Στην «οικογένειά» μου

The brick walls are there for a reason. The brick walls are not there to keep us out; the brick walls are there to give us a chance to show how badly we want something. The brick walls are there to stop the people who don't want it badly enough. They are there to stop the other people...

Randy Pausch, The Last Lecture

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, έφτασε η στιγμή να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην πραγματοποίηση και επιτυχή περάτωσή της. Χωρίς την πολύτιμη συμβολή τους, δε θα ήταν εφικτή η επιτυχημένη διεξαγωγή της διατριβής αυτής. Η διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας κ. Ουρανίας Τσιτσιλώνη, κατά το χρονικό διάστημα 2009-2014.

Το πρώτο και μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω στην επιβλέπουσα της διατριβής, κ. Τσιτσιλώνη, για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με την έρευνα στον τομέα της Ανοσολογίας. Μία διάλεξή της γύρω από την ανοσοεπιτήρηση και το πώς ένα καρκινικό κύτταρο μπορεί να ξεγελάσει το ανοσοποιητικό σύστημα ήταν αρκετή για να με συναρπάσει και να με οδηγήσει να ασχοληθώ με τον τομέα αυτό. Η επιμονή της, η αγάπη της για την έρευνα και η αφοσίωσή της σε αυτή, όλα αυτά τα χρόνια, με καθοδήγησαν και με βοήθησαν στη διεκπεραίωση όλων των πειραματικών στόχων. Οι συμβουλές, οι παρατηρήσεις, τα σχόλια και η βοήθειά της σε όλα τα επίπεδα θα με συντροφεύουν πάντα.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Κ. Βοργιά για τη συμμετοχή του στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή, για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του. Ευχαριστώ ιδιαίτερα και το τρίτο μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Α. Γερμενή. Οι συζητήσεις μαζί του, οι εύστοχες παρατηρήσεις και η συνεισφορά του στο κλινικό κομμάτι της διατριβής υπήρξαν καθοριστικές για την περάτωσή της.

Θερμές ευχαριστίες στα τέσσερα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής, τους Αναπληρωτές Καθηγητές κ. Σ. Ευθυμιόπουλο και κ. Γ. Θυφρονίτη, τον Ερευνητή Α' κ. Π. Σιδερά και τον Ερευνητή Β' κ. Δ. Μαστέλλο για την τιμή που μου έκαναν με τη συμμετοχή τους στην Εξεταστική Επιτροπή, καθώς και για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις τους.

Θέλω να ευχαριστήσω ξεχωριστά τη Δρ. Κ. Ιωάννου, με την οποία ξεκινήσαμε μαζί πριν από επτά χρόνια το ταξίδι μας στα δύσκολα μονοπάτια της έρευνας και της ανοσολογίας. Μπορεί το τελευταίο διάστημα να εργάζεται σε ένα καινούργιο εργαστήριο στο εξωτερικό, αλλά η επικοινωνία και η ανταλλαγή απόψεων πάνω σε επιστημονικά ζητήματα γίνεται καθημερινά, σα να μη χωρίσαμε ποτέ.

Στο εργαστήριο όλα αυτά τα χρόνια πέρασαν άνθρωποι με τους οποίους συνεργάστηκα άψογα και έμαθα από εκείνους. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη Δρ. Μ. Σκοπελίτη, καθώς ήταν η πρώτη από την οποία διδάχθηκα βασικές τεχνικές ως προπτυχιακή φοιτήτρια ακόμα. Θέλω, επίσης, να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά που συνάντησα στο εργαστήριο αυτό και να απευθύνω ιδιαίτερες ευχαριστίες σε αυτά που παρέμειναν και φίλοι μου, στη Θεοδώρα, τη

Νάνσυ, τον Τάσο, τη Νίκη, τη Λίλλιαν, τον Πλάτωνα. Επιπλέον, να ευχαριστήσω τα παιδιά που βρίσκονται φέτος στο εργαστήριο για τις προπτυχιακές διπλωματικές τους εργασίες, το Νίκο, τη Σπυριδούλα, την Ελευθερία, τη Θέμις, τον Δαβίδ, τον Πάνο, καθώς και τον μεταπτυχιακό φοιτητή Σωτήρη Φόρτη. Παρότι με πέτυχαν στο τέλος της διατριβής, σε διαδικασία συγγραφής, ελπίζω η όποια βοήθεια μου προς εκείνους να ήταν ουσιαστική. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στο Δρ. Ι. Βουτσά για όλη τη βοήθειά του και ιδιαίτερα την καθοριστική συμβολή του στις αναλύσεις με το κυτταρόμετρο ροής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη ΔΕΠ και όλο το προσωπικό του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε και τη βοήθεια που μου προσέφεραν όποτε χρειάστηκε. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Π. Παπαζαφείρη και τη Δρ. Όλγα Μαυροφρύδη για τη βοήθειά τους σε πειραματικές διαδικασίες.

Πέρα από τους βασικούς συντελεστές εντός του Τμήματος Βιολογίας, υπήρξε ένα πλήθος ανθρώπων εκτός, που με βοήθησε απλόχερα και ουσιαστικά. Ξεκινώ με τους συνεργάτες από το Πανεπιστήμιο του Tübingen στη Γερμανία, τους Καθηγητές κ. W. Voelter και κ. H. Kalbacher. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στον κ. H. Kalbacher, τους συνεργάτες του A. Maurer και B. Amin, καθώς και όλη την ομάδα του, για τη φιλοξενία στο εργαστήριό του και την απλόχερη βοήθεια και καθοδήγηση στις πειραματικές διαδικασίες της ELISA. Δε θα ξεχάσω ποτέ μία μικρή ελληνική σημαία που κρέμασε στο εργαστήριο, την πρώτη μέρα που πήγα εκεί. Ευχαριστώ, επίσης, για την πολύτιμη βοήθειά τους στα *in vivo* μοντέλα τους συνεργάτες από το Βουκουρέστι της Ρουμανίας, Δρ. M. Neagu και Δρ. D. Radu από τα Ινστιτούτα «Victor Babes» και «Cantacuzino», αντίστοιχα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Ε. Λιβανίου, την υποψήφια διδάκτορα κ. Χ. Καραχάλιου και όλη την ομάδα από το «ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος» για τη συνεργασία και τη βοήθειά τους. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στη Δρ. Β. Μυριαγκού και την ομάδα της από το Εργαστήριο Βακτηριολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ για την καθοριστική συμβολή τους στα πειράματα σηψαιμίας στα ζώα. Ευχαριστώ θερμά τη μικροβιολόγο κ. Μ. Δενδρινού-Γκραίκου για την παροχή ορών από υγιείς δότες.

Η συνεργασία με διάφορες κλινικές ήταν, επίσης, απαραίτητη και καθοριστική για την ολοκλήρωση της διατριβής. Ευχαριστώ ιδιαίτερα από το Α.Ο.Ν.Α. «Άγιος Σάββας» το Διευθυντή της Α΄ Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής κ. Α. Αρδαβάνη και τη Διευθύντρια του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου κ. Ν. Αρνογιαννάκη για την παροχή δειγμάτων από ογκολογικούς ασθενείς. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Ε. Τσιτσάμη από τη Μονάδα Παιδιατρικής Ρευματολογίας του Νοσοκομείου Παιδών «Η Αγία Σοφία» για τη βοήθειά της και την παροχή δειγμάτων από παιδιατρικούς ασθενείς. Ευχαριστώ πολύ τον κ. Χ. Γουλουμή

από το 2^ο Περιφερειακό Κέντρο Αιμοδοσίας του Γ.Ν.Α «Λαϊκό» για την παροχή αίματος από υγιείς δότες. Βαθύτατες ευχαριστίες στην κ. Ν. Μαγκίνα, Διευθύντρια της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας του «Κωνσταντοπούλειου» Γ.Ν. Νέας Ιωνίας, στην Επιμελήτρια Α' κ. Α. Κουνουγέρη, την Επιμελήτρια Β' κ. Μ. Κατσιάρη και όλο το προσωπικό της Μονάδας, για την άριστη συνεργασία και απλόχερη βοήθειά τους στη συλλογή δειγμάτων από ασθενείς της ΜΕΘ, καθώς και την εμπειριστατωμένη ανάλυση των περιστατικών αυτών.

Πέρα από τους ανθρώπους που συνέβαλαν πρακτικά στην ολοκλήρωση της διατριβής υπήρξαν και εκείνοι που βοήθησαν με το δικό τους ξεχωριστό τρόπο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου όπου και αν βρίσκονται, παλιούς και νέους, σχετικούς και μη με τις βιοϊατρικές επιστήμες. Ευχαριστώ πολύ την Αναστασία, την Αλεξάνδρα, τον Κώστα, τον Χρήστο, την Τζούλια, τη Μαριάννα, τον Βαγγέλη, τη Ράνια, τον Αργύρη, τον Κυριάκο, τον Σταύρο, την Κατερίνα και τον Ανδρέα, την Ευγενία και τον Νίκο, το Γιώργο, την Ελένη, τη Σταυρούλα, την Έλενα, τη Σάντυ, την Ειρήνη, την Αθηνά, τον Στέλιο, τη Λίτσα, τη Βιργίνια, τη Ράλλια, τον Μάριο, τον Ιωάννη Κ, τον Γιάννη Κ, τον Ιωάννη Μ και την Κατερίνα Α. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο φίλο γραφίστα Σπύρο Κόσυβα για την επιμέλεια του εξωφύλλου.

Το τελευταίο και απέραντο ευχαριστώ πηγαίνει στους γονείς μου, Αναστάσιο και Σταματούλα, για όλες τις θυσίες που έχουν κάνει για μένα μέχρι τώρα και για όσα μου έχουν προσφέρει, καθώς και στον αδερφό μου Γιάννη. Αντίστοιχες θερμές ευχαριστίες οφείλω και σε όλη την υπόλοιπη οικογένειά μου, που ήταν πάντα δίπλα μου και με ενθάρρυνε να συνεχίσω.

Κλείνοντας θα ήθελα να μοιραστώ την εξής σκέψη μου... Η διδακτορική αυτή διατριβή ήταν σα μία βάρκα, που ξεκίνησε σιγά-σιγά το ταξίδι της στις θάλασσες, αντιμετώπισε κύματα και θαλασσοταραχές στην πορεία της, αλλά τελικά κατάφερε να πλεύσει ασφαλώς και να φτάσει στο λιμάνι...

Πηνελόπη Σαμαρά

Απρίλιος 2014

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline- 6-sulphonic acid)	2,2'-αζινο-δισ (3-αιθυλβενζοθειαζολινο- 6-σουλφονικό οξύ)
ACN	acetonitrile	ακετονιτρίλιο
Apaf	apoptotic protease activating factor	παράγοντας ενεργοποίησης των αποπτωτικών πρωτεασών
APRIL	proliferation-inducing ligand	συνδέτης που επάγει πολλαπλασιασμό
APS	ammonium persulfate	υπερθειικό αμμώνιο
BAFF	B cell activating factor	παράγοντας ενεργοποίησης B κυττάρου
BSA	bovine serum albumin	αλβουμίνη ορού βοδιού
CBP	creb binding protein	πρωτεΐνη που δεσμεύει τον CREB
CFA	complete Freund's adjuvant	πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund
CFU	colony forming unit	μονάδα σχηματισμού αποικιών
CONV	conventional	συμβατικός
cpm	counts per minute	κρούσεις ανά λεπτό
CR	complement receptor	υποδοχέας συμπληρώματος
CRP	C reactive protein	C αντιδρώσα πρωτεΐνη
CTL	cytotoxic T lymphocyte	κυτταροτοξικό T λεμφοκύτταρο
DAMP	damage-associated molecular pattern	μοτίβο σχετιζόμενο με βλάβες
DELFLIA	dissociation enhanced lanthanide fluorescent immunoassay	φθορισμομετρική ανοσοδοκιμασία που βασίζεται στον ενισχυμένο διαχωρισμό λανθανιδών
DHB	2,5-dihydroxybenzoic acid	2,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ
DHR	dihydrorhodamine	διυδροροδαμίνη
DMSO	dimethylsulfoxide	διμεθυλοσουλφοξείδιο
DPBS	Dulbecco's phosphate buffer solution	πρότυπο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco's
DS	differential solubilization	διαφορική διαλυτοποίηση
DTT	dithiothreitol	διθειοθρεϊτόλη

ECL	enhanced chemiluminescence kit	kit ενισχυμένης χημειοφωταύγειας
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία
ER	estrogen receptor	υποδοχέας οιστρογόνου
Eu	europium	ευρώπιο
FBS	fetal bovine serum	ορός εμβρύου βοδιού
FcγRs	Fc receptors for IgG	Fc υποδοχείς για IgG
FITC	fluorescein isothiocyanate	φλουορεσκεΐνη ισοθειοκυανική
fMLP	formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine	φορμυλ-μεθειονίνη-λευκίνη-φαινυλαλανίνη
FSC	forward scatter	πρόσθιος σκεδασμός
G-CSF	granulocyte colony stimulation factor	παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων
GF	germ free	χωρίς βακτήρια
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulation factor	παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων
GPCRs	G protein-coupled receptors	υποδοχείς συζευγμένοι με G πρωτεΐνες
HAT	hypoxanthine-aminopterin-thymidine	υποξανθίνη-αμινοπτερίνη-θυμιδίνη
HBSS	Hank's balanced salt solution	ισορροπημένο διάλυμα αλάτων του Hank
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2	υποδοχέας του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2
HMGB1	high mobility group B1	ομάδα υψηλής κινητικότητας B1
HOCl	hypochlorous acid	υποχλωριώδες οξύ
HRP	horseradish peroxidase	υπεροξειδάση του ραπανίου
HSP	heat shock protein	πρωτεΐνη θερμικού shock
HT	hypoxanthine-thymidine	υποξανθίνη-θυμιδίνη
IFA	incomplete Freund's adjuvant	ατελές ανοσοενισχυτικό Freund
IFN	interferon	ιντερφερόνη
IgG	immunoglobulin G	ανοσοσφαιρίνη G
IL	interleukin	ιντερλευκίνη
iNOs	inducible nitric oxide synthase	επαγόμενη συνθάση του νιτρικού οξειδίου

Keap-1	Kelch-like ECH-associated protein 1	Kelch-τύπου ECH-σχετιζόμενη πρωτεΐνη 1
KLH	keyhole limpet hemocyanin	αιμοκυανίνη πεταλίδας
LAK	lymphokine-activated killer (cells)	ενεργοποιημένα από λεμφοκίνες φονικά (κύτταρα)
LPS	lipopolysaccharide	λιποπολυσακχαρίτης
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ ionization laser	υποβοηθούμενη από υποστρώμα, αποδέσμευση και ιονισμός με laser
MEΘ		μονάδα εντατικής θεραπείας
MFI	mean fluorescence intensity	μέση ένταση φθορισμού
MGG	May-Grünwald-Giemsa	
MHC	major histocompatibility complex	μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
MPO	myeloperoxidase	μυελοϋπεροξειδάση
MS	mass spectrometry	φασματομετρία μάζας
MyD88	myeloid differentiation factor 88	μυελοειδής παράγοντας διαφοροποίησης 88
NETs	neutrophil extracellular traps	εξωκυτταρικές παγίδες ουδετερόφιλων
NK	natural killer (cells)	φυσικά φονικά (κύτταρα)
NLS	nuclear localization signal	σήμα πυρηνικού εντοπισμού
NO	nitric oxide	νιτρικό οξείδιο
OD	optical density	οπτική πυκνότητα
παραΤα	parathymosin α	παραθυμοσίνη α
προΤα	prothymosin α	προθυμοσίνη α
PAMP	pathogen-associated molecular pattern	μοτίβο σχετιζόμενο με παθογόνα
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος
PE	phycoerythrin	φυκοερυθρίνη
PEG	polyethylene glycol	πολυαιθυλενογλυκόλη
PFA	paraformaldehyde	παραφορμαλδεΐδη
PGE2	prostaglandin E2	προσταγλανδίνη E2

PI	propidium iodide	ιωδιούχο προπίδιο
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate	φορβολικός εστέρας
PMN	polymorphonuclear	πολυμορφοπύρηνο
PR	progesterone receptor	υποδοχέας προγεστερόνης
PRR	pathogen recognition receptor	υποδοχέας αναγνώρισης παθογόνου
PSA	prostate specific antigen	ειδικό προστατικό αντιγόνο
R	rodamine	ροδαμίνη
RIA	radioimmunoassay	ραδιοδοκιμασία
ROS	reactive oxygen species	δραστικές ρίζες οξυγόνου
SAP	serum amyloid protein	συστατικό αμυλοειδές P του ορού
SCID	severe combined immunodeficiency	σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια
scr	scrambled	
SDS	sodium dodecyl-sulphate	θειικό δωδεκυλικό νάτριο
SSC	side scatter	πλάγιος σκεδασμός
Tα1	thymosin α1	θυμοσίνη α1
Tα11	thymosin α11	θυμοσίνη α11
Tβ4	thymosin β4	θυμοσίνη β4
Tβ9	thymosin β9	θυμοσίνη β9
TAL	tumor associated lymphocyte	ογκοσχετιζόμενο λεμφοκύτταρο
TAN	tumor associated neutrophil	ογκοσχετιζόμενο ουδετερόφιλο
TEMED	NNN'N'-tetramethylethylenediamine	NNN'N' τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνη
TEN	tumor entrained neutrophil	ουδετερόφιλο που έχει διεισδύσει στον όγκο
TFV	thymosin-fraction V	θυμοσίνη-κλάσμα V
TGF	transforming growth factor	αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού
TIR	TLR-IL-1 receptor	υποδοχέας IL-1 σχετιζόμενος με TLR
TIRAP	TIR-associated protein	πρωτεΐνη σχετιζόμενη με TIR
TLR	toll like receptor	υποδοχέας τύπου Toll
TNF	tumor necrosis factor	παράγοντας νέκρωσης όγκων
TOF	time of flight	χρόνος πτήσης

TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand	σχετιζόμενος με τον TNF, συνδέτης επαγωγής απόπτωσης
TRIF	TLR-associated-activator of interferon	ενεργοποιητής της ιντερφερόνης, σχετιζόμενος με TLR

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των θυμοσινών από το θύμο αδένα.....	3
1.2. Προθυμοσίνη α.....	4
1.2.1. Χαρακτηριστικά της προθυμοσίνης α.....	4
1.2.2. Ο διττός ρόλος της προθυμοσίνης α.....	4
1.2.3. Ο ενδοκυτταρικός ρόλος της προθυμοσίνης α.....	5
1.2.4. Ο εξωκυτταρικός ρόλος της προθυμοσίνης α.....	8
1.2.5. Η προθυμοσίνη α ως βιοδείκτης διάγνωσης και πρόγνωσης του καρκίνου.....	9
1.2.6. Η προθυμοσίνη α στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου.....	12
1.2.7. Το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) αποτελεί την ανοσοδραστική περιοχή της προθυμοσίνης α.....	16
1.2.8. Άλλες, πρόσφατα αναφερθείσες, δράσεις της προθυμοσίνης α.....	17
1.3. Τα φαγοκύτταρα και ο ρόλος τους στην ανοσία.....	20
1.3.1. Γενικά για τα ουδετερόφιλα ή κοκκιοκύτταρα.....	20
1.3.2. Ομοιότητα των ουδετερόφιλων.....	21
1.3.3. Στρατολόγηση των ουδετερόφιλων σε θέσεις φλεγμονής.....	21
1.3.4. Ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων.....	22
1.3.4.1. Ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων από μόρια παθογόνων ή πρωτεΐνες που σχετίζονται με κυτταρική βλάβη.....	23
1.3.4.1.1. Ενεργοποίηση μέσω υποδοχέων αναγνώρισης προτύπου (PRRs).....	23
1.3.4.1.2. Ενεργοποίηση μέσω υποδοχέων οψωνισμού (opsonic receptors).....	23
1.3.4.1.3. Ενεργοποίηση μέσω υποδοχέων συζευγμένων με G πρωτεΐνες.....	24
1.3.5. Θανάτωση παθογόνων από τα ουδετερόφιλα.....	24
1.3.5.1. Θανάτωση παθογόνων μέσω φαγοκυττάρωσης.....	24
1.3.5.2. Θανάτωση παθογόνων μέσω παραγωγής ROS.....	25
1.3.5.3. Θανάτωση παθογόνων μέσω αποκοκκίωσης.....	25
1.3.5.4. Θανάτωση παθογόνων μέσω του μηχανισμού σχηματισμού NETs (NETosis).....	25
1.3.6. Ανοσοτροποποιητικός ρόλος των ουδετερόφιλων - «κυτταρική συνομιλία».....	27
1.3.7. Ο ρόλος των ουδετερόφιλων στις χρόνιες ασθένειες, όπως ο καρκίνος.....	31
1.4. Μονοκύτταρα ή μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα.....	32
1.4.1. Ο κύκλος ζωής και οι απόγονοι των μονοκυττάρων.....	32
1.4.2. Γενικά χαρακτηριστικά των μονοκυττάρων.....	32
1.4.3. Φυσιολογικές λειτουργίες των μονοκυττάρων.....	32
1.4.3.1. Παρουσίαση αντιγόνων από τα μονοκύτταρα.....	34
1.4.3.2. Φαγοκυτταρική ικανότητα των μονοκυττάρων.....	35
1.4.3.3. Ανοσορύθμιση που επάγεται από τα μονοκύτταρα.....	35
1.4.4. Ο ρόλος των μονοκυττάρων σε ασθένειες, με έμφαση στον καρκίνο.....	36
1.4.5. Σύγκριση μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων.....	37
1.5. Ανοσοδοκιμασίες.....	38
1.5.1. Ανοσοδοκιμασία ELISA.....	39
1.5.2. Ανοσοδοκιμασίες για την προθυμοσίνη α.....	41
1.5.3. Οι ανοσοδοκιμασίες στη διάγνωση σοβαρών λοιμώξεων - πεπτίδια ως βιοδείκτες	

σήψης.....	42
1.6. Σκοπός.....	46
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	48
2.1. Καλλιέργεια και κρυσυντήρηση κυτταρικών σειρών.....	50
2.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της βιωσιμότητας κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.....	54
2.3. Απομόνωση λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών από περιφερικό αίμα ανθρώπου.....	56
2.4. Έλεγχος της φαγοκυττάρωσης σωματιδίων zymosan.....	60
2.5. Έλεγχος της ενδοκυτταρικής παραγωγής υπεροξειδικού ανιόντος - Δοκιμασία αναγωγής του κυανού του τετραζολίου (nitroblue tetrazolium, NBT).....	62
2.6. Έλεγχος της εξωκυτταρικής απελευθέρωσης υπεροξειδικού ανιόντος - Δοκιμασία αναγωγής του κυτοχρώματος c.....	64
2.7. Οξειδωτική έκρηξη φαγοκυττάρων (Δοκιμασία Bursttest).....	65
2.8. Δοκιμασία ελέγχου της κυτταροτοξικότητας με ραδιενεργό χρώμιο.....	67
2.9. Έλεγχος έκφρασης επιφανειακών δεικτών με κυτταρομετρία ροής.....	70
2.10. Διαφοροποίηση της ανθρώπινης προμυελοκυτταρικής λευχαιμικής σειράς HL-60.....	72
2.11. Χρώση May-Grünwald-Giemsa (MGG).....	74
2.12. Ανοσοστύπωμα κατά Western.....	76
2.13. Απομόνωση σπληνοκυττάρων ποντικού.....	82
2.14. Παρασκευή μονοκλωνικών αντισωμάτων.....	84
2.15. Παρασκευή πολυκλωνικών αντισωμάτων.....	90
2.16. Πρωτόκολλο απομόνωσης των ειδικών για το δεκαπεπτίδιο ανοσοσφαιρινών τάξης G (IgG) από τον αντιρό του κουνελιού.....	92
2.17. Πρωτόκολλο ανταγωνιστικής ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) για τη μέτρηση του προΤα(100-109).....	93
2.18. Πρωτόκολλο DELFIA (Dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay) για τη μέτρηση του προΤα(100-109).....	96
2.19. Μέθοδοι κατακρήμνισης πρωτεϊνών από ορούς ανθρώπου και ποντικού.....	98
2.20. Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-flight mass spectrometry).....	101
2.21. Επαγωγή συνθηκών κυτταρικού θανάτου.....	103
2.22. Έλεγχος αποπτωτικών-νεκρωτικών δεικτών με κυτταρομετρία ροής.....	105
2.23. <i>In vivo</i> μοντέλα βακτηριακών λοιμώξεων σε ποντίκια.....	108
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	110
3.1. Μελέτη της επίδρασης της προθυμοσίνης α (προΤα) και του ανοσοδραστικού της δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109), στα ανθρώπινα υδεδερόφιλα.....	112
3.1.1. Το προΤα(100-109) ενισχύει τις βασικές λειτουργίες των ουδετερόφιλων σε επίπεδα ανάλογα με αυτά που επάγονται από την προΤα.....	113
3.1.2. Το προΤα(100-109) και η προΤα αυξάνουν την κυτταροτοξικότητα των ουδετερόφιλων εναντίον καρκινικών κυττάρων-στόχων.....	121
3.1.3. Συσχέτιση της απόκρισης των ουδετερόφιλων στο προΤα(100-109) και την προΤα με ειδικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων του μαστού.....	124

3.2. Το ανοσοδραστικό δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) και η προΤα ενισχύουν τις βασικές λειτουργίες και των ανθρώπινων μονοκυττάρων.....	127
3.3. Μελέτη της επίδρασης του ανοσοδραστικού δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) και της προΤα στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HL-60.....	132
3.4. Παραγωγή αντισωμάτων για την ανάπτυξη ανοσοδοκιμασίας ELISA για το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) – ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της δοκιμασίας.....	141
3.4.1. Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων για το προΤα(100-109).....	141
3.4.2. Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων για το προΤα(100-109).....	142
3.4.3. Ευαισθησία της αναπτυχθείσας ELISA για το προΤα(100-109).....	143
3.4.4. Ειδικότητα της αναπτυχθείσας ELISA για το προΤα(100-109).....	146
3.4.5. Ο ανοσοκυρίαρχος επίτοπος των αντι-προΤα(100-109) αντισωμάτων εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 103-109.....	147
3.4.6. Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών υψηλού μοριακού βάρους από τον ορό του αίματος αυξάνει την ευαισθησία της αναπτυχθείσας ELISA για το προΤα(100-109)....	148
3.4.7. Ακρίβεια της αναπτυχθείσας ELISA για το προΤα(100-109).....	149
3.5. Ανάπτυξη φθορισμομετρικής μεθόδου DELFIA για το προΤα(100-109).....	150
3.6. Ανίχνευση του προΤα(100-109) σε υπερκείμενα κυττάρων που οδηγήθηκαν <i>in vitro</i> σε κυτταρικό θάνατο.....	151
3.7. Ανίχνευση του προΤα(100-109) σε <i>in vivo</i> μοντέλα βακτηριακής λοίμωξης σε ποντίκια.....	157
3.7.1. Ανίχνευση του προΤα(100-109) σε <i>in vivo</i> μοντέλα λοίμωξης με στελέχη των γενών <i>Pasteurella</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Streptococcus</i> και <i>Klebsiella</i>	158
3.7.2. Φασματομετρική ανίχνευση του προΤα(100-109) σε ορούς ποντικών.....	163
3.7.3 Ανίχνευση του προΤα(100-109) σε <i>in vivo</i> μοντέλο θανατηφόρου σηψαιμίας.....	165
3.8. Ανίχνευση του προΤα(100-109) σε ανθρώπινους ορούς.....	169
3.8.1. Επίπεδα του προΤα(100-109) στον ορό φυσιολογικών ατόμων.....	169
3.8.2 Ανίχνευση του προΤα(100-109) σε ορούς παιδιατρικών ασθενών.....	170
3.8.3. Ανίχνευση του προΤα(100-109) σε ορούς ασθενών που νοσηλεύονται στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ).....	172
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	176
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	196
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	214
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	226
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	232
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ.....	240
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV.....	250

1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των θυμοσινών από το θύμο αδένα

Ο θύμος αδένας είναι πρωτογενές λεμφικό όργανο, οι λειτουργίες του οποίου παρέμεναν για πολλά χρόνια άγνωστες. Σήμερα είναι γνωστός ο θεμελιώδης ρόλος του στην ωρίμανση και διαφοροποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, με εξέχουσα λειτουργία του, την ωρίμανση και την επιλογή του ρεπερτορίου των T λεμφοκυττάρων (Miller, 1963).

Στο θύμο συντίθεται μία μεγάλη ποικιλία βιολογικά ενεργών πολυπεπτιδίων με ορμονική δράση και διαφορετική χημική δομή (Schulof, 1985). *In vivo* μελέτες οδήγησαν στην ταυτοποίηση ενός θυμικού εκχυλίσματος, το οποίο ενίσχυε τον πολλαπλασιασμό των λεμφοαδενικών κυττάρων ποντικού (Klein et al., 1965). Ένα χρόνο μετά, αυτός ο παράγοντας λεμφοποίησης απομονώθηκε, χαρακτηρίστηκε, και ονομάστηκε «θυμοσίνη» (Goldstein et al., 1966). Η ίδια ερευνητική ομάδα, εφαρμόζοντας πέντε διαδοχικά στάδια καθαρισμού του θυμικού εκχυλίσματος, απομόνωσε ένα ιδιαίτερα ενεργό εκχύλισμα από θύμο αδένα μουσχαριού, το οποίο ονομάστηκε «θυμοσίνη-κλάσμα V» (TFV) (Hooper et al., 1975).

Η TFV αποτελείται από τουλάχιστον 40 μικρού μεγέθους πολυπεπτίδια, με όξινο χαρακτήρα και μοριακό βάρος από 1.000 έως 15.000 Da. Με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI) διακρίνονται σε τρεις ομάδες, που χαρακτηρίζονται με τα ελληνικά γράμματα α, β ή γ. Έτσι, στην πρώτη ομάδα ανήκουν τα πεπτίδια με $pI < 5,0$, στη δεύτερη αυτά με $5,0 \leq pI < 7,0$, ενώ στην τρίτη όσα έχουν $pI \geq 7,0$. Ένας επιπλέον αριθμός, ο οποίος δηλώνει τη σειρά με την οποία απομονώθηκε το κάθε πεπτίδιο από την TFV, αναγράφεται δίπλα από το γράμμα που χαρακτηρίζει την ομάδα στην οποία ανήκει το εκάστοτε πεπτίδιο. Τα πεπτίδια χαρακτηρίζονται ως θυμοσίνες ή απλώς πολυπεπτίδια, ανάλογα με το αν είναι βιολογικά ενεργά ή όχι, αντίστοιχα (Goldstein, 2007). Τα πολυπεπτίδια που έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα ανήκουν στις οικογένειες των α- και β-θυμοσινών, ενώ κανένα από αυτά που έχουν βρεθεί, δεν ανήκει στην οικογένεια των γ-θυμοσινών.

Η οικογένεια των α-θυμοσινών εκπροσωπείται κυρίως από τη θυμοσίνη α1 (Ta1) και την προθυμοσίνη α (προTa). Η προTa είναι το πρόδρομο μόριο της Ta1 και απομονώθηκε για πρώτη φορά από θύμο αδένα αρουραίου, 30 χρόνια πριν (Haritos et al., 1984). Θεωρείται ένα από τα βασικότερα πολυπεπτίδια υπεύθυνα για την ανοσολογική δραστικότητα της TFV και για αυτό, πλήθος ερευνών έχει εστιαστεί στη μελέτη της.

1.2. Προθυμοσίνη α

1.2.1. Χαρακτηριστικά της προθυμοσίνης α

Στον άνθρωπο, η προΤα κωδικοποιείται από μία οικογένεια γονιδίων που αποτελείται από επτά μέλη. Το γονίδιο το οποίο μεταγράφεται και μεταφράζεται σε πρωτεΐνη, περιέχει τέσσερα εσώνια, πέντε εξώνια και πολλά κλασικά ρυθμιστικά σήματα, και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 (Szabo et al., 1993). Η προΤα είναι ένα πολυπεπτίδιο περίπου 109 αμινοξικών καταλοίπων, πλούσιο σε γλουταμικό και ασπαρτικό οξύ, αποτέλεσμα του οποίου αποτελεί ο ιδιαίτερα όξινος χαρακτήρας της (pI 3,55). Εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και η πρωτοταγής της δομή στα θηλαστικά είναι υψηλά συντηρημένη. Συγκεκριμένα, υπάρχει σε αφθονία σε κύτταρα με υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό (Haritos, 1987), ενώ ο αριθμός των ενδοκυτταρικών αντιγράφων της σχετίζεται με τον κυτταρικό τύπο (Eschenfeldt and Berger, 1986). Η προΤα δεν έχει καθορισμένη δευτεροταγή δομή, αλλά πιθανόν αποκτά δομή στο χώρο μετά από αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες ή μακρομόρια στην κυτταρική επιφάνεια (Piñeiro et al., 2000), ενώ υπό ορισμένες συνθήκες (χαμηλό pH και υψηλή συγκέντρωση) δημιουργεί αμυλοειδή ινίδια (Pavlov et al., 2002). Ενδοκυτταρικά, εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα (Manrow et al., 1991), ενώ έχει αναφερθεί η συνεχής μετακίνησή της μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (Enkemann et al., 2000a). Δε διαθέτει πεπτίδιο-οδηγό και δεν εκκρίνεται με κλασικό τρόπο. Στην αλληλουχία της φέρει ένα πολύ ισχυρό, πλούσιο σε λυσίνες, διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal, NLS), που εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων $^{87}\text{KR}^{89}$ και $^{100}\text{TKKQKT}^{105}$ (Manrow et al., 1991; Rubtsov et al., 1997).

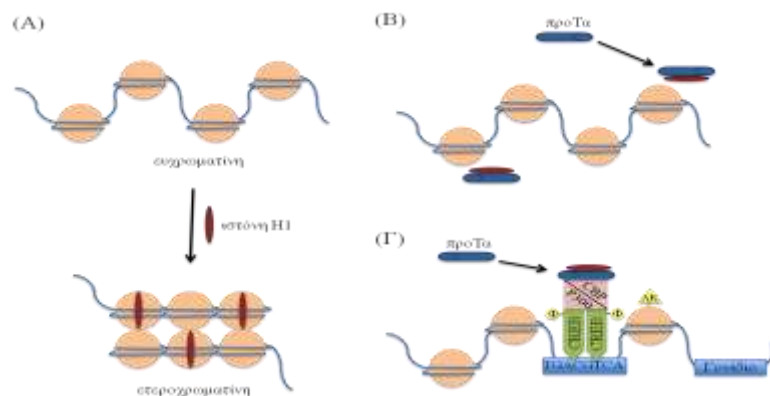
1.2.2. Ο διττός ρόλος της προθυμοσίνης α

Η προΤα είναι μία εγγενώς μη δομημένη πρωτεΐνη και διαθέτει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών, όπως και άλλες πρωτεΐνες με αντίστοιχα δομικά χαρακτηριστικά. Η παρουσία της προΤα σε όλους τους ιστούς και τα κύτταρα υποδηλώνει την καθοριστική συμμετοχή της σε σημαντικά μοριακά μονοπάτια. Οι μέχρι τώρα έρευνες υποδεικνύουν ένα διπλό ρόλο για το πολυπεπτίδιο: (α) ενδοκυτταρικά συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, ενώ (β) εξωκυτταρικά δρα ανοσορρυθμιστικά. Η απόδοση δύο διακριτών ρόλων σε πρωτεΐνες ανάλογα με τη θέση εντοπισμού τους, υποκυτταρικά ή εκτός του κυττάρου, δε χαρακτηρίζει αποκλειστικά την προΤα (Butler and Overall, 2009). Αντίστοιχοι ρόλοι έχουν αποδοθεί στην πρωτεΐνη θερμικού shock 90 (HSP90) και στην πρωτεΐνη B1 της ομάδας των πρωτεϊνών υψηλής κινητικότητας (HMGB1). Ενδοκυτταρικά, η HSP90 δρα ως μοριακή συνοδός και η HMGB1 ως ρυθμιστικό μόριο της μεταγραφής, ενώ εξωκυτταρικά, και οι δύο

επιτελούν ανοσορρυθμιστικό ρόλο, ως μεσολαβητές της προφλεγμονώδους αντίδρασης (Joly et al., 2010; Aguilera et al., 2011).

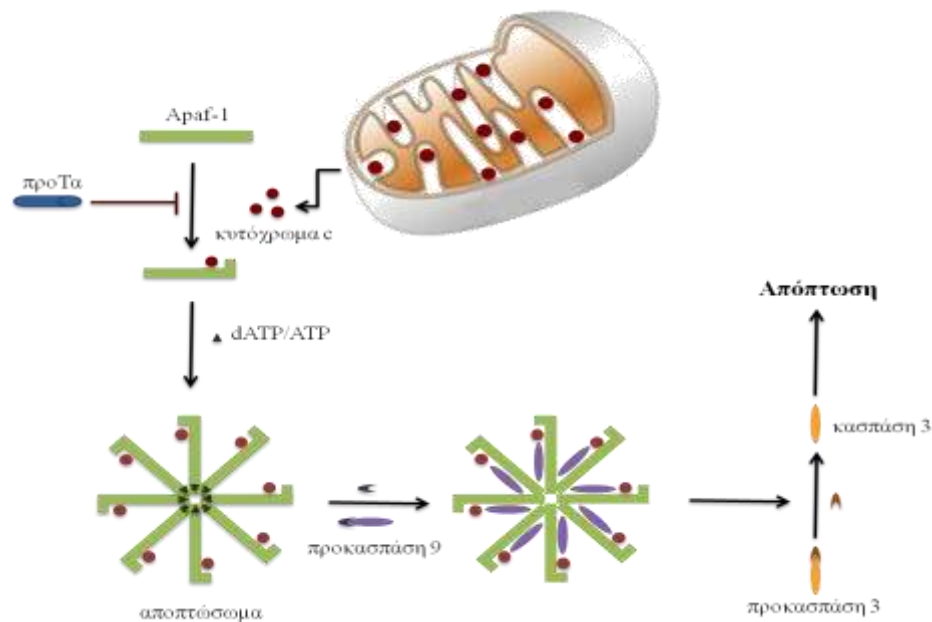
1.2.3. Ο ενδοκυτταρικός ρόλος της προθυμοσίνης α

Ο ενδοκυτταρικός ρόλος της προΤα είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς η πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών κυττάρων (Eschenfeldt and Berger, 1986). Η περιοχή η οποία είναι υπεύθυνη για τον ενδοκυτταρικό της ρόλο εντοπίζεται στο κεντρικό τμήμα του μορίου (Paramarcaki and Tsolas, 1994). Σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται έντονα έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του γονιδίου της προΤα (Eilers et al., 1991), οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση του mRNA της και σε υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης. Αναλυτικά, η προΤα φωσφορυλιώνεται (Pérez-Estévez et al., 1997) και μεταναστεύει στον πυρήνα (Manrow et al., 1991). Εκεί, αλληλεπιδρά με την ιστόνη H1 και την πρωτεΐνη που δεσμεύει τον CREB (CBP) (Karetsou et al., 2002), ενώ ρυθμίζει και τη δραστηριότητα της ακετυλοτρανσφεράσης ιστόνης p300 (Subramanian et al., 2002), συμμετέχοντας στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης κατά την κυτταρική διαίρεση (**Εικόνα 1.1**). Επιπλέον, μία άλλη μελέτη έδειξε ότι η μεταγραφή του γονιδίου της προΤα βρίσκεται υπό τον έλεγχο του ογκογονιδίου *c-myc* (Eilers et al., 1991).



Εικόνα 1.1. Η προΤα αλληλεπιδρά με την ιστόνη H1 συμβάλλοντας στη μεταγραφή γονιδίων. (Α) Απουσία προΤα, η ιστόνη H1 προσδένεται στα νουκλεοσώματα, συμμετέχοντας στη συμπίκνωση της ευχρωματίνης σε ετεροχρωματίνη. (Β) Παρουσία προΤα, το πολυπεπτίδιο αλληλεπιδρά με την ιστόνη H1, βοηθώντας στη μεταφορά της H1 από και προς τη χρωματίνη. (Γ) Κατά τη μεταγραφή, αποκαλύπτεται η αλληλουχία CRE (TGACGTCA) στο γενετικό υλικό, με αποτέλεσμα την πρόσδεση του ομοδιμερούς CREB. Το CREB φωσφορυλιώνεται (Φ) από κινάσες και το σύμπλεγμα CBP-p300 στρατολογείται από την προΤα. Το σύμπλοκο CREB-CBP-p300 σταθεροποιείται, οδηγώντας σε ακετυλίωση (ΑΚ) ιστονών από την p300, αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και τελικά στη μεταγραφή γονιδίων (ανατύπωση από Καππά και συν., 2013).

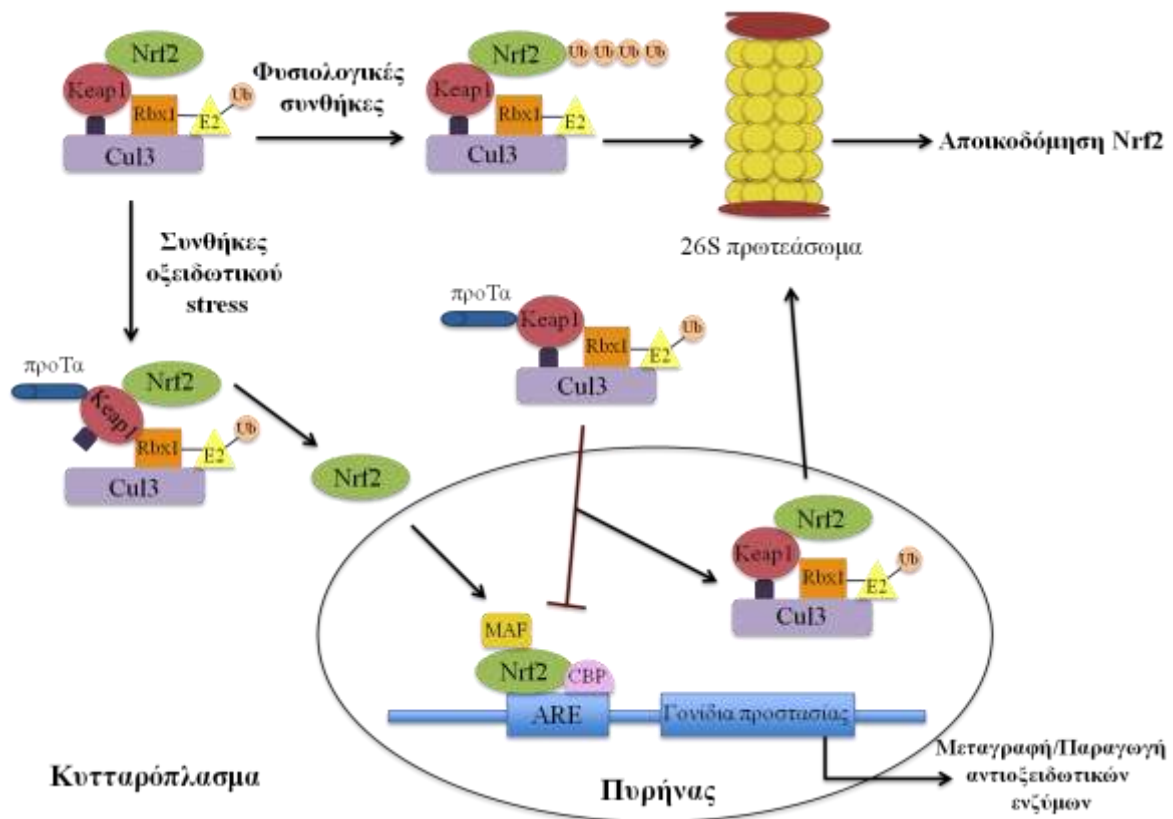
Στο κυτταρόπλασμα, η παρουσία της προΤα αποτρέπει την απόπτωση, αναστέλλοντας το σχηματισμό του αποπτωσώματος (Jiang et al., 2003). Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, προκαλώντας την ενεργοποίηση των κασπασών. Το κυτόχρωμα c δεσμεύεται στον ενεργοποιητικό παράγοντα των πρωτεασών της απόπτωσης 1 (Araf-1), επάγοντας μία διαμορφωτική αλλαγή που οδηγεί στο σχηματισμό ενός επταμερούς συμπλόκου Araf-1-κυτοχρώματος c, που ονομάζεται αποπτώσωμα. Το αποπτώσωμα στρατολογεί και ενεργοποιεί την προκασπάση 9, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κασπασών. Οι κασπάσες αυτές διασπών μία ποικιλία πρωτεϊνικών στόχων και, τελικά, οδηγούν στο θάνατο του κυττάρου. Παρουσία προΤα, η πρόσδεση του κυτοχρώματος c στον Araf-1 παρεμποδίζεται, με αποτέλεσμα την αδυναμία σχηματισμού του αποπτωσώματος (Qi et al., 2010) (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Η προΤα αναστέλλει την απόπτωση του κυττάρου. Το αποπτωτικό σήμα προκαλεί την έξοδο του κυτοχρώματος c από το μεσομεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου στο κυτταρόπλασμα. Η σύνδεση του κυτοχρώματος c με τον Araf-1 οδηγεί στην ενεργοποίησή του και στο σχηματισμό του αποπτωσώματος. Η επακόλουθη ενεργοποίηση της προκασπάσης 9 ενεργοποιεί την προκασπάση 3 προς κασπάση 3, η οποία ελάγει την κυτταρική απόπτωση. Παρουσία προΤα, παρεμποδίζεται η πρόσδεση του κυτοχρώματος c στον Araf-1 και συνεπώς αναστέλλεται το αποπτωτικό μονοπάτι (ανατύπωση από Καππά και συν., 2013).

Παράλληλες μελέτες αποκάλυψαν ότι η προΤα διαδραματίζει ιδιαίτερο ρόλο κατά το οξειδωτικό stress, ρυθμίζοντας τους προστατευτικούς μηχανισμούς του συστήματος Nrf2-Kear1 και συμβάλλοντας, έτσι, στην επιβίωση των κυττάρων (Εικόνα 1.3). Σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία, ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 φαίνεται να παραμένει στο

κυτταρόπλασμα μέσω σύνδεσής του με την πρωτεΐνη αναστολέα Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Σε συνθήκες οξειδωτικού stress, η προΤα απελευθερώνει τον Nrf2 από το ανασταλτικό σύμπλοκο Nrf2-Keap1 *in vitro*, μέσω ανταγωνισμού με τον Nrf2 για τη σύνδεση στον ίδιο τομέα της Keap1, και ο Nrf2 με τη σειρά του επάγει την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων. Επίσης, *in vivo*, το επίπεδο της Nrf2-εξαρτώμενης μεταγραφής συσχετίστηκε με τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της προΤα (Karapetian et al., 2005). Μία επόμενη μελέτη αποκάλυψε, επιπλέον, ότι η προΤα συμβάλλει στην πυρηνική εισαγωγή του συμπλόκου Keap1-Cul3-Rbx1, με αποτέλεσμα την ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση του Nrf2 στο εσωτερικό του πυρήνα, λειτουργώντας ως «διακόπτης» της επαγωγής κυτταροπροστατευτικών μηχανισμών (Niture and Jaiswal, 2009).



Εικόνα 1.3. Η προΤα προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό stress. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το σύμπλοκο Nrf2-Keap1-Cul3-Rbx1 ουβικιτινιλιώνεται (Ub) στο κυτταρόπλασμα και οδηγείται στο πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση. Υπό συνθήκες οξειδωτικού stress, η προΤα προσδένεται στο σύμπλοκο μέσω της Keap1, οδηγώντας στην απελευθέρωση του Nrf2, τη μετανάστευσή του στον πυρήνα και την ενεργοποίηση του μηχανισμού μεταγραφής γονιδίων και παραγωγής αντιοξειδωτικών ενζύμων. Απενεργοποίηση του μηχανισμού προκαλείται από το σύμπλοκο προΤα-Keap1-Cul3-Rbx1, το οποίο προσδένει τον Nrf2 και τον οδηγεί στο πρωτεάσωμα όπου αποικοδομείται (ανατύπωση από Καππά και συν., 2013).

1.2.4. Ο εξωκυτταρικός ρόλος της προθυμοσίνης α

Η προΤα διεγείρει τις ανοσολογικές αποκρίσεις, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η εξωκυτταρική ανοσορυθμιστική της δράση φάνηκε για πρώτη φορά σε *in vivo* πειράματα, όταν χορηγήθηκε σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια προστατεύοντάς τα από ευκαιριακές λοιμώξεις, ενώ παράλληλα διέγειρε την έκκριση του παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης μακροφάγων (MIF) (Pan et al., 1986). Όταν προστέθηκε σε *in vitro* καλλιέργειες λεμφοκυττάρων, αύξησε τόσο την παραγωγή ιντερλευκίνης 2 (IL-2) από τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα, όσο και την έκφραση των υποδοχέων της σε αυτά (Baxevanis et al., 1990). Επιπλέον, η προΤα αυξάνει την έκφραση των αντιγόνων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II σε ανθρώπινα μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα, αλλά και σε καρκινικά κύτταρα, τα οποία αρχικά δεν εξέφραζαν MHC μόρια τάξης II (Baxevanis et al., 1992). Παράλληλα, διεγείρει την κυτταροτοξικότητα των φυσικών φονικών (NK) κυττάρων (Cordero et al., 1992), ενώ συνεργιστικά με την IL-2, ενισχύει τη δράση και των ενεργοποιημένων από λεμφοκίνες φονικών (LAK) κυττάρων (López-Rodríguez et al., 1994).

Όταν προστεθεί σε καλλιέργειες ανθρώπινων μονοκυττάρων περιφερικού αίματος που έχουν διαφοροποιηθεί προς ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, αυξάνει την επιφανειακή έκφραση χαρακτηριστικών μορίων-δεικτών στην επιφάνειά τους (HLA-DR, CD11b, CD80, CD83, CD40 και CD86) (Skopeliti et al., 2009), ενώ τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα που τελικά προκύπτουν, είναι και λειτουργικά ανοσοϊκανά και μπορούν να ενεργοποιούν *in vitro* αντιγονοειδικά T κύτταρα (Ιοαννου et al., 2013). Τέλος, η προΤα ενισχύει *in vitro* τη χημειοταξία, την κυτταροτοξικότητα και την οξειδωτική απάντηση των ουδετερόφιλων από ασθενείς με μελάνωμα, καρκίνο του παχέος εντέρου και του μαστού (Heidecke et al., 1997).

Οι σημαντικές αυτές ανοσολογικές δράσεις της προΤα οδήγησαν τους ερευνητές στην προσπάθεια αποσαφήνισης του μηχανισμού δράσης της. Για το σκοπό αυτό, καλλιεργήθηκαν ανθρώπινοι λεμφοβλάστες με ραδιενεργά σημασμένα προΤα και βρέθηκαν δύο θέσεις δέσμευσης του μορίου στην κυτταρική επιφάνεια, ειδικές για την προΤα και όχι για την Τα1, μία υψηλής και μία χαμηλής συγγένειας (Cordero et al., 1996). Σε επόμενη μελέτη στον ίδιο τύπο κυττάρων, οι θέσεις πρόσδεσης της προΤα έγιναν τρεις, υψηλής, μέσης και χαμηλής συγγένειας (Pineiro et al., 2001), ενώ με μικροσκοπία φθορισμού εντοπίστηκε δομή τύπου «καπέλου» στον έναν πόλο των λεμφοβλαστών, στην οποία δεσμευόταν η προΤα. Αργότερα, η μελέτη αυτή προχώρησε βαθύτερα και αποκάλυψε ότι η δέσμευση της προΤα στον υποδοχέα της εκκινεί έναν καταρράκτη σηματοδότησης μέσω φωσφορυλιώσεων, που περιορίζεται στις λιπιδικές σχεδίες (Salgado et al., 2005). Μόλις πριν από τρία χρόνια, μελέτη

σε μακροφάγα ποντικού έδειξε ότι η προΤα σηματοδοτεί μέσω υποδοχέων τύπου Toll (TLRs), και συγκεκριμένα του TLR-4, ενεργοποιώντας τόσο το εξαρτώμενο από τον TRIF σηματοδοτικό μονοπάτι για την παραγωγή ιντερφερόνης-β (IFN-β), όσο και το εξαρτώμενο από το MyD88 μονοπάτι για την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (Mosoian et al., 2010).

1.2.5. Η προθυμοσίνη α ως βιοδείκτης διάγνωσης και πρόγνωσης του καρκίνου

Η συμμετοχή της προΤα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Manrow et al., 1991) και τα υψηλά επίπεδά της σε φυσιολογικούς ιστούς νέων ατόμων (πχ. στο νεανικό θύμο) (Tsitsiloni et al., 1993), οδήγησαν στη μελέτη της έκφρασής της, σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, και σε κακοήθεις ιστούς. Έτσι, πολλές έρευνες στράφηκαν στη διερεύνηση των επιπέδων της προΤα σε διάφορους τύπους καρκίνου και την πιθανή προγνωστική τους σημασία (**Πίνακας 1.1**).

Συγκεκριμένα, τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου της προΤα έχουν συσχετιστεί με αυτά του *c-myc* στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Mori et al., 1993) και του ήπατος (Wu et al., 1997), καθώς και με αυτά του *N-myc* στο νευροβλάστωμα (Sasaki et al., 2001a), ενώ αντίθετα στον καρκίνο του πνεύμονα, αν και ανιχνεύθηκαν υψηλά επίπεδα mRNA της προΤα, τα επίπεδα του *c-myc* δεν εμφάνισαν αντίστοιχη αύξηση (Sasaki et al., 2001b). Αυξημένα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου της προΤα έχουν εντοπιστεί και σε βιοψίες ραβδομυοσάρκωμάτων και, πιθανόν, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικός δείκτης της νόσου (Carey et al., 2006). Επίσης, υψηλά επίπεδα mRNA της προΤα έχουν καταγραφεί σε υψηλά διαφοροποιημένα θυρεοειδικά καρκινώματα, σε αντίθεση με θυρεοειδικά αδενώματα και βρογχοκήλες (Letsas et al., 2007), καθώς και σε καρκινικά κύτταρα ορθού, όπου συσχετίστηκαν με την ανθεκτικότητά τους στην ακτινοθεραπεία (Ojima et al., 2007).

Πίνακας 1.1: Η προΤα ως βιοδείκτης πρόγνωσης του καρκίνου στον άνθρωπο.

Τύπος καρκίνου	Μετρήσεις επιπέδων σε	Συσχέτιση με	Βιβλιογρ. παραπομπή
Ανώτερου ουροποιητικού συστήματος	πρωτεΐνη σε ιστούς	Υποτροπή	Jou et al., 2009
Ήπατος	mRNA/πρωτεΐνη σε ιστούς	Έκφραση του <i>c-myc</i> , κακή πρόγνωση	Wu et al., 1997b Fraga et al., 1993
Θυρεοειδούς	mRNA σε ιστούς/πρωτεΐνη σε ιστούς και ορό	Διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων	Letsas et al., 2007 Kashat et al., 2010
Κεφαλής και τραχήλου	Πρωτεΐνη σε ιστούς	Υποτροπή	Tripathi et al., 2011
Μαστού	Πρωτεΐνη σε ιστούς και ορό	Βαθμός κακοήθειας, υποτροπή, μετάσταση, μειωμένη επιβίωση	Tsitsiloni et al., 1993 Dominguez et al., 1993 Tsitsilonis et al., 1998 Magdalena et al., 2000 Costopoulou et al., 1998
Νευροβλάστωμα	mRNA σε ιστούς	Έκφραση του <i>N-myc</i>	Sasaki et al., 2001a
Ορθού	mRNA σε ιστούς	Αποτελεσματικότητα ακτινοθεραπείας	Ojima et al., 2007
Ουροδόχου κύστης	Πρωτεΐνη σε ιστούς και ούρα	Ανίχνευση και βαθμός κακοήθειας, παρακολούθηση νόσου	Tsai et al., 2009 Yamasaki et al., 2012 Tzai et al., 2006
Παχέος εντέρου	mRNA σε ιστούς	Έκφραση του <i>c-myc</i>	Mori et al., 1993 Tsitsiloni et al., 1993
Πνεύμονα	mRNA σε ιστούς	Κακή πρόγνωση	Sasaki et al., 2001b
Προστάτη	Πρωτεΐνη σε ιστούς	Διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων, εξέλιξη του όγκου	Suzuki et al., 2006
Ραβδομυοσάρκωμα	mRNA σε ιστούς	-	Carey et al., 2006
Στομάχου	Πρωτεΐνη σε ιστούς	-	Leys et al., 2007
Υπόφυσης	Πρωτεΐνη σε ιστούς	Υποτροπή	Pawlikowski et al., 2009
Στόματος	Πρωτεΐνη σε ιστούς	-	Kaur et al., 2014

Ως προς τη μέτρηση των επιπέδων του πολυπεπτιδίου σε καρκινικούς ιστούς, η ομάδα μας, για πρώτη φορά, έδειξε ότι ιστοί από καρκίνο του μαστού και του εντέρου περιέχουν αυξημένα προΤα σε σύγκριση με τους γειτονικούς υγιείς ιστούς (Tsitsiloni et al., 1993), προτείνοντας ότι τα επίπεδά της αντανακλούν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κακοήθων κυττάρων. Μία αντίστοιχη μελέτη που έγινε την ίδια χρονιά, έδειξε ότι η συγκέντρωση της προΤα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση ασθενών με καρκίνο του μαστού, οι οποίοι διατρέχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης απομακρυσμένων μεταστάσεων (Dominguez et al., 1993). Όπως αποδείχθηκε στη συνέχεια, τα επίπεδα της προΤα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού εξαρτώνται από το βαθμό κακοήθειας (grade) του όγκου και συσχετίζονται τόσο με την πιθανότητα μετάστασης, όσο και τη γενικότερη έκβαση της ασθένειας (Tsitsilonis et al., 1998). Συγκεκριμένα, ασθενείς με χαμηλά ή μέτρια επίπεδα προΤα στον πρωτοπαθή όγκο παρουσίασαν στατιστικά χαμηλότερη συχνότητα υποτροπής και θνησιμότητα, σε σχέση με ασθενείς στους όγκους των οποίων ανιχνεύθηκε υψηλή συγκέντρωση προΤα (Magdalena et al., 2000). Μελετώντας τα επίπεδα της προΤα κατά την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη, διαπιστώθηκε σταδιακή αύξηση των επιπέδων του πολυπεπτιδίου κατά τη μετάπτωση του φυσιολογικού επιθηλίου σε ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και, τελικά, σε αδενοκαρκίνωμα (Suzuki et al., 2006).

Αντίστοιχες διακυμάνσεις των επιπέδων της προΤα παρατηρήθηκαν και σε καρκίνο της ουροδόχου κύστης, όπου διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα του μορίου σε καρκινικούς συγκριτικά με υγιείς ιστούς, με τους όγκους των πιο προχωρημένων σταδίων να παρουσιάζουν ακόμα υψηλότερα επίπεδα προΤα (Tsai et al., 2009). Υπερέκφραση της προΤα έχει παρατηρηθεί και σε καρκίνο του ανώτερου ουροποιητικού συστήματος, με σημαντικές ενδείξεις ότι ο εντοπισμός του μορίου στο κυτταρόπλασμα συνδέεται με πιθανότητα υποτροπής (Jou et al., 2009). Τέλος, υψηλά επίπεδα προΤα έχουν συσχετιστεί με επιθετικότερους όγκους και φτωχότερη πρόγνωση σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα (Fraga et al., 1993), υποφυσιακούς όγκους (Pawlikowski et al., 2009) και καρκίνο της κεφαλής και του τραχήλου (Tripathi et al., 2011), αλλά όχι σε καρκίνους του στομάχου (Leys et al., 2007). Τέλος, μία πλέον πρόσφατη έρευνα μελέτησε ανοσοϊστοχημικά την έκφραση πέντε διαφορετικών δεικτών, μεταξύ των οποίων ήταν και η προΤα, σε ασθενείς με υψηλού κινδύνου στοματικές δυσπλασίες. Δεν παρατηρήθηκε, όμως, σημαντική διαφορά στην έκφραση της κυτταροπλασματικής ή της πυρηνικής προΤα στις δυσπλασίες που μεταπίπτουν σε καρκίνο, σε σύγκριση με εκείνες που παραμένουν καλοήθειες (Kaur et al., 2014).

Εφόσον φυσιολογικά η προΤα είναι ενδοκυτταρικό πολυπεπτίδιο, οι αρχικές μελέτες για τη συσχέτισή της με τον καρκίνο είχαν εστιαστεί, κυρίως, στους κακοήθεις όγκους ή/και στα

κυτταρικά τους εκχυλίσματα. Οι αναλύσεις αυτές προσφέρουν το βασικό πλεονέκτημα της ανίχνευσης των επιπέδων του περιεχόμενου mRNA ή της πρωτεΐνης άμεσα στα κύτταρα του όγκου, αλλά συνήθως η μη επαρκής ποσότητα ιστού αποτελεί βασικό μειονέκτημά τους. Ένας καρκινικός βιοδείκτης, κατά κανόνα, ποσοτικοποιείται στα βιολογικά υγρά των ασθενών. Έτσι και η προΤα, σύντομα μετά το χαρακτηρισμό της, ανιχνεύθηκε στο ανθρώπινο αίμα και η παρουσία της αυτή αποδόθηκε είτε σε «διαρροή» της από νεκρά λευκοκύτταρα, είτε σε απελευθέρωσή της από πλούσια σε προΤα κύτταρα, μέσω ενός αγνώστου μέχρι σήμερα μηχανισμού (Panneerselvan et al., 1987). Προς το παρόν, η ανίχνευση προΤα στον ορό ασθενών με καρκίνο έχει αναφερθεί σε δύο μελέτες: (α) σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (Costopoulou et al., 1998) και (β) σε ανάλυση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από καρκίνο του θυρεοειδούς (Kashat et al., 2010), χωρίς ωστόσο να βρεθεί συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της προΤα στο αίμα και του grade του όγκου ή της πρόγνωσης της νόσου.

Αντίθετα, μία ενδιαφέρουσα μελέτη αποκάλυψε ότι τα επίπεδα της προΤα στα ούρα μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμο βιοδείκτη για την ανίχνευση και παρακολούθηση της εξέλιξης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης (Tzai et al., 2006). Αναλυτικά, από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι: (α) η προΤα στα ούρα ήταν υψηλότερη στους ασθενείς που διαγνώστηκαν σχετικά πρόσφατα με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, (β) οι ασθενείς με υψηλής διαφοροποίησης όγκους εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα προΤα στα ούρα σε σχέση με τους ασθενείς με χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνο της ουροδόχου κύστης και (γ) κατά τη διάρκεια της τρίμηνης παρακολούθησης, τα επίπεδα της προΤα στα ούρα αυξάνονταν σε περιπτώσεις παρουσίας υπολειμματικής νόσου ή υποτροπής μετά τη θεραπεία.

1.2.6. Η προθυμοσίνη α στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου

Η σημαντική εξωκυτταρική ιδιότητα της προΤα να δρα ως ρυθμιστής των ανοσολογικών απαντήσεων έστρεψε γρήγορα το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας στη διερεύνηση της πιθανής αντικαρκινικής δράσης του μορίου (Πίνακας 1.2). Τα πρώτα *in vivo* πειράματα σε ζώα ξεκίνησαν στις αρχές της δεκαετίας του 1990 από την ομάδα του Μπαζεβάνη και συνεργατών. Συγκεκριμένα, η χορήγηση προΤα σε DBA/2 ποντίκια που είχαν ενοφθαλμιστεί με συγγενικά λευχαιμικά κύτταρα L1210, παρεμπόδισε την εξέλιξη της δημιουργίας ασκίτη, επιμηκύνοντας από 8-12 σε 70 ημέρες την επιβίωση του 40-60% των πειραματοζώων. Τα περιτοναϊκά μακροφάγα των ποντικών που έλαβαν θεραπευτικά προΤα, παρήγαγαν 6-7 φορές υψηλότερα επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α, TNF-α), ενώ εμφάνισαν έντονη κυτταροτοξική δράση έναντι πολλών καρκινικών σειρών (Papanastasiou et al., 1992). Περαιτέρω πειράματα στο ίδιο μοντέλο αποκάλυψαν την *in vivo* ικανότητα της

προΤα να ενισχύει τη δράση των NK κυττάρων και να ενεργοποιεί τα LAK κύτταρα. Αναλυτικότερα, ποντίκια στα οποία είχε χορηγηθεί προΤα, παρήγαγαν υψηλότερες συγκεντρώσεις TNF- α και IL-2 και παρουσίασαν αυξημένα ποσοστά ενεργοποιημένων και ισχυρά κυτταροτοξικών NK και T κυττάρων (Baxevanis et al., 1994). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η σύγχρονη χορήγηση προΤα και λευχαιμικών κυττάρων στα ποντίκια οδήγησε στην παραγωγή και ογκοειδικών κυτταροτοξικών T κυττάρων (CTLs), τα οποία στόχευαν και έλυαν ειδικά τα λευχαιμικά κύτταρα. Τα ζώα αυτά, δηλαδή, ανέπτυξαν τόσο μη περιορισμένη από τα MHC μόρια (NK και LAK) όσο και περιορισμένη από τα MHC μόρια (CTLs) κυτταροτοξικότητα, με αποτέλεσμα να επιβιώνουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Baxevanis et al., 1995).

Στη συνέχεια, η μελέτη της δράσης της προΤα εστιάστηκε κυρίως στον άνθρωπο. Δεδομένου ότι τα λεμφοκύτταρα των καρκινοπαθών παρουσιάζουν μειωμένη κυτταροτοξική δράση και χαμηλή παραγωγή κυτταροκινών, αρχικά ελέγχθηκε *in vitro* η ικανότητα της προΤα να επαναφέρει τις ανεπαρκείς αυτές αποκρίσεις στα φυσιολογικά επίπεδα. Όντως, η προΤα ενίσχυσε την κυτταροτοξική αντίδραση (CML) και τη δραστηριότητα των NK κυττάρων, τα οποία λόγω της νόσου, είναι ιδιαίτερα χαμηλά σε ασθενείς με προχωρημένες κακοήθειες. Το αποτέλεσμα αυτό συσχετίστηκε με τη μείωση της παραγωγής της ανοσοκατασταλτικής προσταγλαδίνης E2 (PGE2) και την παράλληλη αύξηση της παραγωγής της ανοσοενισχυτικής κυτταροκίνης IL-2 από τα λεμφοκύτταρα των καρκινοπαθών, παρουσία προΤα. Επομένως, το πολυπεπίδιο είναι ικανό να αποκαθιστά, μερικώς ή και πλήρως, τις προκαλούμενες από τον καρκίνο ανοσοανεπάρκειες (Baxevanis et al., 1993).

Ειδικότερα, η προΤα, *in vitro*, απεκατέστησε μερικώς τη λειτουργικότητα μονοκυττάρων από ασθενείς με μελάνωμα (Garbin et al., 1994), τη LAK κυτταροτοξικότητα, καθώς και την έκκριση IL-2 από τα λεμφοκύτταρα, με την αποκατάσταση αυτή να εξαρτάται από το στάδιο της νόσου, αφού κύτταρα ασθενών με μελάνωμα σε πρώιμα στάδια ανταποκρίθηκαν καλύτερα στη «θεραπεία» με προΤα (Eckert et al., 1995). Αντίστοιχα, σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, η προΤα ενίσχυσε την κυτταροτοξικότητα των NK και LAK κυττάρων μόνο στα αρχικά στάδια της νόσου (Eckert et al., 1997a; Eckert et al., 1997b), αύξησε την παραγωγή και έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1 β και TNF- α) (Eckert et al., 1997b; Garbin et al., 1997), ενώ μείωσε τις συγκεντρώσεις του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού- β (TGF- β) και της PGE2 από τα μονοκύτταρα. Συνολικά, οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι το πολυπεπίδιο μπορεί να αναστρέφει αποτελεσματικά την ήπιου βαθμού ανοσοκαταστολή που επάγεται από τους καρκινικούς όγκους. Η αυξημένη κυτταροτοξικότητα από τα CTLs, NK και LAK κύτταρα παρουσία προΤα φάνηκε να

οφείλεται στην υψηλή παραγωγή κυτταροκινών (IL-1β, IL-2, TNF-α), στην αυξημένη έκφραση επιφανειακών μορίων προσκόλλησης, αλλά και στην αύξηση των επιπέδων περφορίνης (Garbin et al., 1997; Baxevanis et al., 1999).

Πίνακας 1.2. Η προθυμοσίνη α στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου.

Τύπος Καρκίνου <i>In vitro</i> (ανθρώπινα κύτταρα)	Συνέργια με	Επίδραση	Βιβλιογρ. παραπομπή
Διάφοροι όγκοι	-	Αποκατάσταση CML και NK δραστηριότητας, αύξηση παραγωγής IL-2, ελάττωση παραγωγής PGE2	Baxevanis et al., 1993
	IL-2	Αύξηση πολλαπλασιασμού CD4+ T λεμφοκυττάρων, ανάπτυξη ογκοειδικών CTLs	Voutsas et al., 2000
Μαστού	Αντι-CD3	Βελτίωση NK και T κυτταροτοξικότητας	Baxevanis et al., 1999
	±fMLP	Αύξηση χημειοταξίας, οξειδωτικών αποκρίσεων και κυτταροτοξικότητας PMNs	Heidecke et al., 1997
Μελάνωμα	±IFN-γ	Ενίσχυση κυτταροτοξικότητας	Garbin et al., 1994,
	IL-2	Αποκατάσταση LAK δραστηριότητας	Eckert et al., 1995
	±fMLP	Αύξηση χημειοταξίας, οξειδωτικών αποκρίσεων και κυτταροτοξικότητας PMNs	Heidecke et al., 1997
Παχέος εντέρου	±IFN-γ	Ελάττωση παραγωγής TGF-β και PGE2, αύξηση παραγωγής IL-1β και TNF-α από μονοκύτταρα, αύξηση της επαγόμενης από μονοκύτταρα κυτταροτοξικότητας	Eckert et al., 1997a Garbin et al., 1997
	IL-2	Ενίσχυση LAK δραστηριότητας, αύξηση έκφρασης επιφανειακών μορίων ενεργοποίησης σε NK, NK-T και T λεμφοκύτταρα	Eckert et al., 1997b Heidecke et al., 1997
Πνεύμονα	Αντι-CD3	Βελτίωση κυτταροτοξικότητας	Baxevanis et al., 1999
Ωοθηκών	Αντι-CD3	Βελτίωση κυτταροτοξικότητας	Baxevanis et al., 1999
<i>In vivo</i> (ποντίκια)			
Λευχαιμία	-	Επιμήκυνση επιβίωσης, ενίσχυση NK και επαγωγή LAK δραστηριότητας σε λεμφοκύτταρα, αύξηση παραγωγής TNF-α, επαγωγή ογκολυτικής δραστηριότητας από περιτοναϊκά κύτταρα, έκπτυξη ογκοειδικών T λεμφοκυττάρων	Papanastasiou et al., 1992 Baxevanis et al., 1994 Baxevanis et al., 1995

Ο μηχανισμός δράσης της προΤα αποκαλύφθηκε, εν μέρει, όταν λεμφοκύτταρα καρκινοπαθών καλλιιεργήθηκαν *in vitro* με αυτόλογα κύτταρα όγκου. Η συνεργιστική παρουσία προΤα και IL-2 αύξησε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των CD4+ T κυττάρων και την παραγωγή έντονα κυτταροτοξικών ογκοειδικών CTLs. Το ιδιαίτερα σημαντικό αποτέλεσμα αυτής της μελέτης ήταν ότι η ανάπτυξη αυτών των CTLs απαιτούσε την ταυτόχρονη παρουσία στην ίδια καλλιέργεια και CD4+ T κυττάρων και μονοκυττάρων, καθώς η απουσία ενός από τους δύο υποπληθυσμούς ή η απουσία αντιγόνου οδηγούσε σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικής δράσης των T κυττάρων. Συνεπώς, για να εκδηλωθεί η ευεργετική δράση της προΤα, απαιτείται η παρουσία τόσο των βοηθητικών T κυττάρων, όσο και των αντιγονοπαρουσιαστικών μονοκυττάρων (Voutsas et al., 2000).

Εκμεταλλεζόμενη τα παραπάνω ευρήματα, η ομάδα μας, διερεύνησε σε βάθος τις ενδοκυτταρικές αλλαγές που επάγονται σε μονοπύρρηνα περιφερικού αίματος, μετά από τριήμερη διέγερσή τους με προΤα. Μελετώντας, με πρωτεομική ανάλυση, τις πρωτεΐνες από μονοπύρρηνα φυσιολογικών δοτών και ασθενών με καρκίνο, σκιαγραφήθηκε για πρώτη φορά ένα ολοκληρωμένο μοντέλο δράσης της προΤα. Αναλυτικά, η προΤα διεγείρει τα μονοκύτταρα μέσω πρόσδεσης στους TLRs και έτσι τα μονοκύτταρα υπερεκφράζουν MHC μόρια τάξης II στην επιφάνειά τους, ενισχύοντας την αντιγονοπαρουσίαση, τη σύναυσή τους με τα T λεμφοκύτταρα και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1). Τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα με τη σειρά τους, παράγουν IL-2 και πολλαπλασιάζονται έντονα, εκφράζοντας υψηλά επίπεδα μορίων προσκόλλησης (CD2) και ενδοκυτταρικών κυτταρολυτικών μορίων (περφορίνη), με αποτέλεσμα τη γενικότερη ενίσχυση της κυτταροτοξικής τους δράσης (Skopeliti et al., 2007). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν τρία χρόνια αργότερα, από μελέτη που έδειξε ότι πραγματικά η προΤα σηματοδοτεί μέσω του TLR-4 σε κύτταρα της φυσικής ανοσίας (Mosoian et al., 2010). Όλες οι παραπάνω μελέτες υποδεικνύουν ότι το πολυπεπτιδίο δρα πλειοτροπικά, βελτιώνοντας τις λειτουργίες των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, υπό συνθήκες ανοσοκαταστολής.

Παρά το πλήθος των μελετών γύρω από τους μηχανισμούς δράσης της προΤα ως ανοσοθεραπευτικό μόριο, το πολυπεπτιδίο δεν έχει ακόμα χρησιμοποιηθεί σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας ασθενών με καρκίνο. Η βασική αιτία της απουσίας ένταξης της προΤα σε κλινικά πρωτόκολλα οφείλεται, κυρίως, στο γεγονός ότι ο μοριακός μηχανισμός της εξωκυτταρικής της δράσης δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, αλλά και στο ότι η σύνθεση ή η απομόνωση του πολυπεπτιδίου είναι διαδικασίες χρονοβόρες (Wilson et al., 2006).

1.2.7. Το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) αποτελεί την ανοσοδραστική περιοχή της προθυμοσίνης α

Η ομάδα μας έχει δείξει ότι το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109), με αμινοξική αλληλουχία ΤΚΚQKTDEDD, είναι υπεύθυνο για την ανοσοτροποποιητική δράση ολόκληρου του μορίου της προΤα (Skopeliti et al., 2006; Skopeliti et al., 2009). Το προΤα(100-109) επάγει τον πολλαπλασιασμό και την κυτταροτοξική δράση των λεμφοκυττάρων, ενώ, παράλληλα, επάγει την ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων προερχόμενων από μονοκύτταρα περιφερικού αίματος ανθρώπου. Όσον αφορά τη δομή του, φάνηκε ότι αποκτά διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου, χωρίς ωστόσο να σχηματίζει αμυλοειδή ινίδια, όπως έχει αναφερθεί για την προΤα (Pavlov et al., 2002). Η δραστηριότητα του δεκαπεπτιδίου είναι ειδική για την αλληλουχία του και συγκρίσιμη με αυτήν του ακέραιου πολυπεπτιδίου (Ioannou et al., 2012).

Επιπλέον, είναι γνωστή η παραγωγή του και *in vivo*, μέσω της θραυσματοποίησης της προΤα από τις ενεργοποιημένες κασπάσες κατά την απόπτωση (Enkemann et al., 2000b; Evstafieva et al., 2000). Αναλυτικά, νωρίς μετά την έναρξη της απόπτωσης, η προΤα υπόκειται σε θραύση στην κύρια καρβοξυτελική θέση (DDVD⁹⁹) και σε μερικές δευτερεύουσες. Παρόλο που *in vitro* βρέθηκε να διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο οι κασπάσες 3 και 7, μετέπειτα *in vivo* πειράματα υπέδειξαν την εμπλοκή μόνο της κασπάσης 3 στην πέψη της προΤα. Μάλιστα, καταγράφηκαν πέρα από την καρβοξυτελική θέση θραύσης και δύο αμινοτελικές θέσεις (AAVD⁶ και NGRD³¹). Ωστόσο, το προΤα(1-99) είναι το μόνο μεγάλο θραύσμα της πρωτεΐνης που απομονώθηκε τελικά από τα αποπτωτικά κύτταρα, ίσως, γιατί είναι το μόνο σταθερό προϊόν. Το γεγονός ότι μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της προΤα προσδένονται στην επιφάνεια αποπτωτικών, αλλά όχι φυσιολογικών κυττάρων, υποδεικνύει ότι κάποιο θραύσμα της εκτίθεται στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου κατά την απόπτωση, μέσω ενός άγνωστου προς το παρόν μηχανισμού (Evstafieva et al., 2003).

Η πιο πρόσφατη μελέτη γύρω από τη συγκριτική δράση της προΤα και του δεκαπεπτιδίου της προΤα(100-109) έγινε σε λεμφοκύτταρα που προήλθαν από ασκτικό υγρό ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών (tumor associated lymphocytes, TALs). Τα TALs, αν και εμφανίζουν μειωμένη δραστηριότητα εξαιτίας της ενδογενούς ανοσοκαταστολής που υφίστανται στο περιβάλλον του ασκίτη, όταν καλλιεργήθηκαν *in vitro* με προΤα ή προΤα(100-109) παρουσίασαν βελτιωμένη κυτταροτοξική δράση έναντι και των αυτόλογων καρκινικών κυττάρων. Αντίστοιχα, όταν τα ενεργοποιημένα με προΤα ή προΤα(100-109) TALs χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά σε SCID ποντίκια, τα οποία είχαν ενοφθαλμιστεί με καρκινικά κύτταρα από την ίδια ασθενή, μειώθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης των όγκων και επιμηκύνθηκε η επιβίωση των ποντικών (Voutsas et al., 2013).

1.2.8. Άλλες, πρόσφατα αναφερθείσες, δράσεις της προθυμοσίνης α

Την τελευταία διετία, ένα πλήθος μελετών που διεξήχθησαν έρχεται να προσθέσει νέα στοιχεία στην υπάρχουσα γνώση γύρω από τη δράση της προΤα και να της προσδώσει καινούργιες ιδιότητες (**Πίνακας 1.3**). Είναι γνωστό ότι η προΤα συνδέεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Για να γίνει, ωστόσο, κατανοητός ο ρόλος της κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο σύστημα μελέτης ο ιχθύς zebrafish. Συγκεκριμένα, έγινε σίγαση, μέσω ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων, του ορθολόγου της προΤα γονιδίου του zebrafish, η οποία προκάλεσε καθυστέρηση στην ανάπτυξη και ανατομικά ελαττώματα. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν έναν εξελικτικά συντηρημένο ρόλο της προΤα από το zebrafish μέχρι τον άνθρωπο και ουσιαστικά παρέχουν την πρώτη απόδειξη ότι η προΤα είναι σημαντική και για την πρόιμη εμβρυογένεση (Emmanouilidou et al., 2013). Μία επόμενη μελέτη σε σπερματοζώαρια αρουραίου και ανθρώπου αποκάλυψε για πρώτη φορά, την ύπαρξη προΤα στο ακρόσωμα του σπερματοζωαρίου και επιβεβαίωσε τη συντηρητικότητα της κατανομής της στους αρσενικούς γαμέτες των σπονδυλωτών, παρέχοντας ενδείξεις για πιθανό ρόλο της στη φυσιολογία τους (Ferrara et al., 2013).

Η φωσφορυλίωση της προΤα δεν είχε φανεί να επηρεάζει την επίδρασή της στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Για να προσδιοριστεί κατά πόσο, όμως, επηρεάζει την πυρηνική εισαγωγή ή την αντιαποπτωτική της δραστηριότητα, κύτταρα διαμολύνθηκαν με φορείς που παρήγαγαν ανασυνδυασμένη προΤα φυσικού τύπου, η οποία είναι μερικώς φωσφορυλιωμένη μεταμεταφραστικά, ή μη φωσφορυλιωμένη, μετά από αντικατάσταση του κύριου καταλοίπου Thr⁷ από Ala⁷. Με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού και μελέτη της δραστηριότητας των κασπασών, φάνηκε ότι η φωσφορυλίωση της προΤα απαιτείται για την αντιαποπτωτική της δράση, αλλά δεν επηρεάζει τη μετακίνησή της στον πυρήνα (Moreira et al., 2013).

Στο παρελθόν έχουν παραχθεί διαγονιδιακά ποντίκια για την προΤα, τα οποία εμφάνισαν πολυκυστική νεφρική νόσο, που χαρακτηρίζεται από προοδευτική νεφρική δυσλειτουργία, καθώς και από μεταβολές που μοιάζουν με εμφύσημα στον πνεύμονα (Li et al., 2005). Ωστόσο, ο παθοφυσιολογικός ρόλος της προΤα στο πνευμονικό εμφύσημα παραμένει άγνωστος. Η προΤα ρυθμίζει την ακετυλίωση πρωτεϊνών (πχ. ιστονών και NF-κB) και ως εκ τούτου αναμένεται να έχει κρίσιμο ρόλο στην προδιάθεση των ατόμων για ανάπτυξη εμφυσήματος. Στη μελέτη των Su και συνεργατών, φάνηκε για πρώτη φορά η συσχέτιση μεταξύ της υπερέκφρασης της προΤα και της εμφάνισης εμφυσήματος τόσο σε ασθενείς, όσο και στα διαγονιδιακά ποντίκια. Μάλιστα, στους ασθενείς, η υπερέκφρασή της στον πνεύμονα συσχετίστηκε με τη βαρύτητα του εμφυσήματος (Su et al., 2013).

Δεδομένου ότι ο ρόλος της προΤα στην καρδιά δεν είχε αξιολογηθεί, οι Cannavo και συνεργάτες αποφάσισαν να διερευνήσουν τις επιδράσεις της προΤα στα καρδιομυοκύτταρα κατά τη διάρκεια ισχαιμικής βλάβης, *in vitro* και *in vivo*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι επτά ημέρες μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου σε μοντέλο ποντικών, τα επίπεδα έκφρασης της προΤα αυξήθηκαν σημαντικά τόσο στον ορό του αίματος όσο και στον καρδιακό ιστό. Μάλιστα, η προΤα μετατοπίστηκε από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και την πλασματική μεμβράνη των καρδιομυοκυττάρων. Επιπλέον, τα *in vitro* πειράματα σε καρδιομυοκύτταρα, επιβεβαίωσαν ότι μετά από 6 ώρες προσομοίωσης ισχαιμίας, τα επίπεδα της προΤα αυξάνονται σε σύγκριση με εκείνα των φυσιολογικών κυττάρων, ενώ η κατεργασία των καρδιομυοκυττάρων με ανασυνδυασμένη προΤα, κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, οδηγεί σε σημαντική μείωση της αποπτωτικής απόκρισης και σημαντική αύξηση της επιβίωσης των κυττάρων. Η καρδιοπροστατευτική δράση της προΤα έναντι της ισχαιμικής βλάβης βασίζεται σε μηχανισμό εξαρτώμενο από την κινάση Akt (Cannavo et al., 2013).

Τέλος, μελετήθηκε εκτενώς και η νευροπροστατευτική δράση της προΤα *in vitro* και *in vivo* (Ueda et al., 2010). Αρχικά, με ανοσοϊστοχημική ανάλυση φάνηκε ότι η προΤα εκφράζεται στον ενήλικο εγκέφαλο, και τα υψηλότερα επίπεδά της ανιχνεύθηκαν στις περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με τη νευρογένεση. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκε στους πυρήνες των νευρώνων, ενώ βρέθηκε τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των αστροκυττάρων και της μικρογλοίας (Halder and Ueda, 2012). Παράλληλα, αποκαλύφθηκε ότι η προΤα απελευθερώνεται *in vitro* μέσω μη κλασικού μονοπατιού, μαζί με την πρωτεΐνη S100A13 από τους νευρώνες, 3 ώρες μετά από εγκεφαλική ισχαιμία (Halder et al., 2012). Βρέθηκε, επίσης, ότι η περιοχή της προΤα, η οποία είναι υπεύθυνη για το νευροπροστατευτικό της ρόλο *in vitro* και *in vivo*, είναι ένα πεπτίδιο 30 αμινοξέων (P30, αμινοξέα 49-78), ενώ η ελάχιστη ακολουθία του P30 που διατηρεί τη νευροπροστατευτική δράση είναι το εννιαπεπτίδιο προΤα(52-60) (Halder et al., 2013a; Halder et al., 2013b).

Πίνακας 1.3. Πεπτίδια της προΤα με γνωστή εξωκυτταρική δράση.

Τμήμα αμινοξικής αλληλουχίας/Όνοματολογία	Δράση	Βιβλιογρ. παραπομπή
προΤα(1-28)/Τα1	Ανοσορυθμιστική, αντικαρκινική, αντική, αντιμυκητιασική, ενεργοποίηση δενδριτικών κυττάρων	Goldstein, 2007
προΤα(1-35)/Τα11	Αντιμυκητιασική	Ioannou et al., 2012
προΤα (49-78) προΤα(52-60)	Νευροπροστατευτική	Halder et al., 2013a, Halder et al., 2013b
προΤα(50-89)	Αντι-HIV-1	Mosoian et al., 2010
προΤα(100-109)	Ανοσορυθμιστική, αντικαρκινική, ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων, ενίσχυση φαγοκυττάρωσης, οξειδωτικής έκρηξης και κυτταροτοξικότητας ουδετερόφιλων	Skopeliti et al., 2009, Voutsas et al., 2013, Ioannou et al., 2013, Samara et al., 2013a
προΤα(1-100)/προΤα(Δ101-111)	Καρδιοπροστατευτική	Cannavo et al., 2013

1.3. Τα φαγοκύτταρα και ο ρόλος τους στην ανοσία

Οι πολυκύτταροι οργανισμοί αντιμετωπίζουν μία συνεχή πρόκληση επιβίωσης σε ένα περιβάλλον που περιέχει παθογόνα. Τα φαγοκύτταρα έχουν εξελιχθεί ως εξειδικευμένα κύτταρα που εγκολπώνουν και καταστρέφουν τα παθογόνα-εισβολείς, εξασφαλίζοντας την προστασία του ξενιστή έναντι των μικροοργανισμών. Το 1884, ο Élie Metchnikov παρατήρησε για πρώτη φορά σε μικροσκόπιο τη φαγοκυτταρική διαδικασία, αρχικά σε αμοιβαδοειδή κύτταρα θαλάσσιου σπόγγου και αργότερα και στα ανώτερα είδη, ορίζοντας την έννοια του «φαγοκυττάρου» (Dale et al., 2008). Τα φαγοκύτταρα είναι εξελικτικά συντηρημένα στοιχεία του φυσικού σκέλους της ανοσίας και μάλιστα, η επιβίωση πρωτόγονων οργανισμών, όπως τα έντομα, βασίζεται στη λειτουργία τους (Ribeiro and Brehelin, 2006). Παράλληλα, εκφράζουν υποδοχείς, οι πιο σημαντικοί από τους οποίους είναι οι TLRs, ενώ αποτελούν και σημαντικές πηγές προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών (Dale et al., 2008).

1.3.1. Γενικά για τα ουδετερόφιλα ή κοκκιοκύτταρα

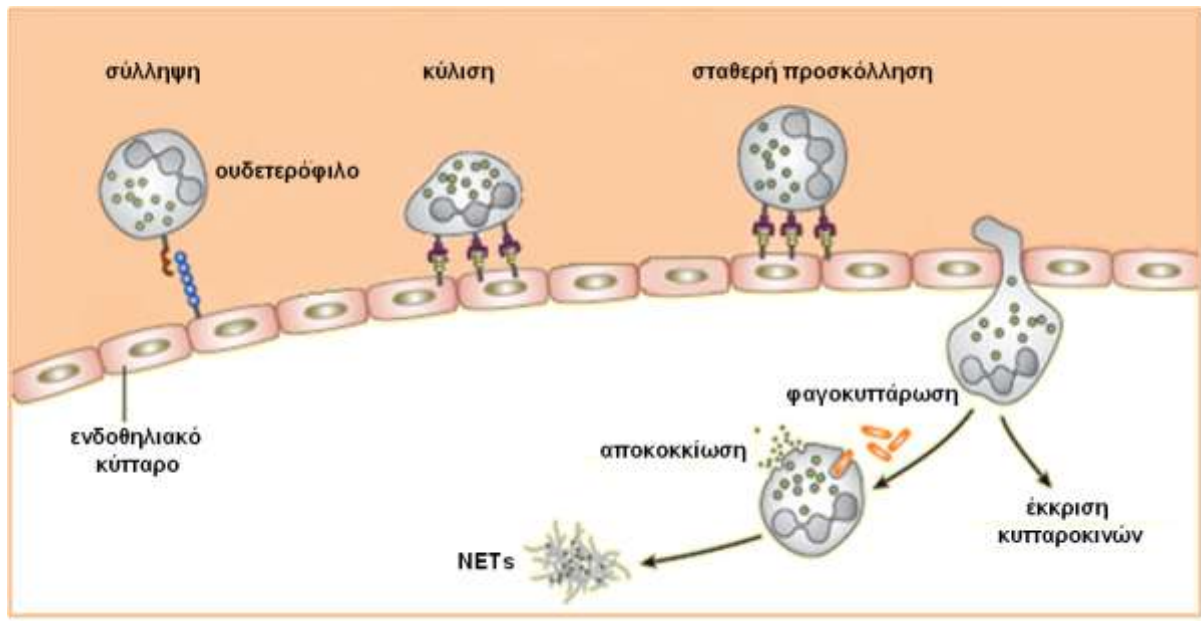
Στον άνθρωπο, τα ουδετερόφιλα αντιπροσωπεύουν το 50-70% του συνόλου των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων, αποτελώντας την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι ενός ευρέος φάσματος μολυσματικών παθογόνων. Παράγονται με ρυθμό 10^{11} κύτταρα ανά ημέρα, ο οποίος μπορεί να αυξηθεί σε 10^{12} ανά ημέρα, κατά τη διάρκεια βακτηριακής λοίμωξης (Mayadas et al., 2014). Τα ουδετερόφιλα είναι τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα και σχετικά βραχύβια. Επιβιώνουν για 8-12 ώρες στην κυκλοφορία και μέχρι 1-2 ημέρες στους ιστούς, με τη διαδικασία αυτή να καθυστερεί ή να επιταχύνεται κατά τη φλεγμονώδη απόκριση (Basu et al., 2002). Πιο σύγχρονες προσεγγίσεις με *in vivo* επισήμανση με δευτέριο υποδεικνύουν ότι υπό ομοιοστατικές συνθήκες, τα ανθρώπινα ουδετερόφιλα μπορεί να έχουν διάρκεια ζωής στην κυκλοφορία έως και 5 ημέρες (Pillay et al., 2010a). Αν και αυτή η άποψη για την ημίσεια ζωή των ουδετερόφιλων είναι αμφιλεγόμενη, οι τελευταίες ανοσολογικές έρευνες μετέβαλαν την επικρατούσα αντίληψη για τη λειτουργία των ουδετερόφιλων στην ανοσία. Στο παρελθόν, οι ερευνητές θεωρούσαν ότι τα ουδετερόφιλα ήταν παρόντα κατά την οξεία φάση της φλεγμονώδους αντίδρασης, λειτουργώντας ως «δολοφόνοι» παθογόνων. Τώρα εκτιμάται ότι διαμορφώνουν το ανοσοποιητικό τοπίο, επικοινωνώντας με μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και κύτταρα του ειδικού σκέλους της ανοσίας, είτε μέσω άμεσης επαφής με αυτά, είτε μέσω διαλυτών μεσολαβητών (Kolaczowska and Kubas, 2013).

1.3.2. Ομοίσταση των ουδετερόφιλων

Τα ουδετερόφιλα παράγονται στο μυελό των οστών κατά την αιμοποίηση ως απάντηση σε κυτταροκίνες, με κυριότερη τον παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων (G-CSF) (Borregaard, 2010). Οι καθοριστικοί παράγοντες του συνολικού αριθμού των ουδετερόφιλων στο σώμα είναι ο ρυθμός παραγωγής τους, η αποθήκευσή τους εντός και εκτός του μυελού των οστών και η επιβίωση/κάθαρσή τους στο αίμα. Η είσοδος στους ιστούς κατά τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις επηρεάζει, επίσης, το συνολικό αριθμό των ουδετερόφιλων. Η ικανότητα ενός οργανισμού να διατηρεί ισορροπία στη διαδικασία παραγωγής των ουδετερόφιλων, με παράλληλη προσαρμογή στις περιβαλλοντικές προκλήσεις, υποδεικνύει ότι πιθανόν υπάρχει, ενδογενώς, κάποια μοριακή μέθοδος (neutrostat, ουδετεροστασία) συνεχούς καταμέτρησης του αριθμού των ουδετερόφιλων και ανάλογης προσαρμογής του (Bugl et al., 2012). Πρόσφατα περιγράφηκαν βρόχοι ανάδρασης που συμβάλλουν στην ομοίσταση των ουδετερόφιλων υπό συνθήκες ηρεμίας, καθώς και σε φλεγμονώδεις καταστάσεις.

1.3.3. Στρατολόγηση των ουδετερόφιλων σε θέσεις φλεγμονής

Τα ώριμα ουδετερόφιλα φτάνουν σε θέσεις μόλυνσης ή φλεγμονής των ιστών μέσω του αγγειακού συστήματος. Η έξοδος τους από το αίμα, μελετημένη κατά κύριο λόγο στα τριχοειδή φλεβίδια, ακολουθεί μία προγραμματισμένη διαδικασία που αναφέρεται ως «στρατολόγηση» (recruitment) (Muller, 2013). Ο καταρράκτης στρατολόγησης των ουδετερόφιλων διαμεσολαβείται από τη διαδοχική αλληλεπίδραση των υποδοχέων των ουδετερόφιλων με συνδέτες της επιφάνειας του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου. Το κλασικό μονοπάτι αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα: (α) την αρχική προσκόλληση των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο (σύλληψη), (β) την κύλισή τους κατά μήκος του ενδοθηλίου, (γ) τη σταθερή τους προσκόλληση, (δ) τον ερπυσμό κατά μήκος του ενδοθηλίου και (ε) τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων εντός του ιστού, όπου η πλήρης ενεργοποίησή τους οδηγεί σε φαγοκυττάρωση και θανάτωση των παθογόνων μέσω παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), αποκοκκίωσης και σχηματισμού εξωκυτταρικών παγίδων (Neutrophil Extracellular Traps, NETs) (Εικόνα 1.4).



Εικόνα. 1.4. Τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα ενεργοποιούνται σταδιακά για να ανταποκριθούν σε τοπική βακτηριακή λοίμωξη. Αρχικά, δεσμεύονται στο τοίχωμα του αιμοφόρου αγγείου μέσω σελεκτινών και υποβάλλονται σε παροδική κύλιση. Οι ιντεγκρίνες που εκφράζονται από τα ουδετερόφιλα αλλάζουν το σχήμα τους ως απάντηση σε σήματα ενεργοποίησης, οδηγώντας τα σε σταθερή προσκόλληση. Η μετανάστευση των ουδετερόφιλων στους ιστούς καταλήγει στη θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών μέσω ποικίλων μηχανισμών (τροποποιημένη από Amulic et al., 2012).

1.3.4. Ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων

Τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας και η ενεργοποίησή τους αποτελεί καθοριστικό βήμα για τη φλεγμονώδη απάντηση. Η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων ξεκινά με τη μερική ενεργοποίησή τους, καθώς διέρχονται μέσω του αγγειακού ενδοθηλίου, κατά τη στρατολόγησή τους. Μετά την είσοδο στο φλεγμαίνοντα ιστό, ως απόκριση σε προφλεγμονώδη ερεθίσματα, τα ουδετερόφιλα ενεργοποιούνται πλήρως, κατάσταση που χαρακτηρίζεται από την απελευθέρωση πρωτεϊνών από τα κοκκία τους, την απόκτηση φαγοκυτταρικών ικανοτήτων και το σχηματισμό NETs. Τα ουδετερόφιλα δεν ανταποκρίνονται σε ένα μόνο ερέθισμα, αλλά η έκθεση σε ένα ερέθισμα ενισχύει την ικανότητά τους να αποκριθούν βέλτιστα σε ένα δεύτερο ερέθισμα, ένα φαινόμενο που ονομάζεται «priming» και επιτρέπει την ταχεία ενεργοποίησή τους (Swain et al., 2002). Ωστόσο, οι μηχανισμοί ενεργοποίησης που είναι επωφελείς για τη θανάτωση παθογόνων, γίνονται επιζήμιοι σε περιπτώσεις στείρων τραυματισμών, όπως οι αυτοάνοσες και άλλες χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες.

1.3.4.1. Ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων από μόρια παθογόνων ή πρωτεΐνες που σχετίζονται με κυτταρική βλάβη

Τα ουδετερόφιλα αναγνωρίζουν τα παθογόνα μέσω υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας, αλλά και ενδοκυτταρικών, που δεσμεύουν χαρακτηριστικά μόρια του μικροβίου.

1.3.4.1.1. Ενεργοποίηση μέσω υποδοχέων αναγνώρισης προτύπου (PRRs)

Οι υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου (PRRs) των ουδετερόφιλων αναγνωρίζουν μοτίβα σχετιζόμενα με παθογόνα (PAMPs). Πολλοί από τους PRRs αλληλεπιδρούν, επίσης, με μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με βλάβες (DAMPs), τα οποία απελευθερώνονται από νεκρωτικά κύτταρα κατά τη διάρκεια στείρας φλεγμονής. Στα ουδετερόφιλα, οι κύριοι ενδοκυτταρικοί PRRs είναι οι C-τύπου υποδοχείς λεκτίνης, ενώ οι κυριότεροι τύποι μη φαγοκυτταρικών PRRs είναι οι TLRs. Σε επίπεδο RNA, τα ουδετερόφιλα εκφράζουν TLR-1, -2, -4, -5, -6, -8, και -10 [και τον TLR-9, μετά από διέγερση με τον παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων, (GM-CSF)] (Hayashi et al., 2003). Η διέγερση μέσω των TLRs επάγει τις ενισχυμένες αποκρίσεις των ουδετερόφιλων σε άλλα ερεθίσματα, αυξάνοντας τη φαγοκυτταρική τους ικανότητα, την απελευθέρωση κυτταροκινών και επιβραδύνοντας την απόπτωσή τους (Parker et al., 2005).

1.3.4.1.2. Ενεργοποίηση μέσω υποδοχέων οψωνισμού (opsonic receptors)

Οι κλασικές οψωνίνες, οι ανοσοσφαιρίνες (Immunoglobulins, Ig) τάξης G και το προϊόν ενεργοποίησης του συμπληρώματος C3b, είναι απαραίτητα για τη μεσολαβούμενη από τα ουδετερόφιλα θανάτωση των παθογόνων. Τα ουδετερόφιλα σε ηρεμία εκφράζουν δύο τύπους υποδοχέων συμπληρώματος: τον CR3 (γνωστό και ως Mac-1 ή CD11b/CD18) και τον CR4, οι οποίοι αναγνωρίζουν οψωνοποιημένους στόχους από το ενεργοποιημένο προϊόν του συμπληρώματος iC3b (Schymeinsky et al., 2007), ενώ κατά την ενεργοποίησή τους αυξάνεται η έκφραση του CR1 (CD35) (Changelian et al., 1985). Εκφράζουν, επίσης, υποδοχείς χαμηλής και υψηλής συγγένειας για το Fc τμήμα των IgG (FcγRs) (Bruhns, 2012). Τα μόρια πεντραξίνης, μία οικογένεια εκκρινόμενων PRRs, αντιπροσωπεύουν τον τρίτο βασικό τύπο οψωνίνης που δεσμεύεται τόσο σε FcγRs, όσο και σε CRs. Οι καλύτερα μελετημένες πεντραξίνες είναι η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και το συστατικό αμυλοειδές P του ορού (SAP), τα οποία παράγονται στο ήπαρ κατά τη φλεγμονή και οψωνοποιούν μικροβιακά παθογόνα μέσω αναγνώρισης PAMPs. Η αλληλεπίδρασή τους με ένα μικρόβιο προκαλεί ταχεία ενεργοποίηση του συμπληρώματος, διευκολύνοντας την αναγνώριση του

παθογόνου από τους CRs των ουδετερόφιλων. Επιπρόσθετα, αναγνωρίζονται άμεσα από τους FcγRs και επάγουν την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων (Lu et al., 2012).

1.3.4.1.3. Ενεργοποίηση μέσω υποδοχέων συζευγμένων με G πρωτεΐνες

Τα ουδετερόφιλα εκφράζουν ένα μεγάλο ρεπερτόριο υποδοχέων συζευγμένων με G πρωτεΐνες (GPCRs), που αναγνωρίζουν βακτηριακά προϊόντα, καθώς και ενδογενή μόρια που απελευθερώνονται κατά τη φλεγμονή (Rabiet et al., 2007). Οι GPCRs εμπλέκονται κυρίως στην καθοδήγηση της μετανάστευσης των ουδετερόφιλων και δευτερευόντως στη μερική ή πλήρη ενεργοποίησή τους. Περιέργως, τα ουδετερόφιλα μπορούν να ανιχνεύουν και να απαντούν ανάλογα με την ποσότητα των παρεχόμενων χημειοτακτικών μορίων, τα οποία τους επιτρέπουν να φτάσουν στην περιοχή της φλεγμονής (Kim and Haynes, 2012). Μερικοί από αυτούς τους υποδοχείς αναγνωρίζουν και κυτταρικά προϊόντα του ξενιστή, τα οποία απελευθερώνονται κατά τον τραυματισμό ή το θάνατο των κυττάρων (Zhang et al., 2010).

1.3.5. Θανάτωση παθογόνων από τα ουδετερόφιλα

Η διαδικασία με την οποία τα ουδετερόφιλα σκοτώνουν τους εισβολείς εξαρτάται από τρεις κύριους μηχανισμούς: τη μεσολαβούμενη από υποδοχέα πρόσληψη του παθογόνου σε ενδοκυτταρικό κυστίδιο, την παραγωγή εξαιρετικά τοξικών ROS στο κυστίδιο και τη σύντηξη του με κοκκία των ουδετερόφιλων, που περιέχουν αντιμικροβιακούς μεσολαβητές.

1.3.5.1. Θανάτωση παθογόνων μέσω φαγοκυττάρωσης

Η φαγοκυττάρωση του οψωνοποιημένου μικροβίου από τα ουδετερόφιλα εξαρτάται από την εμπλοκή των υποδοχέων οψωνισμού που περικλείουν το παθογόνο στο φαγόσωμα (Nordenfelt and Tapper, 2011). Η διαδικασία είναι ιδιαίτερα γρήγορη, καθώς η αφομοίωση οψωνοποιημένων με IgG σωματιδίων γίνεται εντός 20 δευτερολέπτων (Segal et al., 1980). Ακολουθείται από σύντηξη του φαγοσώματος με προσχηματισμένα κοκκία εντός του κυττάρου προς σχηματισμό του φαγολυσοσώματος (ωρίμανση του φαγοσώματος). Τα κοκκία περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα και υπομονάδες της NADPH οξειδάσης, εκκινώντας μηχανισμούς θανάτωσης. Η φαγοκυττάρωση που επιτελούν τα ουδετερόφιλα διαφέρει από εκείνη των άλλων φαγοκυττάρων, όπου η πρόσληψη του σωματιδίου και η ωρίμανση του φαγοσώματος γίνονται πολύ πιο αργά (Vieira et al., 2012). Ωστόσο, η φαγοκυττάρωση και η ωρίμανση του φαγοσώματος δεν είναι αλάνθαστες διεργασίες, καθώς τα κοκκία μπορεί να συντηχθούν με το φαγόσωμα πριν εκείνο ωριμάσει, οδηγώντας στην απελευθέρωση κυτταρολυτικού περιεχομένου και σε κυτταρική και ιστική βλάβη (Sheppard et al., 2005).

1.3.5.2. Θανάτωση παθογόνων μέσω παραγωγής ROS

Παράλληλα με τη φαγοκυττάρωση, αυξάνεται δραματικά και η κατανάλωση οξυγόνου (αναπνευστική έκρηξη), η οποία σχετίζεται με τις ROS που παράγονται από τα ουδετερόφιλα, μετά από ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης. Η κύρια πρωτεΐνη των κοκκίων μυελοϋπεροξειδάση (MPO) καταλύει το σχηματισμό του υποχλωριώδους οξέος (HOCl) μέσω της αντίδρασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου με το χλωρίδιο (Lambeth, 2004). Αυτά τα παράγωγα οξυγόνου διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη θανάτωση παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων. Ωστόσο, είναι ακόμα υπό συζήτηση αν τα ουδετερόφιλα σκοτώνουν άμεσα (μέσω αποκαρβοξυλίωσης, απαμίνωσης ή υπεροξειδωσης των πρωτεϊνών και των λιπιδίων) ή έμμεσα (μέσω ρύθμισης της δραστηριότητας της πρωτεΐνάσης των φαγοκυττάρων) (Williams, 2006). Το νιτρικό οξείδιο (NO), ένα βραχύβιο, ιδιαίτερα δραστικό μόριο, παράγεται από την επαγόμενη συνθάση του νιτρικού οξειδίου (iNOS), η οποία διεγείρεται μετά από ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, αλλά και σε βακτηριακές λοιμώξεις (Wheeler et al., 1997).

1.3.5.3. Θανάτωση παθογόνων μέσω αποκοκκίωσης

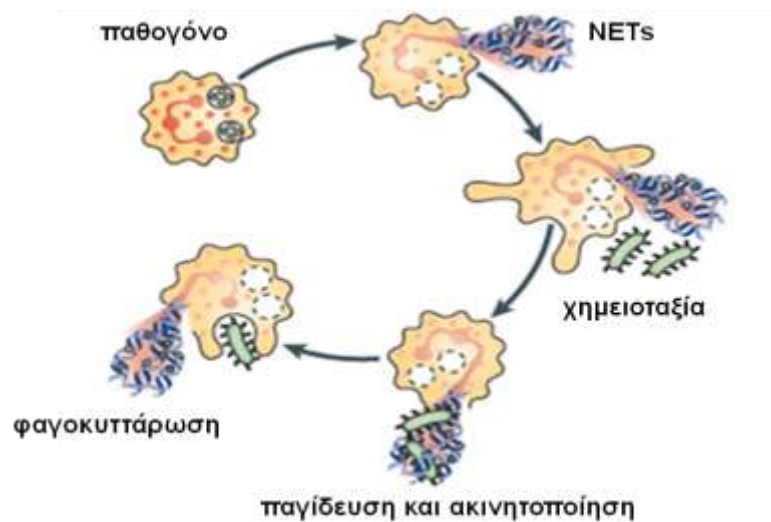
Τα ουδετερόφιλα αποθηκεύουν πρωτεΐνάσες και αντιμικροβιακά πεπτίδια σε κοκκία που συντήκονται με το φαγόσωμα. Η σύντηξη των κοκκίων με την πλασματική μεμβράνη και η εξωκυττάρια απελευθέρωση του περιεχομένου τους, έχει ως αποτέλεσμα την παρουσίαση υποδοχέων προσκόλλησης και χημειοταξίας προωθώντας τη στρατολόγηση των ουδετερόφιλων. Η κινητοποίηση δευτερογενών και τριτογενών κοκκίων κατά τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων διευκολύνει την αποικοδόμηση του κολλαγόνου της βασικής μεμβράνης, απομακρύνοντας ένα φυσικό εμπόδιο για την έξοδό τους. Τα ουδετερόφιλα περιέχουν κυρίως κατιονικά πεπτίδια, α-αμυντίνες και καθελικιδίνες (Choi et al., 2012), με άμεση αντιμικροβιακή δραστηριότητα και ανοσορυθμιστικές λειτουργίες (Lande et al., 2007).

1.3.5.4. Θανάτωση παθογόνων μέσω του μηχανισμού σχηματισμού NETs (NETosis)

Ο σχηματισμός NETs είναι αποτέλεσμα μίας ιδιαίτερης μορφής κυτταρικού θανάτου, κατά την οποία η αποσυμπυκνωμένη χρωματίνη και προϊόντα των κοκκίων απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο, ως αποτέλεσμα της διάλυσης των πυρηνικών μεμβρανών και των μεμβρανών των κοκκίων (Brinkmann et al., 2004) (**Εικόνα 1.5**). Στα NETs συνεντοπίζονται χρωματίνη και πρωτεΐνες των κοκκίων, τα οποία είναι ορατά με ανοσοχρώση, ως πλέγμα εκτός του κυττάρου (Papayannopoulos et al., 2010). Τα

ουδετερόφιλα που σχηματίζουν NETs διακρίνονται από τα αποπτωτικά από την έλλειψη "eat me" σημάτων από την επιφάνεια του κυττάρου. Ως αποτέλεσμα, αυτά τα ουδετερόφιλα δεν εκκαθαρίζονται από τα άλλα φαγοκύτταρα και η υπολειμματική χρωματίνη αποδομείται κυρίως από νουκλεάσες (Fuchs et al., 2007). Ο σχηματισμός NETs διεγείρεται από ποικιλία φλεγμονωδών μεσολαβητών και PAMPs από ευρύ φάσμα μικροβίων. Ο βαθμός σχηματισμού NETs ποικίλλει ανάλογα με την ένταση και το συνδυασμό των ερεθισμάτων, αλλά γενικά, είναι αργή διαδικασία (2-4 ώρες) (Clark et al., 2007).

Τα NETs επιτελούν αντιμικροβιακό ρόλο με την παγίδευση παθογόνων στο κολλώδες πλέγμα της χρωματίνης, αλλά και εκθέτοντας τα παθογόνα σε υψηλές συγκεντρώσεις αντιμικροβιακών παραγόντων. Εκτός από MPO και ελαστάση, τα NETs είναι πηγή LL-37, S100A, ενώ και οι ίδιες οι ιστόνες έχουν σημαντική αντιμικροβιακή δραστηριότητα (Papayannopoulos and Zychlinsky, 2009). Ωστόσο, ορισμένα βακτηριακά στελέχη εκφράζουν νουκλεάσες που αποικοδομούν τα NETs (Beiter et al., 2006), ενώ άλλα στελέχη τροποποιούν το εξωτερικό πολυσακχαριτικό τους περίβλημα (Wartha et al., 2007). Επιπλέον, ο υπερβολικός σχηματισμός NETs συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις που μεσολαβούνται από τα ουδετερόφιλα, όπως η αγγειίτιδα, η σηψαιμία, ο συστηματικός ερυθριματώδης λύκος, η νεφρίτιδα, η θρόμβωση, η αγγειακή βλάβη και η προεκλαμψία (Mayadas et al., 2014).



Εικόνα 1.5. Ο μηχανισμός λειτουργίας των NETs. Στα NETs παγιδεύονται παθογόνα, τα οποία λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αντιμικροβιακών συστατικών, απενεργοποιούνται και θανατώνονται ανεξάρτητα από τη φαγοκυτταρική πρόσληψή τους. Τα NETs χρησιμεύουν και ως φυσικό φράγμα της περαιτέρω εξάπλωσης των παθογόνων (τροποποιημένη από Kolaczkowska and Kubes, 2013).

1.3.6. Ανοσοτροποποιητικός ρόλος των ουδετερόφιλων - «κυτταρική συνομιλία»

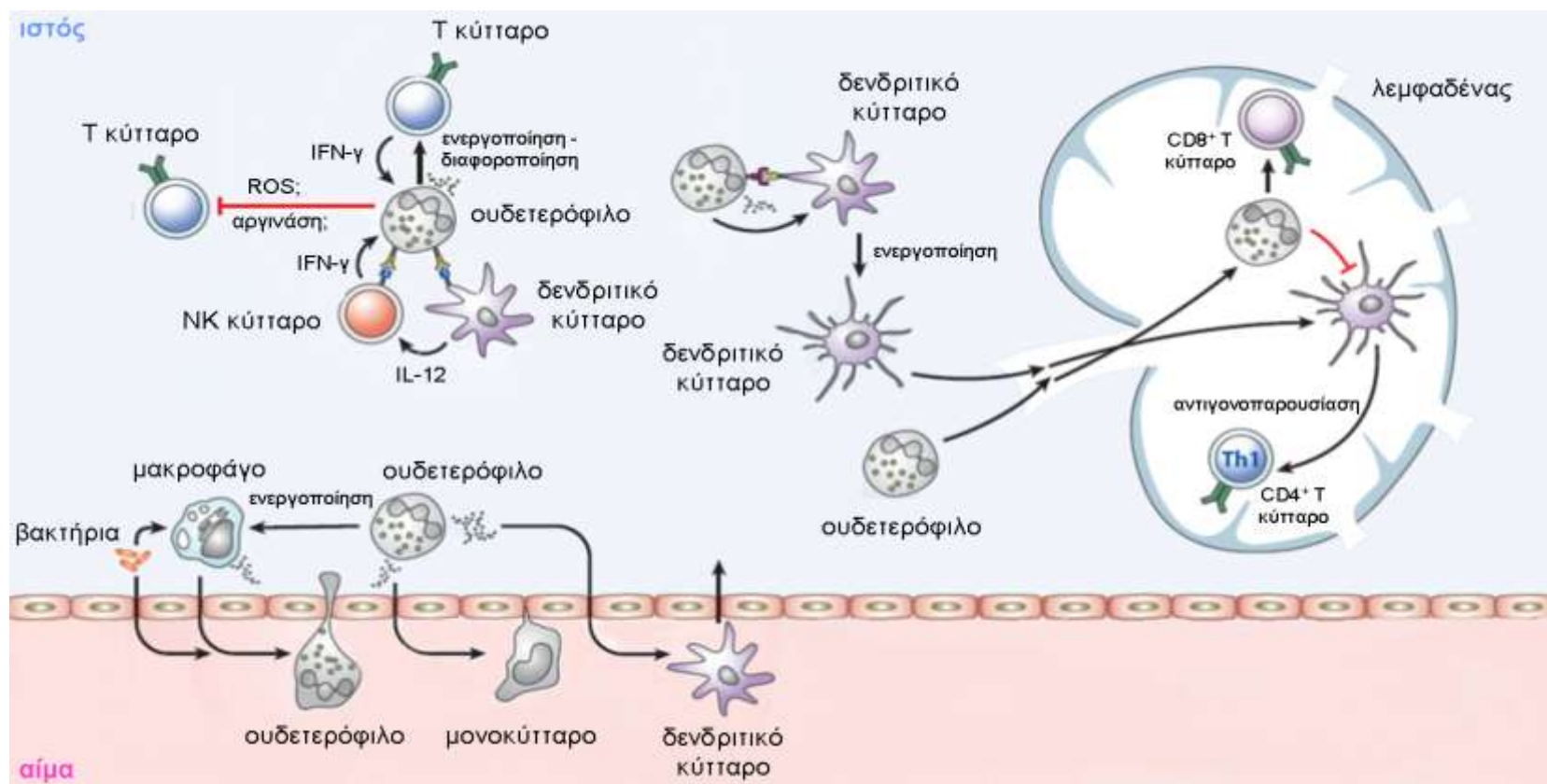
Τα ουδετερόφιλα σαφώς εμπλέκονται στη θανάτωση εξωκυττάρων παθογόνων, αλλά νέα στοιχεία δείχνουν ότι, παράλληλα, συμβάλλουν στην απάντηση σε ενδοκυτταρικά παθογόνα και ιούς μέσω πολύπλοκων «συνομιλιών» με άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Εικόνα 1.6). Μεγάλο μέρος αυτής της συνομιλίας μεσολαβείται από την ικανότητα των ουδετερόφιλων να εκκρίνουν κυτταροκίνες ή να εκφράζουν μεγάλο αριθμό κυτταρικών επιφανειακών μορίων που αλληλεπιδρούν άμεσα με τα υπόλοιπα ανοσοκύτταρα (Mantovani et al., 2011). Έτσι, από τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα-τελεστές, τα ουδετερόφιλα θεωρούνται πια και λειτουργικά ενεργοί εταίροι της ανοσοαπόκρισης.

Πολλά προϊόντα των ουδετερόφιλων είναι χημειοτακτικά για τα δενδριτικά κύτταρα και απαιτούνται για την ταχεία στρατολόγησή τους στις θέσεις της μόλυνσης (Yang et al., 2009). Η άμεση δέσμευση των ουδετερόφιλων στα δενδριτικά κύτταρα προωθεί την ωρίμανση των δεύτερων σε πιο αποτελεσματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και τους παρέχει πρόσβαση στα προϊόντα των παθογόνων που έχουν αιχμαλωτιστεί (Boudaly, 2009). Επιπλέον, τα ουδετερόφιλα αλληλεπιδρούν και με τα T κύτταρα σε διάφορα επίπεδα. Μάλιστα, σε *in vivo* μοντέλο σε ποντίκια, έχει αποδειχθεί ότι τα ουδετερόφιλα μπορούν να λειτουργήσουν και ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, καθώς μετά από διέγερση με IFN- γ , εκφράζουν χαμηλά επίπεδα MHC μορίων τάξης II και συνδιεγερτικών μορίων, τα οποία διευκολύνουν την Th1 και Th17 πόλωση (Abi Abdallah et al., 2011). Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι ότι τα ουδετερόφιλα μεταφέρουν αντιγόνα στους λεμφοαδένες μεταναστεύοντας μέσω των λεμφαγγείων, όπου είτε παρουσιάζουν άμεσα το αντιγόνο στα T κύτταρα ή το «παραδίδουν» στα δενδριτικά κύτταρα (Beauvillain et al., 2011). Τα ουδετερόφιλα προκαλούν και ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα, καθώς αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων που παράγουν IFN- γ . Επιπλέον, η απελευθέρωση αργινάσης από ενεργοποιημένα ή νεκρά ουδετερόφιλα καταστρέφει την εξωκυτταρική L-αργινίνη, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων (Mayadas et al., 2010). Πιο πρόσφατα, βρέθηκε ότι ένα υποσύνολο των ουδετερόφιλων αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων με την απελευθέρωση ROS στην ανοσολογική σύναψη (Pillay et al., 2012). Τέλος, τα ουδετερόφιλα παράγουν τις κυτταροκίνες BAFF (παράγοντας ενεργοποίησης B κυττάρων, γνωστός και ως BLYS) και APRIL (συνδέτης που επάγει τον πολλαπλασιασμό), μόρια απαραίτητα για την επιβίωση και ενεργοποίηση των B κυττάρων (Scarpini et al., 2008).

Τα ουδετερόφιλα ρυθμίζουν την τελική ωρίμανση των NK κυττάρων, τόσο σε ασθενείς όσο και σε μοντέλο ουδετεροπενίας σε ποντίκια (Jaeger et al., 2012). Οι μελέτες αυτές βασίζονται είτε στην αναστολή της παραγωγής ουδετερόφιλων σε ποντίκια ή σε κλινικές

παρατηρήσεις από ουδετεροπενικούς ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα. Δεν έχει προσδιοριστεί πώς ακριβώς διαμεσολαβείται αυτή η συνομιλία. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια μολυσματικής νόσου, η απελευθέρωση κυταροκινών από τα ουδετερόφιλα ενεργοποιεί άμεσα τη λειτουργία των NK κυττάρων (Sporri et al., 2008). Η IL-12 που παράγεται από τα δενδριτικά κύτταρα απαιτείται, επίσης, για πλήρη ενεργοποίηση, γεγονός που υποδηλώνει την αλληλεπίδραση και των τριών τύπων κυττάρων.

Οι αλληλεπιδράσεις ουδετερόφιλων-μακροφάγων είναι σημαντικές τόσο για την έναρξη όσο και την άρση των φλεγμονωδών αποκρίσεων. Τα στρατολογημένα ουδετερόφιλα συμβάλλουν στην εισροή των μονοκυττάρων στις θέσεις φλεγμονής με την έκκριση χημειοκινών και πρωτεϊνών από τα κοκκία τους. Οι πρωτεΐνες των πρωτογενών κοκκίων των ουδετερόφιλων ενισχύουν την αντιμικροβιακή δράση των μακροφάγων, αυξάνοντας την ικανότητά τους να φαγοκυτταρώνουν και να εκκρίνουν κυτταροκίνες (Soehnlein et al., 2009). Κατά τη λύση της φλεγμονής, η πρόσληψη των αποπτωτικών ουδετερόφιλων από τα μακροφάγα οδηγεί σε μείωση της παραγωγής IL-23 από τα μακροφάγα, μειώνοντας την έκκριση IL-17 από τα T κύτταρα και οδηγώντας σε μείωση του G-CSF και τελικά, της παραγωγής ουδετερόφιλων. Παράλληλα, τα μακροφάγα παράγουν IL-10, μειώνοντας την IL-12 και προωθώντας την επιδιόρθωση των ιστών (Filaridy et al., 2010).



Εικόνα 1.6. Επικοινωνία των ουδετερόφιλων με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα ουδετερόφιλα είναι σημαντικά για τη στρατολόγηση μονοκυττάρων και денδριτικών κυττάρων στους μολυσμένους ιστούς και για την ενίσχυση της δράσης τους. Αντίθετα, στους λεμφαδένες παρεμποδίζουν τη λειτουργία των денδριτικών κυττάρων, αναστέλλοντας την αντιγονοπαρουσίαση στα CD4+ T κύτταρα. Τα ουδετερόφιλα δρουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα προς τα CD8+ T κύτταρα και εκκρίνουν IL-12, η οποία ενεργοποιεί τα T κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους, ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα με την έκκριση IFN-γ. Τέλος, τα ουδετερόφιλα, τα денδριτικά κύτταρα και τα NK κύτταρα ενισχύουν το ένα τη δραστηριότητα του άλλου, μέσω αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-υποδοχέα και διαλυτών μεσολαβητών.

1.3.7. Ο ρόλος των ουδετερόφιλων στις χρόνιες ασθένειες, όπως ο καρκίνος

Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι τα ουδετερόφιλα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη και διαμόρφωση της ανοσοαπόκρισης κατά τη διάρκεια χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών, όπως η αθηροσκλήρωση, οι αλλεργίες, τα αυτοάνοσα νοσήματα και ο καρκίνος (Mayadas et al., 2014). Η σχέση μεταξύ ουδετερόφιλων και καρκίνου είναι συγκεχυμένη, διότι φαίνεται ότι τα σχετιζόμενα με τον όγκο ουδετερόφιλα (tumor associated neutrophils, TANs) έχουν προ-ογκογενετικές ή αντι-ογκογενετικές επιδράσεις, ανάλογα με τον τύπο του όγκου ή/και το πρότυπο πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιείται. Οι περισσότερες κλινικές παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι η παρουσία άφθονων ουδετερόφιλων μέσα στην κοίτη του όγκου συσχετίζεται με αυξημένη ανάπτυξή του και κατά συνέπεια φτωχή πρόγνωση (Jensen et al., 2009), ενώ πολλοί όγκοι παράγουν χημειοκίνες που προσελκύουν τα ουδετερόφιλα (Ji et al., 2006). Η αρχική στρατολόγηση των ουδετερόφιλων στην κοίτη του όγκου οδηγεί στην ενεργοποίησή τους, την παραγωγή χημειοκινών και την περαιτέρω ενίσχυση της στρατολόγησης φλεγμονωδών κυττάρων (Ueha et al., 2011). Σε ζωϊκά μοντέλα, έχει δειχθεί ότι μέσα στην κοίτη του όγκου τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν παράγοντες που προάγουν την ανάπτυξή του (Houghton et al., 2010).

Αντίθετα, πολλές παρατηρήσεις δείχνουν ότι η φλεγμονώδης διήθηση από ουδετερόφιλα ασκεί αντικαρκινική δράση (Fridlender and Albelda, 2012). Τα ουδετερόφιλα σκοτώνουν καρκινικά κύτταρα *in vitro*, κυρίως μέσω ROS, οι οποίες επηρεάζουν τα μεταστατικά κύτταρα, περιορίζοντας την εξάπλωσή τους, όπως προτείνεται από μελέτη με ουδετερόφιλα που έχουν διεισδύσει στον όγκο (tumor entrained neutrophils, TENs) σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (Granot et al., 2011). Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα εκφράζουν FAS, το οποίο μέσω του FAS συνδέτη επί του καρκινικού κυττάρου, διεγείρει την απόπτωση. Τα TANs και TENs είναι προφλεγμονώδη κύτταρα και εκκρίνουν κυταροκίνες που αυξάνουν την κυτταρολυτική λειτουργία των CD8+ T κυττάρων. Μπορούν, επίσης, είτε άμεσα να παρουσιάζουν αντιγόνα του όγκου στα CD4+ T κύτταρα ή να διευκολύνουν την παρουσίασή τους από τα δενδριτικά κύτταρα. Οι παράγοντες που καθορίζουν τη δράση των ουδετερόφιλων παραμένουν αινιγματικοί.

1.4. Μονοκύτταρα ή μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα

Τα μονοκύτταρα αποτελούν περίπου το 3-10% των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος στον άνθρωπο και περίπου το 4% των λευκοκυττάρων στο ποντίκι (Auffray et al., 2009). Αναπτύσσονται στο μυελό των οστών και προέρχονται από την ίδια μυελική προγονική σειρά με τα ουδετερόφιλα. Απελευθερώνονται στην κυκλοφορία ως μη διαιρούμενα κύτταρα και ο χρόνος ημίσειας ζωής των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων είναι περίπου 3 ημέρες. Η παραγωγή και ο κύκλος ζωής των μονοκυττάρων είναι περισσότερο πολύπλοκος από των ουδετερόφιλων. Αν και μοιράζονται κάποιες παρόμοιες φυσιολογικές ιδιότητες με τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα του μυελού και του αίματος διατηρούν την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε φαγοκύτταρα, που ονομάζονται μακροφάγα και ιστιοκύτταρα στον σπλήνα, το ήπαρ, τους πνεύμονες και τους άλλους ιστούς. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι τα μονοκύτταρα λειτουργούν και ως πρόδρομες μορφές των δενδριτικών κυττάρων. Μάλιστα, κατά τη διάρκεια χρόνιων φλεγμονωδών καταστάσεων, τα μονοκύτταρα μπορούν να συντηχθούν σχηματίζοντας γιγαντιαία κύτταρα.

1.4.1. Ο κύκλος ζωής και οι απόγονοι των μονοκυττάρων

Ο πολύπλοκος κύκλος ζωής των μονοκυττάρων οδήγησε τους παθολόγους του 19ου αιώνα να πιστεύουν ότι τα μακροφάγα προέρχονταν από μεσεγχυματικό ιστό, παρά από κύτταρα του αίματος. Μετά από ραδιοϊσοτοπική επισήμανση κυττάρων του αίματος και του μυελού των οστών, αποδείχθηκε ότι τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα είναι οι πρόδρομες μορφές των ιστικών μακροφάγων και αποτελούν σημαντική δεξαμενή ανανέωσης και των ιστικών μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων. Ωστόσο, η διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε δενδριτικά κύτταρα παρατηρείται κυρίως σε φλεγμονώδεις συνθήκες, πχ. κατά τη διάρκεια ενεργού λοίμωξης, και η ανανέωση των ιστικών μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων δε βασίζεται αποκλειστικά στα μονοκύτταρα του αίματος (Fogg et al., 2006). Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα του αίματος και των ιστών επιβιώνουν πολύ περισσότερο από τα ουδετερόφιλα. Αυτό το χαρακτηριστικό τους είναι κλινικά σημαντικό, καθώς προστατεύουν τους ασθενείς από θανατηφόρες λοιμώξεις, όταν η παραγωγή των ουδετερόφιλων διακόπτεται παροδικά.

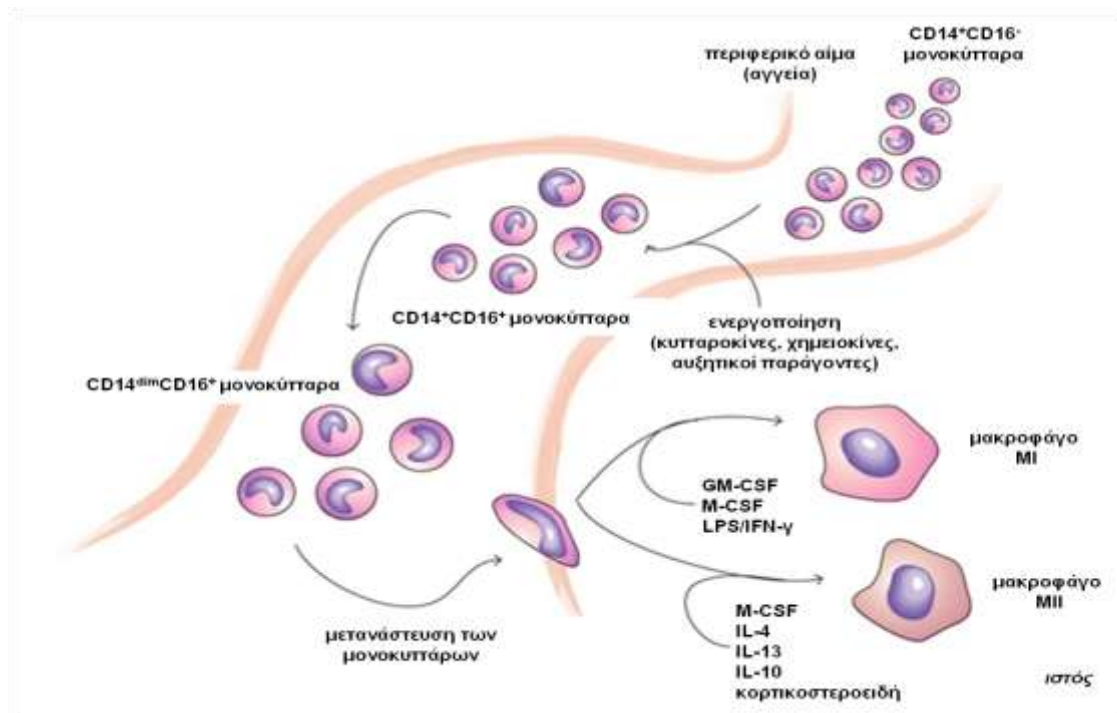
1.4.2. Γενικά χαρακτηριστικά των μονοκυττάρων

Τα μονοκύτταρα έχουν τυπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά: ακανόνιστο κυτταρικό σχήμα, νεφροειδή πυρήνα, κυτταροπλασματικά κυστίδια και υψηλή αναλογία κυτταροπλάσματος προς πυρήνα. Ωστόσο, εξακολουθούν να είναι ιδιαίτερα ετερογενή σε

μέγεθος και σχήμα και δύσκολα διακρίνονται μόνο από τη μορφολογία από τα δενδριτικά κύτταρα του αίματος, τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα. Σχεδόν 30 χρόνια πριν, αποδείχθηκε ότι τα ανθρώπινα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος δεν είναι ένας ομοιογενής πληθυσμός, αλλά διαφέρουν ως προς το φαινότυπο και τις λειτουργίες τους (Grage-Griebenow et al., 2001a). Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, περιγράφηκε η ύπαρξη δύο λειτουργικών υποσυνόλων μονοκυττάρων στον άνθρωπο. Με βάση το μέγεθος και την πυκνότητά τους, περιγράφηκε ένας σημαντικός πληθυσμός τακτικών ή μεγάλων μονοκυττάρων με υψηλή φαγοκυτταρική ικανότητα, δραστηριότητα MPO και δυνατότητα έκλυσης υπεροξειδίου και ένας ελάσσων πληθυσμός ενδιάμεσων ή μικρών μονοκυττάρων με χαμηλή δραστηριότητα MPO, αλλά μεγαλύτερη ικανότητα απελευθέρωσης IL-1 και επαγωγής εξαρτώμενης από αντίσωμα κυτταροτοξικότητας.

Τα υποσύνολα αυτά των μονοκυττάρων επιβεβαιώθηκαν και βάσει των διαφορών στην έκφραση επιφανειακών δεικτών (Auffray et al., 2009) (**Εικόνα 1.7**). Το κύριο υποσύνολο των μονοκυττάρων εκφράζει CD14, έχει υψηλότερη φαγοκυτταρική δραστηριότητα, αλλά χαμηλότερη παραγωγή κυτταροκινών, ενώ το δευτερεύον υποσύνολο των μικρών μονοκυττάρων χαρακτηρίζονται από την έκφραση του CD16 (FcγR-III) (Ziegler-Heitbrock, 2000). Τα CD14+CD16- μονοκύτταρα (κλασικά μονοκύτταρα) αντιπροσωπεύουν το 80-90% των μονοκυττάρων του αίματος, εκφράζουν υψηλά επίπεδα του υποδοχέα χημειοκίνης CCR2, χαμηλά επίπεδα CX3CR1 και *in vitro* παράγουν IL-10 αντί TNF-α και IL-1, ως απόκριση στο λιποπολυσακχαρίτη (lipopolysaccharide, LPS) (Weber et al., 2000). Σε αντίθεση, τα ανθρώπινα CD16+ μονοκύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα CX3CR1, χαμηλά επίπεδα CCR2, είναι υπεύθυνα για την παραγωγή TNF-α ως απόκριση σε διέγερση με LPS και ονομάζονται προφλεγμονώδη (Geissmann et al., 2003). Μελέτες έχουν αναφέρει ότι τα CD16+ μονοκύτταρα βρίσκονται σε μεγάλους αριθμούς στο αίμα ασθενών με οξεία φλεγμονή (Mizuno et al., 2005) και λοιμώδεις νόσους (Horelt et al., 2002), ενώ μειώνονται μετά από θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή (Fingerle-Rowson et al., 1998). Τα CD16+ μονοκύτταρα φάνηκε ότι αποτελούνται από τουλάχιστον δύο υποπληθυσμούς με εντυπωσιακά διαφορετικές λειτουργίες (Grage-Griebenow et al., 2001a). Τα μονοκύτταρα που εκφράζουν CD16 και CD14 (CD14+CD16+) και τους Fc υποδοχείς CD64 και CD32, έχουν φαγοκυτταρική δράση και είναι εξ ολοκλήρου υπεύθυνα για την παραγωγή TNF-α και IL-1 ως απόκριση στο LPS (Grage-Griebenow et al., 2001b). Σε αντίθεση, τα μονοκύτταρα που εκφράζουν CD16 αλλά πολύ χαμηλά επίπεδα του CD14 (CD14dimCD16+), στερούνται την έκφραση άλλων υποδοχέων Fc, είναι ελάχιστα φαγοκυτταρικά και δεν παράγουν TNF-α ή IL-1 ως απόκριση στο LPS (Skrzeczynska-Moncznik et al., 2008). Η πραγματική λειτουργία των

CD14^{dim}CD16⁺ μονοκυττάρων παραμένει απροσδιόριστη, με το μόνο γνωστό στοιχείο ότι αυξάνονται στο αίμα των σηπτικών ασθενών (Fingerle-Rowson et al., 1998).



Εικόνα 1.7. Τα μονοκύτταρα είναι ετερογενής πληθυσμός κυττάρων όσον αφορά τη μορφολογία, το φαινότυπο και τις ιδιότητές τους. Με βάση τους υποδοχείς CD14 και CD16, ταξινομούνται σε τρεις καλά χαρακτηρισμένους υποπληθυσμούς (CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ και CD14^{dim}CD16⁺). Κυκλοφορούν στο αίμα και στη συνέχεια μεταναστεύουν στους ιστούς, όπου διαφοροποιούνται σε M1 και M2 μακροφάγα, ανάλογα με τον παράγοντα ενεργοποίησης (τροποποιημένη από Eljaszewicz et al., 2013).

1.4.3. Φυσιολογικές λειτουργίες των μονοκυττάρων

Τα μονοκύτταρα και οι διαφοροποιημένοι απόγονοί τους διαδραματίζουν σημαντικό ρυθμιστικό και εκτελεστικό ρόλο τόσο στο φυσικό όσο και στο ειδικό σκέλος του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος. Τα μονοκύτταρα επιτελούν τρεις σημαντικές λειτουργίες: την παρουσίαση αντιγόνων, τη φαγοκυττάρωση και την ανοσορύθμιση.

1.4.3.1. Παρουσίαση αντιγόνων από τα μονοκύτταρα

Τα αντιγόνα που συναντούν τα μονοκύτταρα πριν εξαγγειωθούν στους ιστούς διατηρούνται επαρκώς, έτσι ώστε να είναι διαθέσιμα για παρουσίαση για σημαντικό χρονικό διάστημα μετά την επαφή (Tacke et al., 2006). Τουλάχιστον σε πειραματικές συνθήκες,

μονοκύτταρα τα οποία αναγνώρισαν εξωγενή αντιγόνα στο μυελό των οστών, ήταν σε θέση να διατηρήσουν και να παρουσιάσουν πεπτίδια αυτών των αντιγόνων μέσω των MHC μορίων τάξης II, πολύ αργότερα στον κύκλο ζωής τους. Αυτό το χαρακτηριστικό της διατήρησης αντιγόνου για μετέπειτα παρουσίαση, μετά από κατάλληλη ωρίμανση, είναι ένα χαρακτηριστικό που είχε αποδοθεί, κυρίως, στα δενδριτικά κύτταρα και τα διέκρινε από τα μακροφάγα, τα οποία έχουν μικρή δυνατότητα να διατηρούν αντιγόνα για καθυστερημένη παρουσίαση (Delamarre et al., 2005).

Εφόσον τα μονοκύτταρα είναι σε θέση να συλλαμβάνουν αντιγόνα εντός του μυελού των οστών ή κατά τη διέλευσή τους μέσω του αίματος, μπορούν να αποτελέσουν οχήματα παροχής αντιγόνων σε άλλα συστήματα οργάνων. Για παράδειγμα, έχει υποστηριχθεί ότι αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του αίματος μπορεί να τροφοδοτούν το θύμο με ιστοπεριοριζόμενα εαυτά αντιγόνα (Mathis and Benoist, 2004). Μελέτες σε ποντίκια με χειρουργικά αναστομωμένο κοινό κυκλοφορικό σύστημα υποδεικνύουν ότι τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του αίματος εισέρχονται στο θύμο συνεχώς. Έτσι, τα μονοκύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται σε δενδριτικά κύτταρα παρέχουν μία πηγή αντιγόνων που παρουσιάζονται στα θυμοκύτταρα εντός του θύμου. Η ικανότητα των μονοκυττάρων να συλλαμβάνουν και κυτταρικά αντιγόνα πριν την εξαγγελίωση τους, διευρύνει ακόμα περισσότερο το φάσμα των αντιγόνων που παρουσιάζουν μετά τη διαφοροποίησή τους σε θυμικά δενδριτικά κύτταρα.

1.4.3.2. Φαγοκυτταρική ικανότητα των μονοκυττάρων

Τα μονοκύτταρα εγκολπώνουν υλικά για δύο σκοπούς: για να εξαλείψουν απόβλητα και υπολείμματα και για να σκοτώσουν τους παθογόνους εισβολείς. Συγκεκριμένα, καταστρέφουν γηρασμένα ερυθροκύτταρα, απομακρύνουν έγκλειστα ερυθροκυττάρων από το σπλήνα και καθαρίζουν τα υπολείμματα σε περιοχές λοίμωξης ή βλάβης του ιστού. Επομένως, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την ομοίωση, μέσω της απομάκρυνσης αποπτωτικών κυττάρων, αλλά και του καθαρισμού των τοξικών ενώσεων.

1.4.3.3. Ανοσορύθμιση που επάγεται από τα μονοκύτταρα

Τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα απελευθερώνουν IL-1, IL-6, TNF και INF- α/β , κυτταροκίνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της αιμοποίησης, ενώ τα μονοκύτταρα διαμορφώνουν την ανοσολογική απάντηση και μέσω των χημειοκινών. Τα μακροφάγα μπορούν να ενεργοποιούν την iNOS, η οποία οδηγεί στη σύνθεση NO (MacMicking et al., 1997). Η παρατεταμένη παραγωγή NO προσδίδει στα μακροφάγα

κυτταροστατική ή κυτταροτοξική δραστηριότητα έναντι ιών, βακτηρίων, μυκήτων, πρωτόζωων, ελμίνθων και καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, μετά από ενεργοποίηση, τα μονοκύτταρα παράγουν υπεροξειδικά ανιόντα, μέσω ενεργοποίησης του συμπλόκου του ενζύμου της NADPH οξειδάσης. Τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, και τα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών στην κυτταρική τους επιφάνεια, ενώ διαθέτουν και TLRs. Η έκφραση των TLRs στα μονοκύτταρα είναι μεγαλύτερη από ότι στα ουδετερόφιλα. Μετά από δέσμευση των ειδικών συνδετών τους, οι TLRs σηματοδοτούν μέσω μονοπατιού εξαρτώμενου από τον MyD88, ή μέσω ανεξάρτητης από τον MyD88 οδού που εμπλέκει τον TRIF, ενεργοποιούν τον NF-κB και ενισχύουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών από μονοκύτταρα και μακροφάγα.

Άλλοι υποδοχείς των κυττάρων αυτών μπορούν να συνεργάζονται με συγκεκριμένους TLRs και να αναγνωρίζουν τα παθογόνα. Για παράδειγμα, το CD14 δεσμεύει το βακτηριακό LPS και αλληλεπιδρά με τον TLR-4, διευκολύνοντας την αναγνώριση και ενισχύοντας την εξάλειψη των Gram αρνητικών βακίλων από την κυκλοφορία και τους ιστούς. Απουσία φλεγμονής, τα μονοκύτταρα του μυελού των οστών έχουν ανώριμο φαινότυπο και χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα έκφρασης MHC μορίων τάξης II και συνδιεγερτικών μορίων. Μετά από μόλυνση, τα μονοκύτταρα απελευθερώνονται στην κυκλοφορία και μεταναστεύουν στις θέσεις φλεγμονής, όπου διαφοροποιούνται σε δενδριτικά κύτταρα. Οι τελεστικές λειτουργίες των μονοκυττάρων υπαγορεύονται από το γενικό πλαίσιο της φλεγμονής και από τη φύση του παθογόνου εισβολέα.

1.4.4. Ο ρόλος των μονοκυττάρων σε ασθένειες, με έμφαση στον καρκίνο

Τα μονοκύτταρα και οι απόγονοί τους έχουν συνδεθεί με ένα πλήθος ασθενειών, μεταξύ των οποίων οι καρδιαγγειακές παθήσεις, με κύρια την αθηροσκλήρωση, τα αυτοάνοσα νοσήματα, η σήψη, το τραύμα και ο καρκίνος.

Η παρατήρηση ότι τα μονοκύτταρα από ασθενείς με καρκίνο διαφέρουν από εκείνα που προέρχονται από υγιή άτομα δεν είναι πρόσφατη. Σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, τα μονοκύτταρα δε διαφοροποιούνται επαρκώς σε μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα, όπως συμβαίνει στα υγιή άτομα. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι ο ορός των ασθενών αναστέλλει τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε δενδριτικά κύτταρα και ότι ο βαθμός αναστολής συσχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) (Aalamian-Matheis et al., 2007). Τρία χρόνια αργότερα, βρέθηκε ότι τα CD14+ μονοκύτταρα εμφανίζουν μειωμένη έκφραση των HLA-DR μορίων σε αυτούς τους ασθενείς, καταστέλλοντας την ανοσολογική λειτουργία των κυττάρων αυτών *in vitro* και *in vivo* (Vuk-

Pavloni^c et al., 2010). Επιπλέον, αυτός ο τύπος ανοσοκαταστολής έχει παρατηρηθεί και σε περιπτώσεις καρκίνου των ωοθηκών, μελανώματος, ηπατοκυτταρικού καρκίνου, λεμφωμάτων, καθώς και στη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (Vuk-Pavloni^c et al., 2010).

1.4.5. Σύγκριση μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων

Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα μοιράζονται πολλές κοινές ιδιότητες με τα ουδετερόφιλα, αλλά έχουν και διακριτές μορφολογικές και λειτουργικές διαφορές, ανάλογα με τη φάση διαφοροποίησής τους. Τα μονοκύτταρα έχουν διατηρήσει την ικανότητα να αυξάνουν την παραγωγή πρωτεϊνών των κοκκίων τους μέσω νέας πρωτεϊνικής σύνθεσης, ένα χαρακτηριστικό που έχουν χάσει τα ώριμα ουδετερόφιλα. Υπάρχουν, επίσης, σημαντικές διαφορές στις χημειοτακτικές τους απαντήσεις και τη μεταβολική τους δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Σε θέσεις οξείας φλεγμονής, τα μονοκύτταρα συσσωρεύονται πιο αργά, αλλά παραμένουν για περισσότερο χρόνο. Η αναπνευστική τους έκρηξη είναι λιγότερο ακραία, αλλά η ικανότητά τους να σκοτώνουν πολλά μικρόβια είναι πιο ισχυρή σε σύγκριση με εκείνη των ουδετερόφιλων. Τα μονοκύτταρα έχουν Fc υποδοχείς και εκφράζουν τον υποδοχέα FcγRI (CD64) ιδιосуστατικά, σε αντίθεση με τα ουδετερόφιλα, τα οποία εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό μόνο ως απόκριση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα (Stossel et al., 2003). Μία σημαντική διαφορά μεταξύ των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων έγκειται στην ικανότητά τους να παράγουν νέες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης μίας ποικιλίας κυτταροκινών που συνδέονται με την ενίσχυση της φλεγμονώδους απάντησης. Το «ενδογενές πυρετογόνο», το οποίο ανακαλύφθηκε από τον Beeson και για πολλά χρόνια πίστευαν ότι κατά κύριο λόγο είναι προϊόν των ουδετερόφιλων, είναι τώρα γνωστό ότι παράγεται κυρίως από τα μονοκύτταρα και αφορά πυρετογόνες κυτταροκίνες (Dinarello et al., 1999).

1.5. Ανοσοδοκιμασίες

Η ανοσοδοκιμασία είναι μία βιοχημική δοκιμασία η οποία μετρά την παρουσία ή/και τη συγκέντρωση ενός μακρομορίου σε ένα διάλυμα με τη χρήση αντισωμάτων. Το μακρομόριο που ανιχνεύεται από την ανοσοδοκιμασία συχνά αναφέρεται ως «αναλύτης» και σε πολλές περιπτώσεις είναι μία πρωτεΐνη. Οι ανοσοδοκιμασίες υπάρχουν σε πολλές διαφορετικές μορφές και παραλλαγές, και μπορεί να εκτελεστούν σε πολλαπλά στάδια με αντιδραστήρια που προστίθενται διαδοχικά. Η τεχνολογία που επέτρεψε την παραγωγή μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων οδήγησε στη ραγδαία ανάπτυξη των ανοσοδοκιμασιών, καθώς τα μονοκλωνικά, κυρίως, αντισώματα χρησιμοποιούνται ως «εργαλεία» για την ανίχνευση μεμονωμένων μορίων σε πολύπλοκα μείγματα πρωτεϊνών ή δειγμάτων ιστών (Kohler and Milstein, 1975).

Οι ανοσοδοκιμασίες βασίζονται στην ικανότητα ενός αντισώματος να αναγνωρίζει και να δεσμεύει ένα ειδικό μακρομόριο σε ένα πολύπλοκο μείγμα μακρομορίων. Στην ανοσολογία, το μακρομόριο το οποίο δεσμεύεται από ένα αντίσωμα αναφέρεται ως αντιγόνο και η περιοχή του αντιγόνου στην οποία συνδέεται το αντίσωμα καλείται επίτοπος. Σε ορισμένες περιπτώσεις, σε μία ανοσοδοκιμασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντιγόνο για την ανίχνευση της παρουσίας αντισωμάτων σε ένα διάλυμα. Με άλλα λόγια, σε ορισμένες ανοσοδοκιμασίες, ο αναλύτης μπορεί να είναι αντίσωμα αντί για αντιγόνο.

Εκτός από την πρόσδεση του αντισώματος στο αντιγόνο, το άλλο βασικό χαρακτηριστικό όλων των ανοσοδοκιμασιών είναι το μέσο που χρησιμοποιείται για την παραγωγή μετρήσιμου σήματος, ως απόκριση στη σύνδεση. Οι περισσότερες, αν όχι όλες οι ανοσοδοκιμασίες, περιλαμβάνουν αντισώματα ή αντιγόνα χημικώς συνδεδεμένα με κάποιο ανιχνεύσιμο μόριο. Στις σύγχρονες ανοσοδοκιμασίες, υπάρχουν πολλοί τρόποι σήμανσης, οι οποίοι επιτρέπουν την ανίχνευση είτε εκπέμποντας ακτινοβολία, είτε προκαλώντας αλλαγή χρώματος σε ένα διάλυμα, είτε φθορίζοντας, είτε εκπέμποντας φως.

Οι ανοσοδοκιμασίες με βάση τη σήμανση χωρίζονται σε εκείνες που χρησιμοποιούν ραδιενεργά ισότοπα (ραδιοδοκιμασίες, radioimmunoassays, RIAs), ένζυμα (ενζυμικές ανοσοπροσροφητικές δοκιμασίες, enzyme linked immunosorbent assays, ELISAs), DNA ανιχνευτές (ανοσοποσοτική PCR πραγματικού χρόνου, iqPCR), φθορογόνους ανιχνευτές (πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες), ηλεκτροχημειοφωταύγεια και εκείνες στις οποίες δε χρησιμοποιείται καμία σήμανση. Αρχικά, η μόνη επιλογή για τη διεξαγωγή μίας ανοσοδοκιμασίας ήταν η RIA, στην οποία χρησιμοποιούνται ραδιενεργά σημασμένα αντιγόνα ή αντισώματα. Έτσι, η ραδιενέργεια παρέχει το σήμα, το οποίο υποδεικνύει αν ένα ειδικό αντιγόνο ή αντίσωμα είναι παρόν στο δείγμα. Η RIA ως τεχνική περιγράφηκε για

πρώτη φορά από τους Yalow και Berson τη δεκαετία του 1950 για τη μέτρηση της ινσουλίνης στο πλάσμα (Yalow and Berson, 1960). Αν και είναι εξαιρετικά ειδική και ευαίσθητη τεχνική, απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και ειδικές προφυλάξεις λόγω των ραδιενεργών ουσιών που χρησιμοποιούνται. Για τους λόγους αυτούς, αναπτύχθηκαν μέθοδοι κατά τις οποίες τα αντισώματα συνδέονται με βιολογικά ένζυμα.

1.5.1. Ανοσοδοκιμασία ELISA

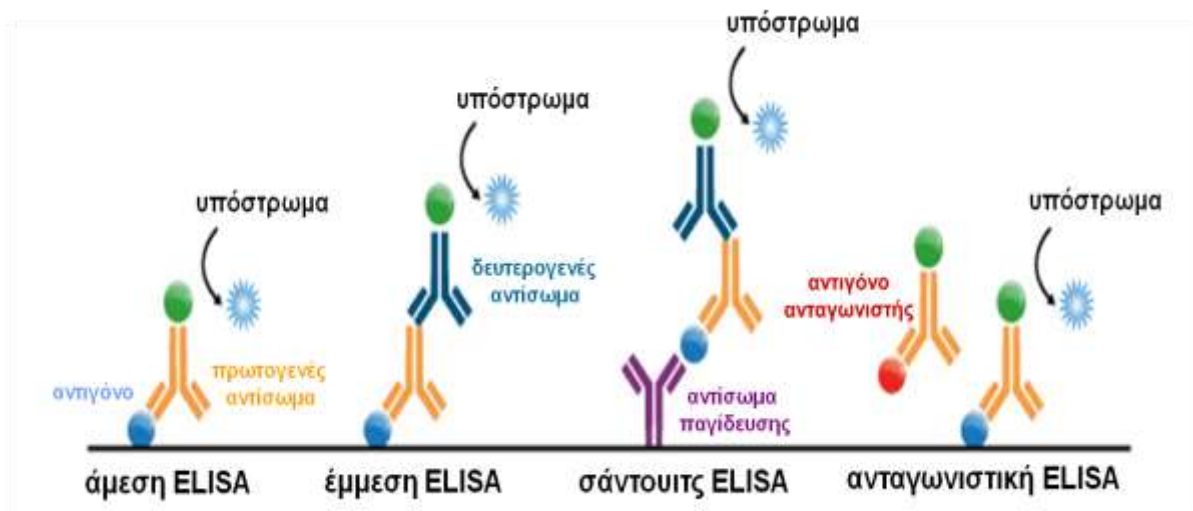
Η ανοσοδοκιμασία ELISA περιγράφηκε για πρώτη φορά πριν από 43 χρόνια (Engvall and Perlmann, 1971) και, πλέον, αποτελεί μία από τις πιο βασικές μεθόδους ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών μέσα σε πολύπλοκα μείγματα. Συγκεκριμένα, επιτρέπει την ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων, ακινητοποιημένων σε μικροπλάκα, χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα. Η τεχνική αυτή έχει ποικίλες εφαρμογές, κυρίως στην ιατρική για την ανίχνευση δεικτών σε ένα μεγάλο φάσμα νόσων, αντισωμάτων ή αντιγόνων στον ορό του αίματος, στη βιομηχανία τροφίμων για τον εντοπισμό αλλεργιογόνων στα τρόφιμα αλλά και στην τοξικολογία.

Τρεις κύριες μέθοδοι αποτελούν τη βάση για όλες τις ELISA: η άμεση, η έμμεση και η σάντουιτς (sandwich). Και τα τρία αυτά συστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποτελέσουν τη βάση μίας ομάδας δοκιμασιών που ονομάζονται ανταγωνιστικές ELISA (**Εικόνα 1.8**). Παρά το γεγονός ότι πολλές παραλλαγές της ELISA έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται σε διαφορετικές εφαρμογές, όλα εξαρτώνται από τα ίδια βασικά στοιχεία: (1) την άμεση ή έμμεση ακινητοποίηση των αντιγόνων στην επιφάνεια των φρεατίων της μικροπλάκας, (2) την προσθήκη διαλύματος κορεσμού για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης, (3) την επώαση του αντιγόνου με ειδικά αντισώματα που προσδένονται με υψηλή συγγένεια σε αυτό και (4) την ανίχνευση του παραγόμενου σήματος.

Η άμεση ELISA μπορεί να θεωρηθεί ως η απλούστερη μορφή ELISA. Το αντιγόνο, που συνήθως είναι μία πρωτεΐνη, συνδέεται στη στερεά φάση με παθητική προσρόφηση. Μετά από πλύση προς απομάκρυνση οποιασδήποτε περίσσειας αντιγόνου ή άλλων συστατικών, προστίθενται τα σημασμένα με ένζυμο αντισώματα και επωάζονται προκειμένου να προσδεθούν στο αντιγόνο. Ακολουθεί η προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος/χρωμογόνου για το συγκεκριμένο ένζυμο, ώστε να αναπτυχθεί χρωματική αντίδραση μέσω ενζυμικής κατάλυσης. Η αντίδραση αφήνεται να εξελιχθεί για ορισμένη χρονική περίοδο προς ανάπτυξη χρώματος, το οποίο ποσοτικοποιείται με τη χρήση φασματοφωτομέτρου ανάγνωσης. Η άμεση ELISA έχει σοβαρούς περιορισμούς, όταν χρησιμοποιείται σε αυτή τη μορφή.

Το έμμεσο σύστημα είναι παρόμοιο με το άμεσο, ως προς την απ' ευθείας σύνδεση του αντιγόνου στη στερεά φάση, η οποία ακολουθείται από προσθήκη των αντισωμάτων (αντισώματα ανίχνευσης). Ωστόσο, τα αντισώματα που προστίθενται δεν είναι σημασμένα με ένζυμο, αλλά τα ίδια στοχεύονται από δευτερογενή αντισώματα σημασμένα με ένζυμο. Τέτοια αντισώματα παράγονται εναντίον των σταθερών περιοχών των ανοσοσφαιρινών του είδους του οργανισμού στον οποίο έχουν παραχθεί τα αντισώματα ανίχνευσης.

Η σάντουιτς ELISA μπορεί να διαιρεθεί σε δύο συστήματα: την άμεση και την έμμεση. Η άμεση περιλαμβάνει την παθητική προσκόλληση των αντισωμάτων στη στερεά φάση. Τα αντισώματα (αντισώματα παγίδευσης, capturing antibodies) δεσμεύουν το αντιγόνο, το οποίο ανιχνεύεται με την προσθήκη σημασμένων με ένζυμο δεύτερων αντισωμάτων. Το δεύτερο αντίσωμα μπορεί να είναι ίδιο όπως εκείνο που χρησιμοποιείται για τη δέσμευση του αντιγόνου ή διαφορετικό, όσον αφορά τη ζωϊκή πηγή ή το είδος στο οποίο παρήχθη. Τα αντιγόνα πρέπει να έχουν τουλάχιστον δύο αντιγονικές θέσεις, αφού και τα δύο αντισώματα πρέπει να δεσμευτούν. Στην έμμεση σάντουιτς ELISA, τα αντισώματα παγίδευσης συνδέονται με το αντιγόνο, αλλά τα αντισώματα ανίχνευσης δεν είναι σημασμένα με ένζυμο. Η ανίχνευσή τους γίνεται με την προσθήκη επιπλέον ειδικού αντισώματος (τριτογενές) σημασμένου με ένζυμο.



Εικόνα 1.8. Τύποι μεθόδων ELISA. Στην άμεση ELISA, ακινητοποιείται το αντιγόνο και προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα συζευγμένο με ένζυμο. Στην έμμεση ELISA, το πρωτογενές αντίσωμα δεν είναι σημασμένο, αλλά σημαίνεται με ένζυμο το δευτερογενές αντίσωμα, που αναγνωρίζει το πρωτογενές. Στη σάντουιτς ELISA, το αντιγόνο που πρόκειται να μετρηθεί δεσμεύεται μεταξύ ενός ζεύγους αντισωμάτων, των αντισωμάτων σύλληψης/παγίδευσης και ανίχνευσης. Τέλος, στην ανταγωνιστική ELISA, το προς μέτρηση αντιγόνο ανταγωνίζεται με ένα δεύτερο αντιγόνο για τη δέσμευση στο αντίσωμα.

Μία τροποποιημένη μεθοδολογία της ELISA είναι μέσω ανταγωνιστικής δέσμησης. Τα βήματα για τη συγκεκριμένη ELISA είναι διαφορετικά. Μη σημασμένο αντίσωμα επώαζεται παρουσία του αντιγόνου του (δείγμα). Τα συνδεδεμένα σύμπλοκα αντισώματος/αντιγόνου, στη συνέχεια, προστίθενται σε μικροπλάκα που φέρει δεσμευμένο αντιγόνο. Όσο περισσότερο αντιγόνο υπάρχει στο δείγμα, τόσο περισσότερα συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος σχηματίζονται και έτσι, υπάρχουν λιγότερα ελεύθερα αντισώματα να συνδεθούν με το αντιγόνο του φρεατίου. Ακολούθως, προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο είναι ειδικό για το πρωτογενές και συζευγμένο με ένζυμο. Κάποιες ανταγωνιστικές ELISA περιλαμβάνουν σημασμένα με ένζυμο αντιγόνα αντί αντισώματα. Το σημασμένο αντιγόνο ανταγωνίζεται με το αντιγόνο του δείγματος (μη σημασμένο) για τη σύνδεση στο πρωτογενές αντίσωμα. Όσο λιγότερο αντιγόνο υπάρχει στο δείγμα, τόσο περισσότερο σημασμένο αντιγόνο παραμένει προσδεδεμένο στο φρεάτιο και τόσο ισχυρότερο είναι το σήμα.

1.5.2. Ανοσοδοκιμασίες για την προθυμοσίνη α

Από τη στιγμή της απομόνωσης της προΤα, έχουν σχεδιαστεί πολυάριθμες ανοσοδοκιμασίες στην προσπάθεια ανίχνευσης και προσδιορισμού των επιπέδων της σε ιστούς και βιολογικά υγρά. Οι πρώτες ανοσοδοκιμασίες ήταν κυρίως RIA, οι οποίες στην πορεία αντικαταστάθηκαν από ELISA και αφορούσαν την ανίχνευση τόσο της ακέραιης πρωτεΐνης όσο και διαφόρων θραυσμάτων της. Αν και έχουν παραχθεί μονοκλωνικά αντισώματα για την προΤα (Sukhacheva et al., 2002), στην πλειονότητα των δοκιμασιών χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού ή όρνιθας, τα οποία παρήχθησαν μετά από ανοσοποίηση με την ακέραιη προΤα (Klimentzou et al., 2006; Tzai et al., 2006; Jou et al., 2013), με την Τα1 (Haritos and Horecker, 1985; Yialouris et al., 1988; Dominquez et al., 1993; Loidi et al., 1997; Moody et al., 2000; Klimentzou et al., 2008) ή καρβοξυτελικά θραύσματά της (Tsitsiloni et al., 1994; Costopoulou et al., 1998; Klimentzou et al., 2008) (Πίνακας 1.4).

Για την επίτευξη επαρκούς τίτλου αντισωμάτων, χρησιμοποιήθηκαν πεπτίδια συζευγμένα με αιμοκυανίνη πεταλίδας (keyhole limpet hemocyanin, KLH) για τους εμβολιασμούς, γιατί, γενικά, η προΤα παρουσιάζει χαμηλή ανοσογονικότητα, λόγω της ιδιόμορφης αμινοξικής της σύστασης, της έλλειψης δευτεροταγούς/τριτοταγούς δομής, καθώς και του όξινου χαρακτήρα της (Klimentzou et al., 2006). Παρ' όλα αυτά, οι ανοσοδοκιμασίες που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα για τον ποσοτικό προσδιορισμό της προΤα είναι ειδικές και αρκετά ευαίσθητες, ώστε να προσδιορίσουν τα επίπεδα του πολυπεπτιδίου σε εκχυλίσματα ιστών και βιολογικά υγρά. Η καλύτερη ευαισθησία των RIA για την προΤα ήταν 0,08 ng/mL (Dominquez et al.,

1993). Οι ELISA για την προΤα έδειξαν όριο ανίχνευσης 1,5 ng/mL εκχυλίσματος ιστού (Loidi et al., 1997), 10 ng/mL ορού (Costopoulou et al., 1998) και 1 ng/mL ούρων (Tzai et al., 2006), αντίστοιχα. Η πιο πρόσφατη από τις ELISA που αναπτύχθηκαν ήταν και η πιο ευαίσθητη, καθώς ήταν σε θέση να ανιχνεύσει έως και 0,036 ng προΤα/mL πλάσματος (Jou et al., 2013).

Πίνακας 1.4. Ανοσοδοκιμασίες που έχουν αναπτυχθεί για την προΤα και τα θραύσματά της.

Ανοσοδοκιμασία	Ανοσοδραστικό Υλικό	Βιβλιογραφία
RIA	προΤα, Τα1	Haritos and Horecker, 1985
RIA	προΤα, Τα1	Yialouris et al., 1988
RIA	προΤα, Τα1	Dominguez et al., 1993
RIA	προΤα(90-109)	Tsitsiloni et al., 1994
RIA	Τα1	Moody et al., 2000
ELISA	προΤα, Τα1	Loidi et al., 1997
ELISA	προΤα, προΤα(87-109), προΤα(101-109)	Costopoulou et al., 1998
ELISA	προΤα	Klimentzou et al., 2006
ELISA	προΤα	Tzai et al., 2006
ELISA	προΤα, Τα1, προΤα(87-109), προΤα(101-109)	Klimentzou et al., 2008
ELISA	προΤα, Τα1	Jou et al., 2013

1.5.3. Οι ανοσοδοκιμασίες στη διάγνωση σοβαρών λοιμώξεων - πεπτίδια ως βιοδείκτες σήψης

Η μεθοδολογία των ELISA έχει βρει ευρεία εφαρμογή στον τομέα των λοιμώξεων, καθώς η ανάγκη εύρεσης νέων βιοδεικτών προς έγκαιρη διάγνωση μίας λοίμωξης, που δυνητικά μπορεί να οδηγήσει σε σήψη και πολυοργανική ανεπάρκεια, είναι επιτακτική. Η σήψη αποτελεί ένα κλινικό σύνδρομο με σύνθετους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς και είναι σημαντικό αίτιο νοσηρότητας και θνητότητας στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ). Οι κατευθυντήριες οδηγίες της τελευταίας δεκαετίας πάνω στο θέμα αυτό, αναγνώρισαν την ανάγκη για πρόωπη αναγνώριση και αντιμετώπιση των σηπτικών ασθενών, που συμπεριλαμβάνει και τη χορήγηση κατάλληλων αντιβιοτικών. Έτσι, η ανεύρεση νέων βιοδεικτών, οι οποίοι είτε από μόνοι τους, είτε με τη συμμετοχή και άλλων δεικτών σε πολυπαραγοντικά μοντέλα θα εξασφαλίζουν την έγκαιρη αναγνώριση και θα υποδεικνύουν

τη στρατηγική αντιμετώπισης των ασθενών αυτών, αποτελεί μία από τις σύγχρονες προκλήσεις της εντατικολογίας. Η σήψη είναι δύσκολο να διαγνωστεί με σαφήνεια, γιατί οι κλινικές της εκδηλώσεις εμφανίζουν ομοιότητες με μη φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως τα αυτοάνοσα νοσήματα, το τραύμα, η αντίδραση σε μετάγγιση αίματος, κλπ. Πολλοί από τους παραδοσιακούς δείκτες λοίμωξης δε διακρίνονται για την ειδικότητά τους. Ο αριθμός των ουδετερόφιλων και η θερμοκρασία του σώματος μπορεί να είναι υψηλά, φυσιολογικά ή χαμηλά, ενώ τα επίπεδα της CRP, τα οποία αντανακλούν μία οξείας φάσης ηπατική αντίδραση, μπορεί να παραμένουν φυσιολογικά. Για παράδειγμα, υψηλή θερμοκρασία σώματος μπορεί να είναι αποτέλεσμα τραυματισμού, εγχείρησης, μετάγγισης αίματος, ακόμα και χορήγησης φαρμάκων (Bloos and Reinhart, 2014).

Από τους καινούριους βιοδείκτες σήψης ξεχωρίζει ο ιδιαίτερα υποσχόμενος βιοδείκτης, προκαλσιτονίνη. Η καλσιτονίνη είναι ορμόνη, η δράση της οποίας αποκρυπτογραφήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1960 και εκκρίνεται από τα C-κύτταρα του θυρεοειδούς αδένου, ρυθμίζοντας τα επίπεδα ασβεστίου στο πλάσμα (Muller and Becker, 2001). Στα τέλη της ίδιας δεκαετίας, η καλσιτονίνη εντοπίστηκε σε μεγάλες ποσότητες σε ασθενείς με μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς και μέχρι σήμερα αποτελεί τον κλασικό δείκτη ανίχνευσης και παρακολούθησης της νεοπλασίας αυτής. Το 1975, εκφράστηκε η άποψη ότι η καλσιτονίνη προέρχεται από μεγαλύτερη πρόδρομη πρωτεΐνη, την προκαλσιτονίνη, αλλά παραδόξως, χρειάστηκαν σχεδόν 20 χρόνια για το συσχετισμό της προκαλσιτονίνης με σοβαρές συστηματικές βακτηριακές λοιμώξεις (Assicot et al., 1993). Λίγα χρόνια αργότερα χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση των σηπτικών ασθενών, καθώς και για την αιτιολογική διαφορική τους διάγνωση (Karzai et al., 1997).

Η προκαλσιτονίνη είναι ένα μεγάλο μοριακού βάρους πεπτίδιο 116 αμινοξέων αποτελούμενο από τρία μικρότερα, τα οποία ανευρίσκονται στον ορό φυσιολογικών ατόμων. Το αποτελούμενο από 33 αμινοξέα κεντρικό μέρος της προκαλσιτονίνης μετατρέπεται τελικά στην ενεργό μορφή της καλσιτονίνης. Εκτός από τη συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση στην οποία έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του υπεύθυνου για την προκαλσιτονίνη γονιδίου στο χρωμόσωμα 11, τα πρόδρομα αυτά μόρια της καλσιτονίνης αυξάνονται και σε διάφορες άλλες κλινικές καταστάσεις. Η προκαλσιτονίνη διαθέτει συγκεκριμένα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά τα οποία είναι απαραίτητα για τον ορισμό των βιολογικών δεικτών, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συστηματική βάση. Έτσι, μόλις τέσσερις ώρες μετά από τη χορήγηση TNF-α ή IL-6 στους ασθενείς, τα επίπεδα της προκαλσιτονίνης αυξάνονται στο πλάσμα, σημειώνοντας τις μέγιστες τιμές τους στις οκτώ ώρες (Nijsten et al., 2000). Επίσης, αποτελεί ένα σχετικά σταθερό μόριο το οποίο παραμένει σε υψηλά επίπεδα για πολλές

ημέρες και επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα, όταν ο εκλυτικός παράγοντας πάψει να υφίσταται (Christ-Crain and Muller, 2008). Οι διαθέσιμες σήμερα συσκευές για τη μέτρηση των τιμών της προκαλσιτονίνης παρέχουν τα αποτελέσματα σε 30 λεπτά έως και τρεις ώρες, ανάλογα με την ποσοτική ή ημιποσοτική μέτρηση του μορίου. Παρόλα αυτά, απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός μελετών, ώστε η προκαλσιτονίνη να καθιερωθεί ως ένας ανεξάρτητος βιοδείκτης σήψης, ο οποίος δε θα αυξάνεται σε μη σηπτικές καταστάσεις.

Πέρα από τον προσδιορισμό των επιπέδων της προκαλσιτονίνης και των παραδοσιακών δεικτών φλεγμονής, έχουν αναπτυχθεί ειδικές ELISA, οι οποίες προσδιορίζουν με ακρίβεια στον ορό/πλάσμα του αίματος τα επίπεδα κυτταροκινών, υποδοχέων και άλλων παραγόντων που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο. Αναλυτικά, έχει αναπτυχθεί ELISA με την οποία προσδιορίστηκαν αυξημένα επίπεδα TNF-α σε σηπτικούς ασθενείς και συσχετίστηκαν με μικροαγγειακή ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και επιδείνωση της σήψης (Liang et al., 2014). Σε άλλη μελέτη προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του διαλυτού υποδοχέα του TRAIL (sTRAIL), όπου φάνηκε ότι χαμηλά επίπεδα sTRAIL στο πλάσμα συνδέονται με ανοσολογική παράλυση και υψηλό κίνδυνο θνησιμότητας σε ασθενείς με σηπτικό shock (Tian et al., 2013). Επιπλέον, μέσω ELISA, βρέθηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις HMGB1 (Karlsson et al., 2008), καθώς και της διαλυτής μορφής του υποδοχέα της μαννόζης (sMR) (Rødgaard-Hansen et al., 2014) στον ορό ασθενών με σοβαρή σήψη.

1.6. Σκοπός

Η προΤα είναι πυρηνική πρωτεΐνη που εμπλέκεται σε κυτταρικές διεργασίες άρρηκτα συνδεδεμένες με την ανάπτυξη, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση. Κατά την απόπτωση μάλιστα, η προΤα υπόκειται σε θραύση από τις ενεργοποιημένες κασπάσες στο D⁹⁹ και το προΤα(1-99) παραμένει στο κυτταρόπλασμα. Συγχρόνως, παρουσιάζει πλειοτροπική εξωκυτταρική δράση, ενισχύοντας τις δραστηριότητες κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Το ανοσοδραστικό της κέντρο είναι το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) και ο μηχανισμός ανοσολογικής δράσης τόσο της προΤα όσο και του προΤα(100-109), μεσολαβείται από τον TLR-4.

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν διπλός:

- Η διερεύνηση της επίδρασης του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) και της ακέραιης προΤα σε βασικές λειτουργίες κυττάρων του φυσικού σκέλους της ανοσίας που εκφράζουν TLR-4. Συγκεκριμένα, η μελέτη εστιάστηκε σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα περιφερικού αίματος ανοσοεπαρκών (υγιών δοτών) και ανοσοανεπαρκών (ασθενών με καρκίνο του μαστού) ατόμων.
- Η ανάπτυξη και αξιολόγηση ανοσοδοκιμασίας (ELISA) με τη χρήση αντισωμάτων υψηλής ειδικότητας, η οποία θα επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) εξωκυτταρικά, προκειμένου να διαλευκανθεί ο τρόπος δράσης του. Συγκεκριμένα, το δεκαπεπτίδιο προσδιορίστηκε *in vitro*, σε υπερκείμενα κυττάρων που οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο, *in vivo*, σε μοντέλα βακτηριακών λοιμώξεων (κατάσταση μαζικού αποπτωτικού θανάτου) σε ποντίκια και *ex vivo*, σε ανθρώπινους ορούς από διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Η μελέτη της δράσης του προΤα(100-109) και της προΤα σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα θα συνεισφέρει στην περαιτέρω ανάλυση των μηχανισμών επαγωγής ανοσοαπάντησεων από τα πεπτίδια, και συνεπώς θα διευκολύνει την ένταξή τους σε κλινικά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας. Παράλληλα, η μελέτη των εξωκυτταρικών επιπέδων του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) θα συμβάλλει στη συσχέτιση των δύο ρόλων της προΤα, ενώ το δεκαπεπτίδιο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και ως βιοδείκτης σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με μαζική κυτταρική απόπτωση.

2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται οι μέθοδοι/τεχνικές που ακολουθήθηκαν, καθώς και τα αναλώσιμα/όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην κάθε πειραματική διαδικασία. Ο **βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός** που είναι απαραίτητος για τη διεξαγωγή όλων σχεδόν των πειραματικών διαδικασιών περιλαμβάνει τα παρακάτω:

- Πιπέττες μεταβλητού όγκου Pipetman 2, 20, 200 και 1000 μL (Gilson Inc, WI, USA)
- Ρύγχι πιπετών 10, 200 και 1000 μL (Greiner, Bio-one, Germany)
- Πλαστικές πιπέττες μίας χρήσης 1, 2, 5, 10 και 25 mL (Greiner, Bio-one)
- Σωληνάρια φυγοκέντρησης τύπου falcon 15 και 50 mL (Greiner, Bio-one)
- Επωαστικός κλίβανος 37°C και 5% CO₂ (Sanyo Electric Co, Japan)
- Φυγόκεντρος ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας με αποσπώμενες κεφαλές (Jouan, DJB Labcare, UK)
- Θάλαμος νηματικής ροής (Laminar Flow) BH-EN-2004 (Faster, Italy)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Novex) και ανεστραμμένο μικροσκόπιο (Euromex) (Holland)

Βασικό υλικό των πειραμάτων της παρούσας διατριβής αποτελεί η **προΤα** και τα **πεπτιδικά της θραύσματα**, με κύριο το δεκαπεπτίδιο **προΤα(100-109)**. Η πρωτεΐνη παραχωρήθηκε σε καθαρή μορφή από τον Καθηγητή Wolfgang Voelter, ενώ τα πεπτίδια της συντέθηκαν από τον Καθηγητή Hubert Kalbacher (Πανεπιστήμιο Tübingen, Γερμανία). Συγκεκριμένα, τα πεπτίδια συντέθηκαν χρησιμοποιώντας τυπική Fmoc/tBu χημεία, με το TBTU ως αντιδραστήριο σύζευξης, σε πολλαπλό «peptide synthesizer» Syro II (MultiSynTech, Witten, Germany), καθαρίστηκαν με RP-HPLC ($\geq 95\%$) και η ταυτότητά τους επιβεβαιώθηκε με φασματομετρία μάζας (MS). Αναλυτικά, τα πεπτίδια που συντέθηκαν είναι τα εξής:

- προΤα(100-109) (TKKQKTDEDD)
- πεπτίδιο scrambled (KETDKDKTDQ), που φέρει την ίδια αμινοξική σύσταση με το προΤα(100-109), αλλά σε διαφορετική πρωτοδιάταξη, και έχει την ίδια οξύτητα με το προΤα(100-109)
- TKKQKTDEDD συζευγμένο με κυστεΐνη [Cys-προΤα(100–109)]
- βιοτίνη-6 αμινοεξανοϊκό οξύ-TKKQKTDEDD [Biotin-Ahx-προΤα(100–109)]
- κυστεΐνη-β αλανίνη-β αλανίνη-TKKQKTDEDD [Cys-βAla-βAla-προΤα(100–109)]
- πεπτίδια-τμήματα του προΤα(100-109) που στερούνται αμινο- ή καρβοξυ-τελικών αμινοξικών καταλοίπων

2.1. Καλλιέργεια και κρυοσυντήρηση κυτταρικών σειρών

Ο όρος καλλιέργεια κυττάρων αφορά τη διαδικασία κατά την οποία κύτταρα αναπτύσσονται υπό ελεγχόμενες συνθήκες, μακριά από το φυσικό τους περιβάλλον. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα των θηλαστικών χρειάζονται θερμοκρασία 37°C και 5% CO₂ για την ομαλή ανάπτυξή τους εντός επωαστικού κλιβάνου. Ο πιο σημαντικός παράγοντας στα συστήματα καλλιέργειας είναι το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης, το οποίο περιέχει θρεπτικά συστατικά, αυξητικούς παράγοντες και αντιβιοτικά για την αποφυγή μολύνσεων.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- RPMI-1640 (Lonza, Germany)
- Πρότυπο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco's, χωρίς Ca²⁺, Mg²⁺ (DPBS) (Lonza)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 1M HEPES (Lonza)
- Διάλυμα αντιβιοτικών 10.000 U/mL Πενικιλίνη και 10.000 µg/mL Στρεπτομυκίνη (Lonza)
- Διάλυμα αντιβιοτικού Γενταμυκίνη 10 mg/mL (Lonza)
- Διάλυμα 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης (Sigma-Aldrich, Germany)
- Διάλυμα θερμικά απενεργοποιημένου (56°C, 30 λεπτά) ορού από έμβρυο βοδιού (FBS, Lonza)
- Διάλυμα FBS-20% διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO, Sigma-Aldrich) (διάλυμα FBS-DMSO)
- Διάλυμα DPBS-2 mM αιθυλοδιαμινοτετραφθορικού οξέος (EDTA, Sigma-Aldrich) (διάλυμα DPBS-EDTA)
- Πλαστικές φιάσκες καλλιέργειας με φίλτρο (Greiner, Bio-One)
- Σωληνάρια κρυοσυντήρησης 2 mL (cryovials, Greiner, Bio-One)
- Υδατόλουτρο
- Καταψύκτης θερμοκρασίας -20°C (Whirlpool)
- Καταψύκτης θερμοκρασίας -80°C (Forma Scientific)
- Δοχείο αζώτου

Πρωτόκολλο εργασίας

Στις κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιείται πλήρες θρεπτικό υλικό που παρασκευάζεται ως εξής: σε μπουκάλι RPMI-1640 προστίθενται διαδοχικά τα παρακάτω αντιδραστήρια, ώστε το τελικό διάλυμα να περιέχει την ακόλουθη σύσταση:

- 10 mM Hepes (ρυθμιστικός παράγοντας για τη διατήρηση φυσιολογικού pH, παρά τις αλλαγές στη συγκέντρωση του CO₂ που παράγεται από την κυτταρική αναπνοή)
- 100 U/mL Πενικιλίνη (β-λακτάμη που αναστέλλει το σχηματισμό της πεπτιδογλυκάνης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος)
- 100 μg/mL Στρεπτομυκίνη και 25 μg/mL Γενταμυκίνη (αμινογλυκοσίδες, αναστολείς της πρωτεϊνικής σύνθεσης)
- 50 μM β-μερκαπτοαιθανόλη (αναγωγικός παράγοντας που προλαμβάνει τη δημιουργία τοξικών επιπέδων ριζών οξυγόνου)
- 10% FBS (συμπλήρωμα ανάπτυξης με υψηλή περιεκτικότητα σε εμβρυϊκούς αυξητικούς παράγοντες)

Ανακαλλιέργεια κυττάρων:

Γενικά, η ανακαλλιέργεια επιτελείται ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ανάλογα με το είδος της κυτταρικής σειράς, έτσι ώστε να διασφαλίζεται ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων για τα πειράματα, αλλά και η ομαλή ανάπτυξή τους. Όταν αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων σε σημείο που παρατηρείται έλλειψη χώρου, αναστέλλεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και τροποποιούνται οι μεταβολικές διεργασίες, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται τοξικά παραπροϊόντα. Οι αιωρούμενες κυτταρικές σειρές, όπως οι λευχαιμικές, διατηρούνται σε πυκνότητα $0,5-1 \times 10^6$ κύτταρα/mL. Κάθε 2-3 ημέρες και έπειτα από παρατήρηση στο ανεστραμμένο μικροσκόπιο, εκτιμάται η πυκνότητα της καλλιέργειας. Ακολουθεί ήπια ανάδευση προς διάσπαση των κυτταρικών συσσωματωμάτων που έχουν την τάση να αναπτύσσονται και ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό, αφαιρώντας ένα τμήμα από το υπάρχον και αντικαθιστώντας το με φρέσκο. Οι κυτταρικές σειρές οι οποίες προσκολλώνται στην πλαστική επιφάνεια χρειάζονται το επιπλέον βήμα της αποκόλλησής τους πριν την ανακαλλιέργεια. Οι προσκολλώμενες σειρές αφήνονται να αναπτυχθούν μέχρι τα κύτταρα να καλύψουν περίπου το 80% της επιφάνειας της φλάσκας και στη συνέχεια αποκολλώνται. Η αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα είναι δυνατή: α) με μηχανικό τρόπο, β) με ενζυμική δράση και γ) με χημικά μέσα. Στην τελευταία περίπτωση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί διάλυμα DPBS-EDTA ως ένας ήπιος τρόπος αποκόλλησης, καθώς το EDTA

δεσμεύει τα μεταλλικά ιόντα (κυρίως Ca^{2+}) που είναι απαραίτητα για την κυτταρική προσκόλληση. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- 1) Το θρεπτικό υλικό της φλάσκας, το οποίο περιέχει και αιωρούμενα κύτταρα που θεωρούνται νεκρά, απομακρύνεται.
- 2) Προστίθεται μικρή ποσότητα DPBS-EDTA στη φλάσκα προκειμένου να ξεπλυθεί και απορρίπτεται άμεσα.
- 3) Προστίθεται εκ νέου DPBS-EDTA έτσι ώστε να καλυφθεί όλος ο πυθμένας της φλάσκας και η φλάσκα αφήνεται να επωαστεί στους 37°C για 3-5 λεπτά.
- 4) Συλλέγονται τα κύτταρα που έχουν αρχίσει να αποκολλώνται και να επιπλέουν στο DPBS-EDTA και μεταφέρονται σε σωληνάριο φυγοκέντρου που περιέχει θρεπτικό υλικό.
- 5) Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 300xg για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6) Αποχύνεται το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό.
- 7) Το κυτταρικό εναιώρημα μοιράζεται σε νέες φλάσκες καλλιέργειας, οι οποίες τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο.

Κρυοσυντήρηση κυττάρων:

Η διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι δυνατή με την αποθήκευση σε υγρό άζωτο. Για την επιτυχή διατήρησή τους είναι απαραίτητο να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση πριν από την ψύξη. Επίσης, για να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό τους και να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια νερού, καταψύχονται παρουσία του κρυοπροστατευτικού παράγοντα DMSO. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- 1) Συλλέγεται το κυτταρικό εναιώρημα σε σωληνάριο falcon και προσδιορίζεται ο αριθμός και η βιωσιμότητα των κυττάρων (>95%).
- 2) Το σωληνάριο φυγοκεντρείται στα 300xg για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3) Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και προστίθεται στάγδην ίσος όγκος από το διάλυμα FBS-20% DMSO.
- 4) Δείγματα όγκου 1-2 mL με $1-5 \times 10^6$ κύτταρα/mL τοποθετούνται σε cryovials όπου αναγράφονται απαραίτητα το είδος των κυττάρων ή το όνομα της κυτταρικής σειράς, ο αριθμός και η ημερομηνία ψύξης των κυττάρων.
- 5) Τα cryovials τοποθετούνται απευθείας στους -80°C , σε χάρτινο κουτί για τουλάχιστον 24 ώρες, ενώ στη συνέχεια μπορούν να μεταφερθούν στο υγρό άζωτο για μακρά αποθήκευση.

Απόψυξη κυττάρων:

- 1) Το cryovial μεταφέρεται από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο 37°C μέχρι να ρευστοποιηθεί το περιεχόμενό του.
- 2) Το διάλυμα των κυττάρων μεταφέρεται άμεσα σε σωληνάριο φυγοκέντρου που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό και φυγοκεντρείται στα 300xg για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα πρέπει να ξεπλυθούν από το DMSO, το οποίο σε φυσιολογική θερμοκρασία γίνεται τοξικό για αυτά.
- 3) Το υπερκείμενο αποχύνεται, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε φρέσκο πλήρες θρεπτικό υλικό και μεταφέρεται σε φλάσκα καλλιέργειας εντός του επωαστικού κλιβάνου.

2.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της βιωσιμότητας κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Ένας γρήγορος και απλός τρόπος προσδιορισμού του αριθμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων αποτελεί η χρώση τους με κατάλληλες χρωστικές, η πιο γνωστή από τις οποίες είναι το κυανό του τρυπανίου (Trypan blue). Δεδομένου ότι η κυτταρική μεμβράνη είναι εκλεκτικά διαπερατή σε ενώσεις που περνούν στο εσωτερικό του κυττάρου, σε ένα ζωντανό κύτταρο το Trypan blue δεν απορροφάται, ενώ αντίθετα διαπερνά τη μεμβράνη ενός νεκρού κυττάρου. Ως εκ τούτου, τα νεκρά κύτταρα εμφανίζονται με ένα διακριτικό μπλε χρώμα κάτω από το μικροσκόπιο, ενώ τα ζωντανά παραμένουν διαυγή. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου Neubauer, μίας τροποποιημένης αντικειμενοφόρου πλάκας με κατάλληλα επεξεργασμένες και βαθμονομημένες λείες επιφάνειες.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Κυτταρικό εναιώρημα προς μέτρηση
- Διάλυμα κυανού του τρυπανίου (Trypan blue) 0,4% w/v (Sigma-Aldrich)
- Μικροπλάκα καλλιέργειας 96 φρεατίων με πυθμένα σε σχήμα U (Greiner, Bio-One)
- Αιμοκυτταρομετρική αντικειμενοφόρος πλάκα τύπου Neubauer (Sigma-Aldrich)

Πρωτόκολλο εργασίας

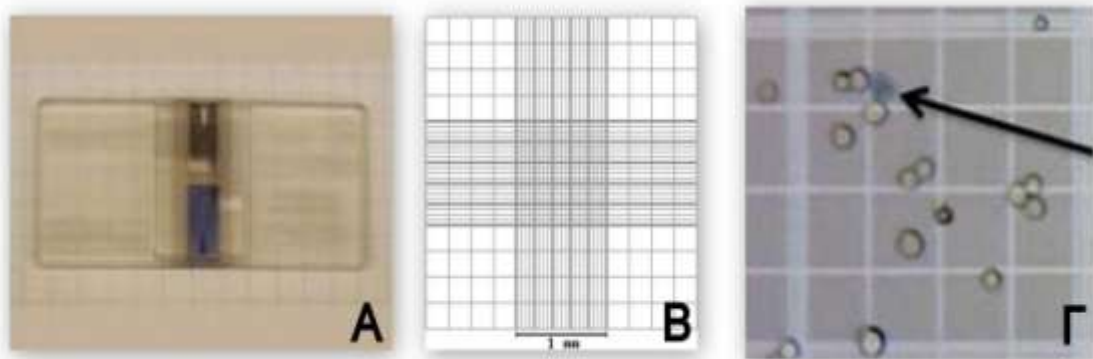
- 1) 20 μL από το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρονται σε φρεάτιο μικροπλάκας καλλιέργειας 96 φρεατίων.
- 2) Προστίθεται γνωστός όγκος Trypan blue στο φρεάτιο και ακολουθεί καλή ανάμιξη. Αν προστεθεί ίσος όγκος χρωστικής, τότε ο λόγος αραίωσης είναι 2. Η επιλογή του όγκου της χρωστικής που προστίθεται εξαρτάται από τον αριθμό των κυττάρων που περιέχεται στο εναιώρημα. Αν εκτιμηθεί οπτικά ότι υπάρχει μεγάλος αριθμός κυττάρων, προστίθεται μεγαλύτερος όγκος χρωστικής, ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη αραίωση και πιο αξιόπιστη μέτρηση.
- 3) Μετά την τοποθέτηση καλυπτρίδας, μεταφέρεται μικρή ποσότητα του κυτταρικού εναιωρήματος στο θάλαμο μέτρησης της πλάκας Neubauer, η οποία με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στη βαθμονομημένη επιφάνεια.
- 4) Ο φακός εστιάζεται στην περιοχή μέτρησης που αποτελείται από κάθετες και οριζόντιες γραμμές και περιέχει εννέα επιμέρους μικρότερες περιοχές, ίσου εμβαδού (1 mm^2) και ίσου όγκου ($0,1 \text{ mm}^3$) (**Εικόνα 2.1**).

- 5) Ακολουθεί μέτρηση όλων των κυττάρων που βρίσκονται σε μία περιοχή όγκου $0,1 \text{ mm}^3$, ενώ παράλληλα καταγράφεται και ο αριθμός όσων κυττάρων είναι μπλε (νεκρά). Για να χρησιμοποιηθεί ένα κυτταρικό εναιώρημα σε πειραματική διαδικασία, θα πρέπει η βιωσιμότητα των κυττάρων του να είναι $>95\%$.

Ο υπολογισμός της % βιωσιμότητας γίνεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ βιωσιμότητα} = \frac{\text{συνολικός αριθμός κυττάρων} - \text{αριθμός νεκρών κυττάρων}}{\text{συνολικός αριθμός κυττάρων}} \times 100$$

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του κυτταρικού εναιωρήματος γίνεται με βάση τον παρακάτω τύπο: C (κύτταρα/mL) = αριθμός κυττάρων (ανά $0,1 \text{ mm}^3$) \times λόγος αραιώσης $\times 10^4$.



Εικόνα 2.1. Πλάκα Neubauer με «φορτωμένο» δείγμα προς μέτρηση (A), η εικόνα του θαλάμου μέτρησης κατά την παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο (B) και κύτταρα μετά από χρώση με Trypan blue, όπου με το μαύρο βέλος διακρίνεται ένα νεκρό κύτταρο (μεγέθυνση 10X) (Γ).

2.3. Απομόνωση λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών από περιφερικό αίμα ανθρώπου

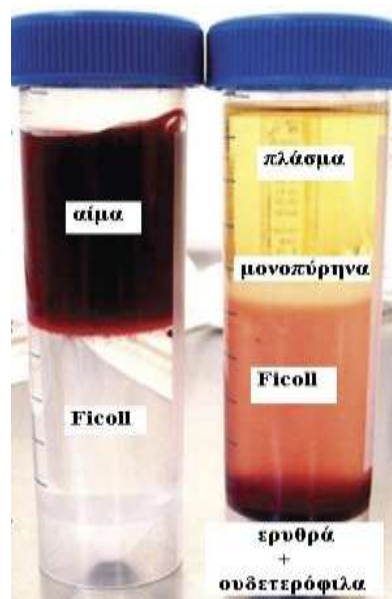
Το ανθρώπινο αίμα αποτελείται από το πλάσμα, μέσα στο οποίο αιωρούνται τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια (κοκκιοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα) και τα αιμοπετάλια. Το Ficoll-HyPaque είναι συνθετική ουσία υψηλού μοριακού βάρους, που δημιουργεί πυκνότητα και ώσμωση τέτοια, ώστε να διαχωρίζονται τα μονοπύρηνια κύτταρα (μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα) από τα υπόλοιπα έμμορφα συστατικά. Οι διάφοροι τύποι κυττάρων λόγω της διαφορετικής πυκνότητας της μάζας τους καθιζάνουν με διαφορετική ταχύτητα. Το Ficoll-HyPaque τοποθετείται στο κάτω μέρος του σωληναρίου και στη συνέχεια το αίμα επιστοιβάζεται προσεκτικά πάνω από αυτό.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Δείγμα αίματος συλλεγμένο σε σωληνάριο ή σε ασκό αιμοδοσίας με αντιπηκτικό
- Διάλυμα διαχωρισμού λεμφοκυττάρων Ficoll-Hypaque (Lonza)
- DPBS
- Ισορροπημένο διάλυμα αλάτων του Hank (Hank's balanced salt solution, HBSS) (Lonza)
- Πλαστικές πιπέττες pasteur (Greiner, Bio-One)
- Μικροπλάκες καλλιέργειας 6 φρεατίων
- Πλαστικές σύριγγες ινσουλίνης
- Διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων (1X): παρασκευάζεται μετά από αραιώση κατά 10 φορές του αρχικού διαλύματος, που αποτελείται από 0,37% w/v EDTA, 8,02% w/v NH_4Cl και 0,84% w/v NaHCO_3 διαλυμένων σε δις απεσταγμένο H_2O

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Σε σωληνάριο falcon τοποθετείται το διάλυμα Ficoll και αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου.
- 2) Επιστοιβάζεται αργά περίπου διπλάσια ποσότητα αίματος και το σωληνάριο φυγοκεντρείται στα 700xg για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς η φυγόκεντρος να φέρει φρένο στη φάση της επιβράδυνσης.
- 3) Μετά τη φυγοκέντρωση, προκύπτουν τα ακόλουθα στρώματα από άνω προς τα κάτω: πλάσμα, μονοπύρηνια (λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα) και τα ερυθροκύτταρα μαζί με τα κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα) σε μορφή ιζήματος (**Εικόνα 2.2**).



Εικόνα 2.2. Ποσότητα περιφερικού αίματος επιστοιβαγμένη σε Ficoll πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) τη φυγοκέντρηση. Μετά τη φυγοκέντρηση, προκύπτουν τέσσερις διακριτές στιβάδες, όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στην εικόνα.

Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων:

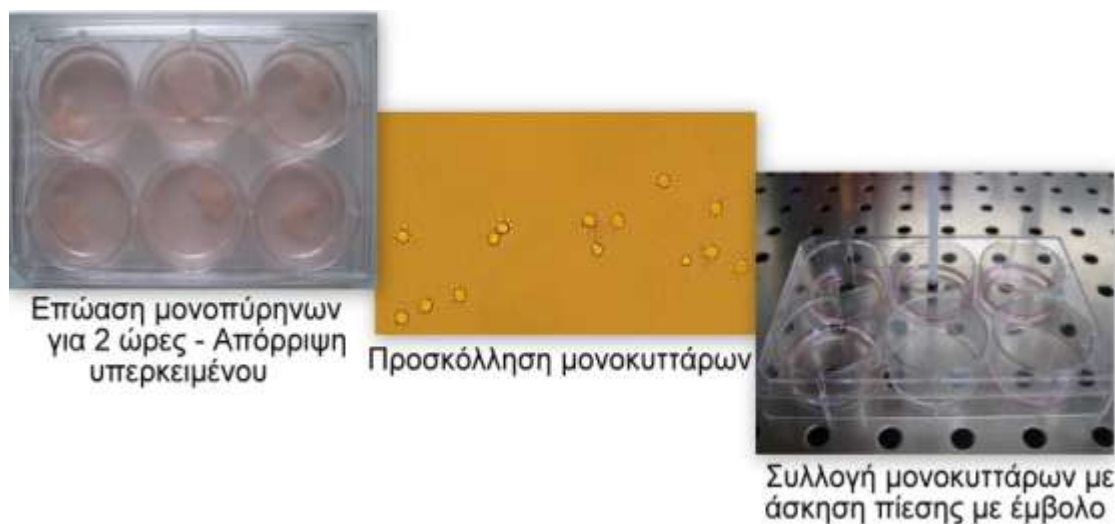
- 1) Συλλέγεται προσεκτικά ο υπόλευκος δακτύλιος των μονοπύρηνων με πιπέττα pasteur και μεταφέρεται σε καινούριο σωληνάριο φυγοκέντρου.
- 2) Προστίθεται στο σωληνάριο περίσσεια διαλύματος DPBS και το σωληνάριο φυγοκεντρείται στα 400xg για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό το βήμα επαναλαμβάνεται 2 φορές ακόμα, ώστε τα κύτταρα να ξεπλυθούν επαρκώς από το Ficoll.
- 3) Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και προσδιορίζεται η συγκέντρωση και η βιωσιμότητά του.

Διαχωρισμός μονοκυττάρων:

Τα μονοκύτταρα μπορούν να διαχωριστούν από τα λεμφοκύτταρα, εάν το κυτταρικό εναιώρημα των μονοπύρηνων κυττάρων επωαστεί σε μικροπλάκα καλλιέργειας για 2 ώρες. Τα μονοκύτταρα προσκολλώνται στο πλαστικό, ενώ τα λεμφοκύτταρα απομακρύνονται με έκπλυση μαζί με το υπερκείμενο (**Εικόνα 2.3**).

- 1) Εναιώρημα μονοπύρηνων κυττάρων που απομονώνεται με Ficoll, με συγκέντρωση 5×10^6 κύτταρα/mL σε RPMI-1640 επιστρώνεται σε μικροπλάκα καλλιέργειας 6 φρεατίων (τελικός όγκος 3 mL/φρεάτιο) και επιάζεται στους 37°C για 2 ώρες.

- 2) Συλλέγεται με προσοχή όλο το υπερκείμενο, που περιέχει τα αιωρούμενα κύτταρα (λεμφοκύτταρα), τα οποία φυγοκεντρώνται και στη συνέχεια είτε χρησιμοποιούνται άμεσα σε πειραματικό πρωτόκολλο, είτε καταψύχονται. Προστίθεται εκ νέου θρεπτικό υλικό σε κάθε φρεάτιο και ακολουθεί ανάδευση με πιπέττα pasteur, αναρροφώντας και απορρίπτοντάς το ήπια, απομακρύνοντας έτσι από τον πυθμένα του φρεατίου τα μη ειδικά προσκολλημένα κύτταρα που τυχόν έχουν απομείνει.
- 3) Η έκπλυση των φρεατίων επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές, ελέγχοντας παράλληλα τη μικροπλάκα σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο και φροντίζοντας στο τέλος να βρίσκονται στον πυθμένα του φρεατίου μόνο τα σταθερά προσκολλημένα κύτταρα (μονοκύτταρα).
- 4) Προστίθεται εκ νέου μικρή ποσότητα θρεπτικού υλικού, τόση ώστε να διαβρέχεται όλος ο πυθμένας του φρεατίου. Με το πίσω μέρος του εμβόλου μίας σύριγγας ινσουλίνης, εφαρμόζεται κυκλικά ελαφρά πίεση σε όλη την επιφάνεια κάθε φρεατίου, προκειμένου να αποκολληθούν τα μονοκύτταρα.
- 5) Το κυτταρικό εναιώρημα συλλέγεται και φυγοκεντρείται στα 400xg για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα επαναιωρείται στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό, προσδιορίζεται η συγκέντρωση/βιωσιμότητά του και τα μονοκύτταρα είναι έτοιμα προς χρήση.



Εικόνα 2.3. Διαδικασία απομόνωσης ανθρώπινων μονοκυττάρων από περιφερικό αίμα. Τα μονοπύρηνια κύτταρα επαΐζονται για 2 ώρες σε θρεπτικό υλικό, με αποτέλεσμα τα μονοκύτταρα να προσκολληθούν στην πλαστική επιφάνεια (μεγέθυνση 40X) και να διαχωριστούν από τα αιωρούμενα λεμφοκύτταρα. Τα μονοκύτταρα, στη συνέχεια, αποκολλώνται μηχανικά.

Απομόνωση κοκκιοκυττάρων (ουδετερόφιλων):

Τα κοκκιοκύτταρα (ή πολυμορφοπύρρηνα) διακρίνονται σε ουδετερόφιλα, βασεόφιλα και ηωσινόφιλα. Τα ουδετερόφιλα αποτελούν το 40-60% των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος, τα βασεόφιλα το 0,5-1% και τα ηωσινόφιλα το 1-4%. Από εδώ και πέρα, θα αναφέρονται ως ουδετερόφιλα, καθώς τα ουδετερόφιλα αποτελούν τον πολυπληθέστερο υποπληθυσμό των κοκκιοκυττάρων. Τα ουδετερόφιλα, λοιπόν, μετά τη φυγοκέντρωση σε Ficoll βρίσκονται ως ίζημα μαζί με τα ερυθροκύτταρα στον πυθμένα του σωληναρίου (**Εικόνα 2.2**) και γι' αυτό για την απομόνωσή τους είναι απαραίτητη η λύση των ερυθρών.

- 1) Σε σωληνάριο falcon των 50 mL προστίθενται 50 mL από το 1X διάλυμα λύσης και 2 mL από το ίζημα ερυθροκυττάρων-κοκκιοκυττάρων.
- 2) Ακολουθεί ήπια ανακίνηση για 10 λεπτά με το χέρι και φυγοκέντρωση στα 250xg για 10 λεπτά στους 4°C.
- 3) Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 10 mL διαλύματος HBSS. Ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρωση (250xg, 10 λεπτά, 4°C) και το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται ακόμα δύο φορές, προκειμένου να ξεπλυθούν καλά τα ουδετερόφιλα.
- 4) Τελικά το ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL HBSS και ακολουθεί προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της βιωσιμότητας των ουδετερόφιλων.

2.4. Έλεγχος της φαγοκυττάρωσης σωματιδίων zymosan

Τα σωματίδια zymosan αποτελούν τμήματα μεμβρανών του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* και χρησιμοποιούνται με σκοπό να προσομοιάσουν την κατάσταση όπου τα φαγοκύτταρα έχουν να «αντιμετωπίσουν» μολύνσεις από το μύκητα. Επίσης, έχει βρεθεί ότι τα φαγοκύτταρα ενεργοποιούνται από διάφορα εξωκυττάρια σήματα όπως είναι τα φορμυλοπεπτίδια που προέρχονται από βακτηριακές πρωτεΐνες ή κατεστραμμένα κύτταρα. Το πιο γνωστό φορμυλοπεπτίδιο είναι το συνθετικό τριπεπτίδιο με αλληλουχία N-φορμυλ-μεθειονίνη-λευκίνη-φαινυλαλανίνη (N-formyl-Met-Leu-Phe), fMLP, για το οποίο έχουν ταυτοποιηθεί ειδικοί υποδοχείς στην πλασματική μεμβράνη των φαγοκυττάρων. Η αλληλεπίδραση του fMLP με τον υποδοχέα του ενεργοποιεί πολλαπλά μονοπάτια μεταγωγής σήματος, τα οποία αποτελούν τη φυσιολογική απάντηση σε βακτηριακή μόλυνση και ιστική βλάβη. Εξαιτίας της αποδεδειγμένης επαγωγής της φαγοκυτταρικής ικανότητας από το fMLP, κύτταρα που επωάζονται με αυτό αποτελούν τους θετικούς μάρτυρες των δοκιμασιών.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Ζελατίνη (gelatin, Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα HBSS εμπλουτισμένο με 0,1% ζελατίνη (HBSS-g)
- Διάλυμα προΤα σε HBSS με συγκέντρωση 2 µg/mL
- Διάλυμα προΤα(100-109) σε HBSS με συγκέντρωση 0,25 µg/mL
- Διάλυμα πεπτιδίου scrambled σε HBSS με συγκέντρωση 0,25 µg/mL
- Διάλυμα fMLP (Sigma-Aldrich) σε HBSS με συγκέντρωση 5 µM
- Διάλυμα σωματιδίων zymosan 3% (Sigma-Aldrich) σε HBSS-g
- Διάλυμα παραφορμαλδεΰδης (PFA, Sigma-Aldrich) σε HBSS με τελική συγκέντρωση 4%

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Γίνεται απομόνωση των ουδετερόφιλων ή των μονοκύτταρων όπως ακριβώς περιγράφηκε προηγουμένως (§ 2.3) και ρυθμίζεται η συγκέντρωσή τους με ρυθμιστικό διάλυμα HBSS-g στα 5×10^6 κύτταρα/mL.
- 2) Σε σωληνάρια Eppendorf που ήδη περιέχουν 6,7 µL εναιωρήματος σωματιδίων zymosan, προστίθενται 80 µL από τα κυτταρικά εναιωρήματα ουδετερόφιλων ή μονοκυττάρων. Τα κύτταρα επωάζονται σε σκέτο θρεπτικό υλικό (αρνητικός μάρτυρας) ή σε θρεπτικό υλικό που περιέχει 5 µM fMLP (θετικός μάρτυρας), 200

ng/mL προΤα, 25 ng/mL προΤα(100-109) ή 25 ng/mL πεπτιδίου scrambled σε τελικό όγκο 110 μ L. Οι συγκεντρώσεις των πεπτιδίων και οι χρόνοι επώασης καθορίστηκαν μετά από δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενες κινητικές μελέτες.

- 3) Τα δείγματα επωάζονται για 90 λεπτά στους 37°C και μονιμοποιούνται με διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης για 10 λεπτά στους 4°C.
- 4) Ακολουθεί φυγοκέντρηση (300xg, 5 λεπτά, 4°C), απορρίπτονται τα υπερκείμενα και προστίθενται 50 μ L HBSS-g σε κάθε ίζημα.
- 5) Μετρώνται στο οπτικό μικροσκόπιο τουλάχιστον 100 κύτταρα ανά δείγμα και σημειώνονται όσα έχουν φαγοκυτταρώσει ένα τουλάχιστον σωματίδιο zymosan (θετικά κύτταρα, **Εικόνα 2.4**). Τα ουδετερόφιλα έχουν μέση διάμετρο 12 μ m, ενώ τα σωματίδια zymosan 3 μ m. Οπότε, ένα ουδετερόφιλο μπορεί να φαγοκυτταρώσει μέχρι και 4 σωματίδια zymosan. Τα συσσωματώματα κυττάρων δεν υπολογίζονται.



Εικόνα 2.4. Ουδετερόφιλο από περιφερικό αίμα ανθρώπου το οποίο έχει φαγοκυτταρώσει ένα σωματίδιο zymosan, όπως φαίνεται στο οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση 40X). Το κύτταρο περιβάλλεται από σωματίδια zymosan, τα οποία δε φαγοκυτταρώθηκαν και παραμένουν στον εξωκυττάριο χώρο.

2.5. Έλεγχος της ενδοκυτταρικής παραγωγής υπεροξειδικού ανιόντος - Δοκιμασία αναγωγής του κυανού του τετραζολίου (nitroblue tetrazolium, NBT)

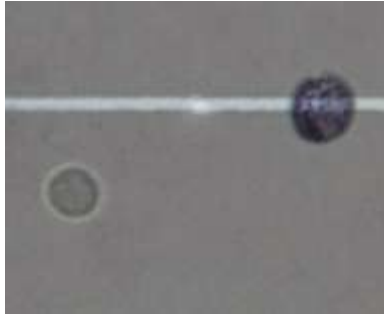
Η ενδοκυτταρική παραγωγή υπεροξειδικού ανιόντος ($\cdot\text{O}_2^-$) ονομάζεται και αναπνευστική έκρηξη. Το NBT είναι μία κίτρινη, υδατοδιαλυτή χρωστική, η οποία έχει την ικανότητα να αντιδρά με τα κυτταρικά υπεροξειδικά ιόντα προς σχηματισμό παραγώγων φορμαζανίου στο εσωτερικό των κυττάρων, τα οποία έχουν μπλε χρώμα και προσδιορίζονται εύκολα σε οπτικό μικροσκόπιο.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Διάλυμα HBSS εμπλουτισμένο με 0,1% ζελατίνη (HBSS-g)
- Διάλυμα προΤα σε HBSS με συγκέντρωση 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Διάλυμα προΤα(100-109) σε HBSS με συγκέντρωση 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Διάλυμα πεπτιδίου scrambled σε HBSS με συγκέντρωση 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Διάλυμα fMLP σε HBSS με συγκέντρωση 5 μM
- Διάλυμα NBT (Sigma-Aldrich) σε HBSS-g με συγκέντρωση 0,5 mg/mL
- Διάλυμα PFA σε HBSS με τελική συγκέντρωση 4%

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Ρυθμίζεται η συγκέντρωση των υπό μελέτη κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα HBSS-g στα 2×10^6 κύτταρα/ mL .
- 2) Σε σωληνάρια Eppendorf που ήδη περιέχουν 25 μL διαλύματος NBT και τους παράγοντες ενεργοποίησης που αναφέρθηκαν στη δοκιμασία φαγοκυττάρωσης σωματιδίων zymosan (§ 2.4), προστίθενται 50 μL από τα κυτταρικά εναιωρήματα ουδετερόφιλων, μονοκυττάρων ή κυττάρων HL-60.
- 3) Τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά στους 37°C, 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί μονιμοποίηση με διάλυμα PFA.
- 4) Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 350xg για 5 λεπτά, στους 4°C και προστίθενται 50 μL HBSS-g σε κάθε κυτταρικό ίζημα.
- 5) Μετρώνται στο οπτικό μικροσκόπιο τουλάχιστον 100 κύτταρα ανά δείγμα. Θετικά θεωρούνται τα κύτταρα που φέρουν ενδοκυττάριας μπλε εναποθέσεις φορμαζανίου στο εσωτερικό τους (**Εικόνα 2.5**).



Εικόνα 2.5. Ουδετερόφιλο από περιφερικό αίμα ανθρώπου άχρωμο που δεν έχει ανάγει το NBT (αριστερά) και αντίστοιχο κύτταρο βαμμένο μπλε που έχει παράγει ενδοκυτταρικά υπεροξειδικά ανιόντα και έχει ανάγει το NBT (δεξιά), όπως φαίνονται στο οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση 40X).

2.6. Έλεγχος της εξωκυτταρικής απελευθέρωσης υπεροξειδικού ανιόντος - Δοκιμασία αναγωγής του κυτοχρώματος c

Το κυτόχρωμα c είναι μία μικρή διαλυτή πρωτεΐνη αίμης, η οποία προσδένεται χαλαρά στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και αποτελεί απαραίτητο συστατικό της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η μελέτη της οξειδοαναγωγικής συμπεριφοράς του κυτοχρώματος c γίνεται φασματοφωτομετρικά. Σε μήκος κύματος 535 nm ανιχνεύεται η οξειδωμένη μορφή της πρωτεΐνης, ενώ στα 550 nm η ανηγμένη.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Διάλυμα HBSS εμπλουτισμένο με 0,1% ζελατίνη (HBSS-g)
- Διάλυμα προΤα σε HBSS με συγκέντρωση 2 µg/mL
- Διάλυμα προΤα(100-109) σε HBSS με συγκέντρωση 0,25 µg/mL
- Διάλυμα πεπτιδίου scrambled σε HBSS με συγκέντρωση 0,25 µg/mL
- Διάλυμα fMLP σε HBSS με συγκέντρωση 5 µM
- Διάλυμα κυτοχρώματος c (Sigma-Aldrich) σε HBSS-g με συγκέντρωση 1,96 mg/mL
- Φασματοφωτόμετρο Ultrospec 2000 UV–VIS (Pharmacia Biotech, Sweden)

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Ρυθμίζεται η συγκέντρωση των υπό μελέτη κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα HBSS-g στα 5×10^6 κύτταρα/mL.
- 2) Σε σωληνάρια Eppendorf που ήδη περιέχουν 100 µL διαλύματος κυτοχρώματος c και τους παράγοντες ενεργοποίησης που αναφέρθηκαν στη δοκιμασία φαγοκυττάρωσης σωματιδίων zymosan (§ 2.4), προστίθενται 100 µL από τα κυτταρικά εναιωρήματα.
- 3) Τα δείγματα επωάζονται για 20 λεπτά στους 37°C και γίνεται ήπια ανάδευσή τους κάθε 5 λεπτά.
- 4) Ακολούθως μεταφέρονται σε πάγο μέχρι να ψυχθούν και φυγοκεντρούνται στα 250xg για 5 λεπτά, στους 4°C.
- 5) Αφαιρούνται 400 µL από κάθε υπερκείμενο και η οπτική πυκνότητα (optical density, OD) προσδιορίζεται στα 535 and 550 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $(OD_{550} - OD_{535}) \times 1000$.

2.7. Οξειδωτική έκρηξη φαγοκυττάρων (Δοκιμασία **Bursttest**)

Το **Bursttest** είναι ένα εμπορικά διαθέσιμο kit, το οποίο επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της οξειδωτικής έκρηξης των λευκοκυττάρων. Ηπαρινισμένο πλήρες αίμα ή απομονωμένοι λευκοκυτταρικοί υποπληθυσμοί επωάζονται με διάφορους παράγοντες διέγερσης στους 37°C, ενώ ένα δείγμα χωρίς παράγοντες χρησιμεύει ως αρνητικός μάρτυρας. Μετά τη διέγερση, τα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα παράγουν αντιδραστικά μεταβολίτες οξυγόνου [$\cdot\text{O}_2^-$, υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), HOCl], καταστρέφοντας, έτσι, τα βακτήρια στο εσωτερικό του φαγοσώματος. Ο σχηματισμός των δραστικών μεταβολιτών κατά την οξειδωτική έκρηξη μπορεί να παρακολουθηθεί από την προσθήκη και οξείδωση της διϋδροροδαμίνης (DHR) 123. Συγκεκριμένα, η δοκιμασία καθορίζει το ποσοστό των κυττάρων τα οποία παράγουν δραστικές ρίζες [μετατροπή DHR 123 σε ροδαμίνη (R) 123] και την ενζυματική δραστηριότητά τους (ποσό R 123 ανά κύτταρο).

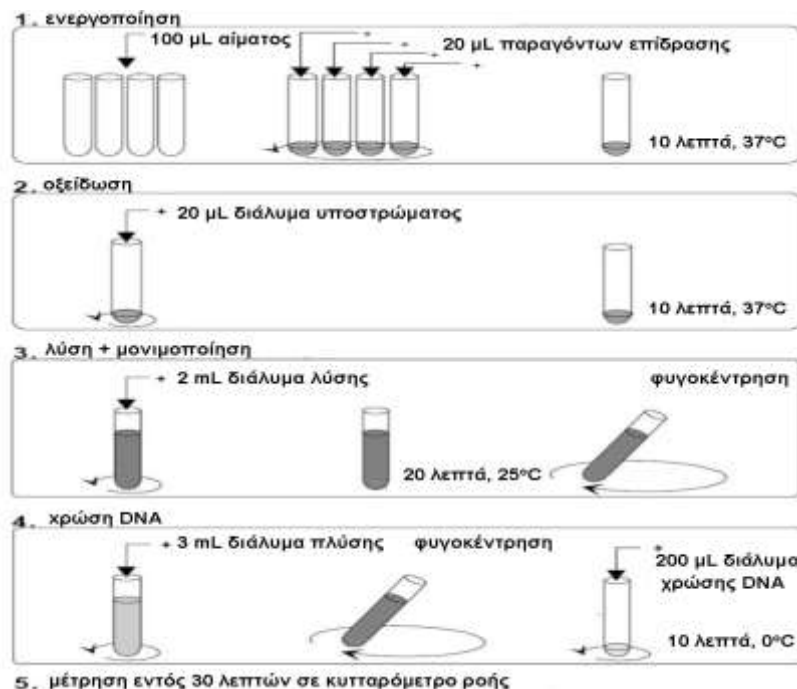
Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- **Bursttest kit** (Opregen Pharma, Heidelberg, Germany)
- Εναιώρημα μονιμοποιημένων, οψωνοποιημένων, μη-σημασμένων βακτηρίων *E. coli* (1×10^9 βακτήρια/mL)
- DHR 123 ως φθορισμογόνο υπόστρωμα
- Διάλυμα fMLP (200X, 1 mM)
- Διάλυμα φορβολικού εστέρα (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA, 1,62 mM)
- Δίσκοι υποστρώματος προς ανασύσταση λίγο πριν από τη χρήση
- Διάλυμα χρώσης DNA για τη διάκριση των βακτηρίων κατά την ανάλυση
- Διάλυμα λύσης για τη λύση των ερυθροκυττάρων και την ταυτόχρονη μονιμοποίηση των λευκοκυττάρων
- Διάλυμα αλάτων για έκπλυση
- Υδατόλουτρο 37°C
- Κυτταρόμετρο ροής FACSCalibur

Πρωτόκολλο εργασίας (Εικόνα 2.6)

- 1) 100 μL ηπαρινισμένου πλήρους αίματος ή απομονωμένων κυτταρικών υποπληθυσμών μεταφέρονται σε πλαστικά σωληνάρια. Τα δείγματα επωάζονται σε λουτρό πάγου για 5 έως 10 λεπτά προκειμένου να ψυχθούν.

- 2) Προστίθενται 20 μL από τα ακόλουθα αντιδραστήρια: διάλυμα πλύσης (αρνητικός μάρτυρας), βακτήρια *E. coli* (σωματιδιακή διέγερση), fMLP (χαμηλή φυσιολογική διέγερση) και ο συνδέτης της πρωτεΐνης κινάσης C, PMA (υψηλή διέγερση).
- 3) Τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά στους 37°C σε υδατόλουτρο.
- 4) Με το πέρας της επώασης, προστίθενται 20 μL διαλύματος υποστρώματος και τα δείγματα αναμειγνύονται επιμελώς. Επωάζονται και πάλι για 10 λεπτά στους 37°C στο υδατόλουτρο.
- 5) Στη συνέχεια, όλα τα δείγματα μαζί μεταφέρονται εκτός του υδατόλουτρου. Τα δείγματα ολικού αίματος λύνονται και μονιμοποιούνται με 2 mL προθερμασμένου διαλύματος λύσης. Ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6) Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στα $250xg$ για 5 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται, ενώ ξεπλένονται επιμελώς με διάλυμα πλύσης.
- 7) Προστίθενται 200 μL διαλύματος χρώσης DNA ώστε να αποκλειστούν τα συσσωματώματα βακτηρίων ή κυττάρων κατά την ανάλυση. Ακολουθεί επώαση 10 λεπτών σε πάγο.
- 8) Τα δείγματα πρέπει να μετρηθούν εντός 30 λεπτών σε κυτταρόμετρο ροής χρησιμοποιώντας το μπλε-πράσινο φως διέγερσης (488 nm, ιόντων αργού laser).



Εικόνα 2.6. Σχηματική αναπαράσταση των 5 βασικών βημάτων που περιλαμβάνει το Bursttest kit: ενεργοποίηση των κυττάρων (1), προσθήκη του υποστρώματος-οξείδωση (2), λύση/μονιμοποίηση των κυττάρων (3), χρώση DNA (4) και ανάλυση σε κυτταρόμετρο ροής (5).

2.8. Δοκιμασία ελέγχου της κυτταροτοξικότητας με ραδιενεργό χρώμιο

Με τη δοκιμασία αυτή προσδιορίζεται η κυτταρομεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα, η ικανότητα, δηλαδή, των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζουν και να λύουν κύτταρα τα οποία αντιλαμβάνονται ως κύτταρα-στόχους. Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στη συνεπώαση κυττάρων-τελεστών και ενδοκυτταρικά σημασμένων, με ραδιενεργό χρώμιο, κυττάρων-στόχων. Ως κύτταρα-τελεστές μπορούν να χρησιμοποιηθούν πληθυσμοί κυττάρων, των οποίων την κυτταροτοξικότητα επιθυμούμε να μελετήσουμε. Μετά τη συνεπώαση των δύο κυτταρικών εναιωρημάτων για το επιθυμητό χρονικό διάστημα, το υπερκείμενο της καλλιέργειας αφαιρείται και ακολουθεί μέτρηση της ραδιενέργειας, η οποία είναι ανάλογη του ραδιενεργού χρωμίου που απελευθερώθηκε στο υπερκείμενο και επομένως, ανάλογη του ποσοστού των κυττάρων-στόχων που λύθηκαν.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

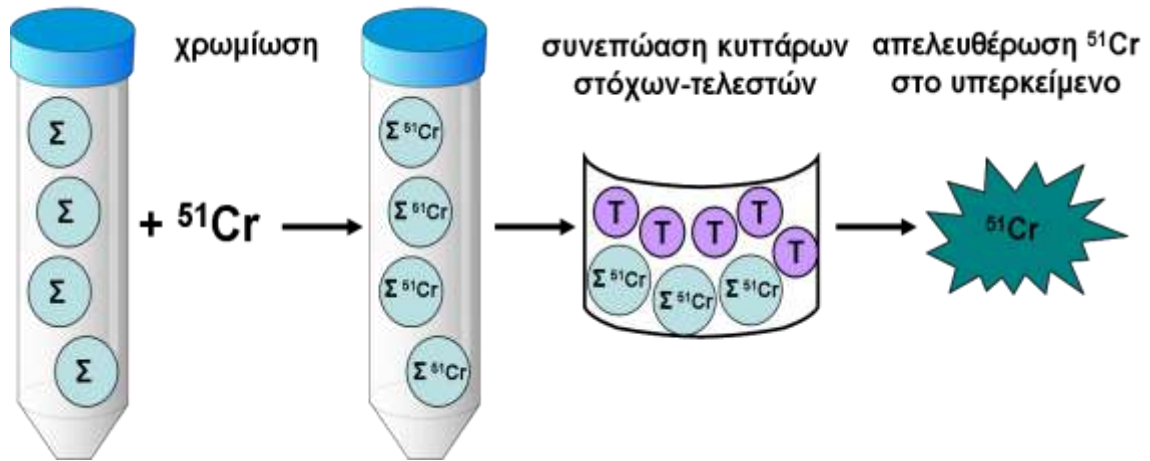
- Εναιώρημα ουδετερόφιλων (κύτταρα-τελεστές)
- Εναιώρημα καρκινικής κυτταρικής σειράς (κύτταρα-στόχοι)
- Πλήρες θρεπτικό υλικό
- FBS
- Διάλυμα 0,1 N HCl (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα ραδιενεργού άλατος χρωμίου $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (1 mCi/mL, Amersham Biosciences)
- Μικροπλάκες καλλιέργειας 96 φρεατίων με πυθμένα σχήματος U
- Σωληνάρια πολυστερενίου μίας χρήσης 7,5 x 3,0 mm (Greiner, Bio-One)
- Μετρητής γ-ακτινοβολίας (1275 Mini-gamma, LKB Wallac)

Πρωτόκολλο εργασίας (Εικόνα 2.7)

- 1) Η διαδικασία ξεκινά με την ενδοκυτταρική σήμανση των κυττάρων-στόχων με το ραδιενεργό χρώμιο (χρωμίωση κυττάρων-στόχων).
- 2) Μία ποσότητα των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν ως στόχοι μεταφέρεται σε σωληνάριο falcon. Προσδιορίζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων, καθώς τα κύτταρα πρέπει να είναι ζωντανά για να ενσωματώσουν το χρώμιο, αλλά και να επιβιώσουν κατά τη διαδικασία της χρωμίωσης.

- 3) Το κυτταρικό εναιώρημα, που περιέχει 1×10^6 κύτταρα-στόχους φυγοκεντρείται στα 300xg για 5 λεπτά, το υπερκείμενο αποχύνεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 20 μ L FBS.
- 4) Προστίθενται 15-25 μ L διαλύματος ραδιενεργού άλατος του χρωμίου (ενεργότητας 5 mCi/mL) και ακολουθεί επώαση 90 λεπτών στους 37°C, αναδεύοντας ήπια το εναιώρημα κάθε 15 λεπτά.
- 5) Μετά το πέρας της επώασης, προστίθεται στο σωληνάριο περίσσεια πλήρους θρεπτικού υλικού και φυγοκεντρείται στα 300xg για 5 λεπτά.
- 6) Το υπερκείμενο αποχύνεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 5 mL πλήρους θρεπτικού υλικού.
- 7) Επωάζονται στους 37°C για 30 λεπτά, αναδεύοντας ήπια το εναιώρημα κάθε 15 λεπτά.
- 8) Προστίθεται στο σωληνάριο περίσσεια πλήρους θρεπτικού υλικού, φυγοκεντρείται στα 300xg για 5 λεπτά, αποχύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1 mL πλήρους θρεπτικού υλικού.
- 9) Αφού προσδιοριστεί η βιωσιμότητά τους, ρυθμίζεται η συγκέντρωσή τους στα 50.000 κύτταρα/mL.
- 10) Συλλέγονται τα κύτταρα-τελεστές, που σε αυτήν την περίπτωση είναι τα ουδετερόφιλα που απομονώθηκαν από περιφερικό αίμα. Τα ουδετερόφιλα έχουν προ-ενεργοποιηθεί με fMLP, προΤα, προΤα(100-109) ή πεπτίδιο scrambled σε μικροπλάκα καλλιέργειας 96 φρεατίων για 10 λεπτά στους 37°C. Ο λόγος κυττάρων-τελεστών (T) προς κύτταρα-στόχους (Σ) είναι 30:1.
- 11) Στη μικροπλάκα που ήδη βρίσκονται τα ουδετερόφιλα προσθέτουμε 100 μ L διαλύματος κυττάρων-στόχων (δηλαδή, 150.000 κύτταρα-τελεστές και 5.000 κύτταρα-στόχους).
- 12) Παράλληλα, τοποθετούνται σε 10 φρεάτια 100 μ L εναιωρήματος κυττάρων-στόχων. Στα πρώτα πέντε προστίθενται 100 μ L πλήρους θρεπτικού υλικού (αυθόρμητη έκλυση) και στα υπόλοιπα πέντε φρεάτια 100 μ L διαλύματος 0,1 N HCl (ολική ή μέγιστη έκλυση).
- 13) Η μικροπλάκα επωάζεται στους 37°C για 6 ώρες, φυγοκεντρείται στα 300xg για 5 λεπτά και μεταφέρονται 100 μ L υπερκειμένου από κάθε φρεάτιο σε πλαστικό σωληνάριο συμβατό με το μετρητή γ-ακτινοβολίας.
- 14) Καταγράφονται οι κρούσεις ανά λεπτό (counts per minute, cpm).

- 15) Το % ποσοστό της κυτταροτοξικότητας υπολογίζεται από τον τύπο:
Κυτταροτοξικότητα (%) = (cpm φρεατίου-cpm αυθόρμητης έκλυσης)/(cpm ολικής λύσης-cpm αυθόρμητης έκλυσης).



Εικόνα 2.7. Σχηματική αναπαράσταση της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας που περιλαμβάνει: την επισήμανση των κυττάρων-στόχων (Σ) με ραδιενεργό χρώμιο (^{51}Cr), τη συνεπώσή τους με τα κύτταρα-τελεστές (Τ) και τη μέτρηση του χρωμίου που απελευθερώνεται στο υπερκείμενο σε μετρητή γ-ακτινοβολίας.

2.9. Έλεγχος έκφρασης επιφανειακών δεικτών με κυτταρομετρία ροής

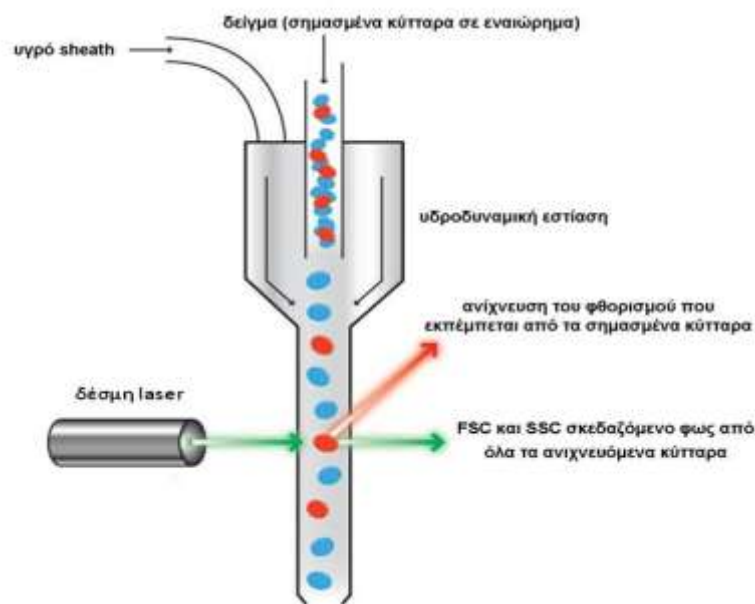
Η κυτταρομετρία ροής συνιστά μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για: 1) την ανάλυση της έκφρασης, στην κυτταρική επιφάνεια αλλά και ενδοκυτταρικά, μορίων που χαρακτηρίζουν και προσδιορίζουν διαφορετικούς τύπους κυττάρων σε ετερογενείς κυτταρικούς πληθυσμούς και 2) την εκτίμηση της καθαρότητας των απομονωμένων υποπληθυσμών. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών παραμέτρων σε μεμονωμένα κύτταρα. Με την κυτταρομετρία ροής εκτιμάται η ένταση φθορισμού που παράγεται από αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα, όπως η φλουορεσκεΐνη (FITC) και η φυκοερυθρίνη (PE), και έχουν δεσμευθεί στην κυτταρική επιφάνεια ή έχουν σημάνει ενδοκυτταρικά μόρια. Μία δέσμη φωτός (δέσμη laser) κατευθύνεται διαμέσου υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνά τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός και οι υπόλοιποι κάθετοι σε αυτήν. Κάθε κύτταρο αιωρούμενο στο υγρό που περνά εμπρός από τη δέσμη, σκεδάζει το φως και παράλληλα τα φθορίζοντα αντισώματα μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός συγκεντρώνεται από τους ανιχνευτές και μετά από μετατροπή των σκεδαστικών χαρακτηριστικών σε ηλεκτρικό σήμα είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου κυττάρου. Η εμπρόσθια σκέδαση «FSC» (forward scatter) σχετίζεται με τον όγκο/μέγεθος του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση «SSC» (side scatter) είναι ανάλογη με την εσωτερική πολυπλοκότητα του κυττάρου (σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων/κοκκίων ή αδρότητα της κυτταρικής μεμβράνης) (**Εικόνα 2.8**).

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Κυτταρικό εναιώρημα
- Διάλυμα DPBS-0,5% w/v αλβουμίνη ορού βοδιού (bovine serum albumin, BSA) (διάλυμα DPBS-BSA)
- Διάλυμα DPBS-2% v/v PFA (διάλυμα DPBS-PFA)
- Αντισώματα τάξης IgG1
 - έναντι του μορίου CD14/PE (BD Biosciences, Germany)
 - έναντι του μορίου CD11b/PE (BD Biosciences)
- Σωληνάρια πολυστυρενίου όγκου 5 mL (BD Biosciences)
- Κυτταρόμετρο ροής FACSCantoII (BD Biosciences)

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Τα προς ανάλυση κύτταρα μεταφέρονται σε συμβατά με το κυτταρόμετρο σωληνάρια ($0,2-0,5 \times 10^6$ κύτταρα/ σωληνάριο) και φυγοκεντρώνονται στα 300xg για 5 λεπτά.
- 2) Προστίθενται 3 mL διαλύματος DPBS-BSA σε κάθε σωληνάριο και τα σωληνάρια φυγοκεντρώνονται στα 200xg για 5 λεπτά.
- 3) Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε DPBS-BSA, $0,2-0,5 \times 10^6$ κύτταρα/50 μ L διαλύματος.
- 4) Προστίθενται τα αντισώματα (5μ L/ 10^6 κύτταρα), μέχρι τρία αντισώματα (συζευγμένα με τρία διαφορετικά φθοριοχρώματα) σε κάθε σωληνάριο.
- 5) Τα δείγματα επωάζονται για 30 λεπτά στον πάγο, σε σκοτάδι.
- 6) Προστίθεται 1 mL διαλύματος DPBS-BSA σε κάθε σωληνάριο και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 300xg για 5 λεπτά.
- 7) Το υπερκείμενο αποχύνεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 200 μ L διαλύματος DPBS-PFA.
- 8) Τα δείγματα αναλύονται στο κυτταρόμετρο ροής.



Εικόνα 2.8. Βασική αρχή λειτουργίας του κυτταρομέτρου ροής. Κυτταρικό εναιώρημα περνά από την κυψελίδα ροής, περιβαλλόμενο από αδρανές ρυθμιστικό διάλυμα (υγρό sheath), και λόγω της υδροδυναμικής εστίασης επιτυγχάνεται η ροή των κυττάρων σε μονήρη διάταξη (νηματική ροή). Δέσμη laser προσπίπτει στη μονήρη κυτταρική διάταξη και έτσι προκαλείται σκεδασμός του φωτός ανάλογα με το μέγεθος (FSC) και την πολυπλοκότητα (SSC) του κυττάρου. Παράλληλα, τα φθορίζοντα αντισώματα διεγείρονται και εκπέμπουν φως σε μήκος κύματος διαφορετικό από αυτό της πηγής. Ακολουθεί, η μετατροπή των φωτεινών σημάτων σε ηλεκτρικό σήμα και η ανάλυση των δεδομένων με ειδικό πρόγραμμα σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

2.10. Διαφοροποίηση της ανθρώπινης προμυελοκυτταρικής λευχαιμικής σειράς HL-60

Τα HL-60 είναι ανθρώπινη κυτταρική σειρά που δημιουργήθηκε από τον S.J. Collins και τους συνεργάτες του (Collins et al., 1977). Λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος ελήφθησαν με λευκαφαίρεση από Καυκάσια γυναίκα 36 ετών που έπασχε από οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία. Τα HL-60 διαφοροποιούνται αυθόρμητα, σε μικρό ποσοστό, όταν βρίσκονται σε καλλιέργεια, ενώ η *in vitro* διαφοροποίησή τους προς διαφορετικούς λευκοκυτταρικούς υποπληθυσμούς μπορεί να διεγερθεί από βουτυρικό οξύ, υποξανθίνη, PMA, TPA, DMSO, ακτινομυκίνη D, TNF- α και ρετινοϊκό οξύ. Επίσης, τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν φαγοκυτταρική ικανότητα και ανταποκρίνονται σε χημειοτακτικά ερεθίσματα.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Κυτταρικό εναιώρημα HL-60
- Μικροπλάκες καλλιέργειας 6 φρεατίων
- Παράγοντας νέκρωσης όγκων α (Tumor necrosis factor α , TNF- α) (BioLegend Inc, CA, USA)
- DMSO
- Πλήρες θρεπτικό υλικό

Πρωτόκολλο εργασίας

Η πλειοτροπική κυτταροκίνη TNF- α είναι γνωστό ότι διαφοροποιεί τα κύτταρα της σειράς HL-60 προς μονοκύτταρα, ενώ ο κρυσταλλικός παράγοντας DMSO προς ουδετερόφιλα. Παράλληλα, ελέγχθηκε η ικανότητα της προΤα και του προΤα(100-109) να δρουν ως πιθανοί παράγοντες διαφοροποίησης των HL-60.

- 1) 24 ώρες πριν από την έναρξη του πειράματος, ένα μέρος της καλλιέργειας των HL-60 απορρίπτεται και αντικαθίσταται με φρέσκο θρεπτικό υλικό, ώστε τα κύτταρα να βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης.
- 2) Υπολογίζονται η συγκέντρωση και η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από χρώση με Trypan blue. Η βιωσιμότητα πρέπει να είναι τουλάχιστον 95% προκειμένου να ξεκινήσει η διαφοροποίηση.
- 3) Ρυθμίζεται η συγκέντρωση των κυττάρων με πλήρες θρεπτικό υλικό στα $0,1 \times 10^6$ κύτταρα/mL σε τελικό όγκο 2 mL.
- 4) Σε σωληνάρια falcon προετοιμάζονται ξεχωριστά κυτταρικά εναιωρήματα με καθένα από τους παράγοντες διαφοροποίησης: 100 ng/mL TNF- α , 1,3% DMSO, 200 ng/mL

προΤα, 25 ng/mL προΤα(100-109), καθώς και ένα εναιώρημα στο οποίο δεν προστίθεται παράγοντας διαφοροποίησης (αρνητικός μάρτυρας).

- 5) Το περιεχόμενο των σωληναρίων μεταφέρεται σε μικροπλάκα καλλιέργειας 6 φρεατίων και η μικροπλάκα τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο για 4 ημέρες.
- 6) Την 4^η ημέρα, τα κύτταρα συλλέγονται και ελέγχεται το ποσοστό διαφοροποίησής τους.

2.11. Χρώση May-Grünwald-Giemsa (MGG)

Η χρώση MGG χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και τη μορφολογική επισκόπηση των κυττάρων του αίματος. Το pH είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας κατά τη διαδικασία αυτή, καθώς οποιαδήποτε αλλαγή θα οδηγήσει σε λανθασμένη αντίδραση χρώσης. Έτσι, το pH πρέπει να παραμένει μεταξύ 6,5 και 6,9. Με το συνδυασμό των δύο χρωστικών, οι πυρήνες χρωματίζονται σε διάφορες αποχρώσεις του πορφυρού, ενώ το κυτταρόπλασμα χρωματίζεται σε διάφορες αποχρώσεις, από μπλε έως ανοιχτό ρόδινο.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Χρωστική Giemsa (μπλε του μεθυλενίου, ηωσίνη και Azure I) τροποποιημένη 0,4% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα μεθανόλης pH 6,9, με σταθεροποιητές (Sigma-Aldrich)
- Χρωστική May-Grünwald (μπλε του μεθυλενίου, ηωσίνη) 0,25% w/v σε μεθανόλη (Sigma-Aldrich)
- Κυτταρικό εναιώρημα ή ολικό αίμα με αντιπηκτικό
- Διάλυμα καθαρής μεθανόλης (Sigma-Aldrich)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες
- Καλυπτρίδες
- Οπτικό μικροσκόπιο

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Μία σταγόνα κυτταρικού εναιωρήματος ή ολικού αίματος επιστρώνεται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για μερικά λεπτά μέχρι να στεγνώσει.
- 2) Στη συνέχεια, μερικές σταγόνες καθαρής μεθανόλης τοποθετούνται στην πλάκα για 30 περίπου δευτερόλεπτα προς μονιμοποίηση του δείγματος.
- 3) Η αντικειμενοφόρος πλάκα εμβαπτίζεται στο διάλυμα της χρωστικής May-Grünwald για 5 λεπτά.
- 4) Ακολουθεί έκπλυση με νερό βρύσης και αφού η χρωστική Giemsa αραιωθεί 1:20 με απιονισμένο νερό, η αντικειμενοφόρος πλάκα εμβαπτίζεται στο αραιωμένο διάλυμα Giemsa για 15-20 λεπτά.
- 5) Η αντικειμενοφόρος πλάκα ξεπλένεται με νερό και αφήνεται να στεγνώσει σε όρθια θέση σε θερμοκρασία δωματίου.

- 6) Τα παρασκευάσματα είναι έτοιμα για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο με καταδυτικό φακό (100X) κάτω από σταγόνα κεδρελαίου.

2.12. Ανοσοστύπωμα κατά Western

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και μελέτη των επιπέδων έκφρασης μίας πρωτεΐνης μέσα σε ένα σύνθετο μείγμα πρωτεϊνών. Αρχικά, στο κυτταρικό εκχύλισμα προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford, στη συνέχεια οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα ακρυλαμίδης και ηλεκτρομεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Κατόπιν, η μεμβράνη επωάζεται με κατάλληλα αντισώματα και έτσι καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση και η ημι-ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της εξεταζόμενης πρωτεΐνης (**Εικόνα 2.9**).

Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών (Μέθοδος Bradford):

Με τη μέθοδο αυτή, υπολογίζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα προς ανάλυση δείγματα. Η μέθοδος στηρίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να συνδέεται με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον, μεταβάλλοντας το χρώμα της. Η ελεύθερη χρωστική έχει μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής στα 595 nm. Απαραίτητη είναι η κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς με βάση γνωστές συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων BSA. Μετά από κατάλληλη αραιώση και συγκρίνοντας την οπτική πυκνότητα του δείγματος, με την οπτική πυκνότητα των προτύπων, υπολογίζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο άγνωστο δείγμα.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Αντιδραστήριο Bradford [0,01% v/v χρωστική Coomassie Brilliant Blue, 4,7% v/v αιθανόλη, 8,5% v/v φωσφορικό οξύ]. Το αντιδραστήριο αυτό αραιώνεται 1:5 v/v με δις απεσταγμένο νερό και παρασκευάζεται λίγο πριν από τη χρήση του
- Διάλυμα φόρτωσης δείγματος (sample buffer) [0,33 M Tris-HCl με pH 6,8, 10% w/v απορρυπαντικού SDS (θειικό δωδεκυλικό νάτριο), 13% v/v γλυκερόλη, 20% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,2% w/v κυανούν της βρωμοφαινόλης και δις απεσταγμένο νερό]

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Γνωστές ποσότητες της πρότυπης πρωτεΐνης BSA (0, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16 και 20 μg) αντιδρούν με το αντιδραστήριο Bradford για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 2) Παράλληλα, με το ίδιο αντιδραστήριο αντιδρά συγκεκριμένος όγκος από το δείγμα (για ολικές κυτταρικές πρωτεΐνες 1 μL), το οποίο αραιώνεται με νερό (99 μL).

- 3) Κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη και οι απορροφήσεις των δειγμάτων αντιστοιχίζονται στην πρότυπη καμπύλη.
- 4) Στα δείγματα προστίθεται sample buffer σε αραιώση 1:4 και ακολούθως φυλάσσονται στους -20°C . Το διάλυμα αυτό προστατεύει τις πρωτεΐνες και, λόγω των επιμέρους συστατικών του, εξασφαλίζει την αρνητική τους φόρτιση (SDS), την αποδιάταξή τους (β -μερκαπτοαιθανόλη) και προσφέρει τη δυνατότητα παρακολούθησης της ηλεκτροφόρησης (κυανούν της βρωμοφαινόλης).

Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδης:

Η αρχή της μεθόδου αυτής στηρίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες σε διαφορετικό pH από το ισοηλεκτρικό τους σημείο, μετακινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται κάτω από αποδιατακτικές και αναγωγικές συνθήκες, καθώς το SDS προσδίδει στις πρωτεΐνες αρνητικό φορτίο και έτσι, διαχωρίζονται αποκλειστικά με βάση το μοριακό τους βάρος.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Δις απεσταγμένο νερό
- Πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) [12% διάλυμα ακρυλαμίδης, 0,375 M Tris pH 8,8, 0,1% SDS, 0,025% υπερθειϊκό αμμώνιο (APS) και 0,083% NNN'N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (NNN'N'-tetramethylethylenediamine, TEMED)]
- Πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel) [3,05% διάλυμα ακρυλαμίδης, 0,127 M Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% APS και 0,17% TEMED]
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer, 10X): 250 mM Tris-Base και 1,92 M γλυκίνη
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1X): το πυκνό διάλυμα αραιώνεται 10 φορές και προστίθεται 0,1 v/v SDS
- Διάλυμα ακρυλαμίδης: δις-ακρυλαμίδης σε αναλογία 37,5:1 (BioRad Laboratories)
- Πρωτεϊνικοί δείκτες (markers) εύρους 20-120 kDa (Thermo Scientific)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πήκτωμάτων (BioRad Laboratories)

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Παρασκευάζεται πήκτωμα ακρυλαμίδης 8% που αποτελείται από το πήκτωμα διαχωρισμού και το πήκτωμα επιστοίβαξης.

- 2) Τα δείγματα θερμαίνονται στους 100°C για 3 λεπτά.
- 3) Συγκεκριμένη ποσότητα από κάθε δείγμα φορτώνεται στα ειδικά φρεάτια που είναι σχηματισμένα στο πήκτωμα επιστοιβάξης. Στο πρώτο φρεάτιο φορτώνεται πάντα μικρή ποσότητα πρωτεϊνικών δεικτών γνωστού μοριακού βάρους.
- 4) Τα πήκτωμα βυθίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης και ηλεκτροφορούνται υπό σταθερή τάση 180V, μέχρι το μέτωπο του κυανού της βρωμοφαινόλης να φτάσει περίπου στο τέλος του πήκτωματος διαχωρισμού.

Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης:

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Διάλυμα μεταφοράς 5X (transfer buffer 5X) [100 μM Tris-HCl με pH 8,3 και 960 mM γλυκίνη]
- Διάλυμα μεταφοράς 1X [20% v/v διάλυμα μεταφοράς 5X, 20% μεθανόλη και δις απεσταγμένο νερό]
- Φύλλα χαρτιού Whatman κομμένα σε διαστάσεις 6 x 9,3 cm (Macherey-Nagel, Germany)
- Απορροφητικά υλικά (σφουγγαράκια)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε διαστάσεις 5,5 x 8,8 (Porablot NCP)
- Συσκευή υγρής μεταφοράς (BioRad Laboratories)

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα, 2 φύλλα Whatman, 2 απορροφητικά υλικά (σφουγγαράκια) και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εξισορροπούνται για 15 λεπτά στο διάλυμα μεταφοράς.
- 2) Τοποθετούνται από το θετικό προς τον αρνητικό πόλο της συσκευής με την παρακάτω σειρά: 1 σφουγγαράκι, 1 φύλλο Whatman, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα, 1 φύλλο Whatman και το άλλο σφουγγαράκι, χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες.
- 3) Στη συσκευή τοποθετείται πάγος για να διατηρηθεί χαμηλή η θερμοκρασία και προστίθενται περίπου 700 mL διαλύματος μεταφοράς.
- 4) Η μεταφορά πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 100V για 60 λεπτά.

Χρώση με Ponceau S:

Η χρωστική αυτή έχει την ικανότητα να σημαίνει αντιστρεπτά τις φορτισμένες αμινομάδες των πολυπεπτιδίων/πρωτεϊνών που έχουν μεταφερθεί ηλεκτροφορητικά στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Διάλυμα Ponceau S (Sigma-Aldrich) [0,5% w/v της χρωστικής σε 7,5% w/v τριχλωρικό οξύ]
- Tween-20 (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα πλύσης (TBS-Tween; TBST) [TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,6 και 0,137 M NaCl), 0,05% v/v Tween-20 και δις απεσταγμένο νερό]

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Μετά το τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης επωάζεται με το διάλυμα της χρωστικής.
- 2) Οι ζώνες των πρωτεϊνών βάφονται με κόκκινο χρώμα και έτσι διαπιστώνεται η επιτυχία ή όχι της μεταφοράς. Επίσης, με βάση τους markers είναι δυνατή η απομόνωση της περιοχής με την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.
- 3) Ακολουθεί αποχρωματισμός της μεμβράνης με διαδοχικές εκπλύσεις σε TBST.

Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνικών ζωνών:

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Tween-20
- Σκόνη γάλακτος με χαμηλά λιπαρά Regilait (France)
- Διάλυμα πλύσης TBST
- Διάλυμα κορεσμού [5% w/v σκόνη γάλακτος σε TBST]
- Πρωτογενές αντίσωμα έναντι του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109)
- Δευτερογενές αντίσωμα έναντι της Fc περιοχής των ανοσοσφαιρινών τάξης G του κουνελιού, παραγμένο σε αίγα, αραιώση 1:5000 (Santa Cruz, Heidelberg, Germany)
- Kit ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced chemiluminescence kit, ECL; Santa Cruz), που περιέχει H₂O₂ (αντιδραστήριο A), λουμινόλη και ενισχυτή χημειοφωταύγειας (αντιδραστήριο B)
- Φιλμ ακτίνων X (Agfa-Gevaert N.V, Belgium)

- Διάλυμα εμφάνισης (developer)
- Διάλυμα σταθεροποίησης (fixer)

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα κορεσμού για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση, για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης των αντισωμάτων.
- 2) Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBST, 4 φορές για 5 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση.
- 3) Η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα, όλη νύχτα, στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση.
- 4) Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBST, 4 φορές για 5 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση.
- 5) Η μεμβράνη επωάζεται με το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος (1% γάλα σε TBST), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση.
- 6) Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBST, 4 φορές για 5 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση.
- 7) Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-αντισωμάτων ανιχνεύεται με τη χρήση του ECL kit. Τα αντιδραστήρια A και B του kit αναμειγνύονται σε αναλογία 1:1 λίγο πριν από τη χρήση τους και η μεμβράνη επωάζεται σε 2-3 mL ECL για 2 λεπτά.
- 8) Η μεμβράνη καλύπτεται με ζελατίνη και εκτίθεται σε κατάλληλο φιλμ εντός της ειδικής κασέτας. Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ εξαρτάται, κυρίως, από τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτη πρωτεΐνης αλλά και από την ειδικότητα του πρωτογενούς αντισώματος προς αυτή.
- 9) Ακολουθεί εμφάνιση του φιλμ με μεταφορά του σε διάλυμα εμφάνισης για περίπου 1-5 λεπτά.
- 10) Το φιλμ ξεπλένεται με νερό βρύσης, μεταφέρεται σε διάλυμα σταθεροποίησης για να μονιμοποιηθεί για 5-10 λεπτά και τέλος ακολουθεί ξανά έκπλυση του φιλμ με νερό βρύσης.

Αφαίρεση αντισώματος από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (stripping):

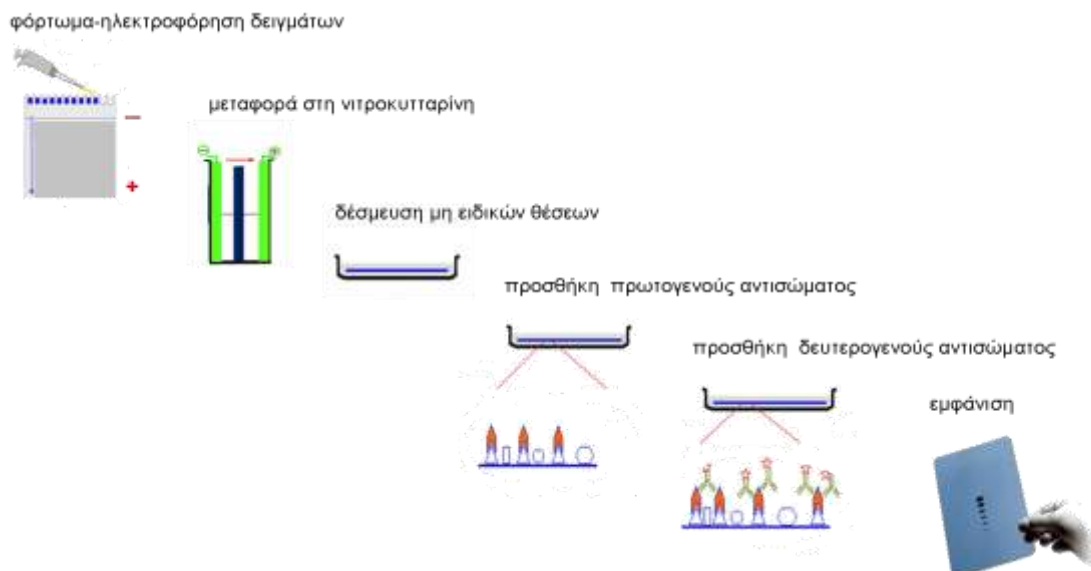
Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Διάλυμα αφαίρεσης του αντισώματος [100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 50 mM Tris-HCl, 2% v/v SDS και δις απεσταγμένο νερό]
- Διάλυμα TBST

Πρωτόκολλο εργασίας

Μετά την ολοκλήρωση του ανοσοοτυπώματος, υπάρχει η δυνατότητα να αφαιρεθεί το αντίσωμα από τη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Έτσι, μπορεί να ελεγχθεί το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων, χρησιμοποιώντας αντίσωμα για μία πρωτεΐνη-μάρτυρα, όπως η ακτίνη.

- 1) Η μεμβράνη επωάζεται στο διάλυμα αφαίρεσης του αντισώματος στους 55°C για 15 λεπτά και αμέσως σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση.
- 2) Οι επώσεις αυτές επαναλαμβάνονται 3 φορές.
- 3) Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBST, 4 φορές για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Η μεμβράνη στεγνώνεται καλά και φυλάσσεται στους 4°C, μέχρι να χρησιμοποιηθεί εκ νέου.



Εικόνα 2.9. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων του ανοσοοτυπώματος κατά Western. Η διαδικασία αποτελείται από πέντε βασικά στάδια: την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, τη μεταφορά στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης, την ανίχνευση με χρήση δύο αντισωμάτων και την εμφάνιση του φιλμ.

2.13. Απομόνωση σπληνοκυττάρων ποντικού

Προκειμένου να απομονωθούν κύτταρα του σπλήνα προς σύντηξη ή να μελετηθούν οι ιδιότητές τους, είναι απαραίτητη η απομόνωσή τους ως εναιώρημα μεμονωμένων κυττάρων, έτσι ώστε να μπορούμε *ex vivo* να χειριστούμε εύκολα τα κύτταρα.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Πειραματόζωα
- Πλαστικές σύριγγες μίας χρήσης όγκου 2,5 mL (Greiner, Bio-One)
- Τρυβλία Petri (Greiner, Bio-One)
- Ομογενοποιητής
- Σύνεργα ανατομίας (ψαλίδια, λαβίδες, βελόνες)
- Λεκάνη ανατομίας
- Διάλυμα DPBS
- Πλήρες θρεπτικό υλικό
- FBS
- Διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Οι σύριγγες με το βαμβάκι στο εσωτερικό τους που λειτουργεί ως φίλτρο, ο ομογενοποιητής και τα σύνεργα ανατομίας αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο.
- 2) Το ζώο θανατώνεται με εξάρθρωση του αυχενικού σπονδύλου και ακινητοποιείται στη λεκάνη ανατομίας.
- 3) Η περιοχή που γίνεται η τομή, ψεκάζεται με 70% αιθανόλη και αφαιρείται ο σπλήνας, ο οποίος βρίσκεται κάτω από τις πλευρές, στο άνω αριστερό μέρος του ζώου (**Εικόνα 2.10**).
- 4) Ο σπλήνας τεμαχίζεται με ψαλίδι εντός του τρυβλίου Petri, το οποίο περιέχει μικρή ποσότητα πλήρους θρεπτικού υλικού.
- 5) Ο τεμαχισμένος σπλήνας μεταφέρεται στον ομογενοποιητή και προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό για να διευκολυνθεί η ομογενοποίηση, χωρίς όμως να υπερχειλίσει ο ομογενοποιητής.
- 6) Ο σπλήνας ομογενοποιείται με περιστροφικές κινήσεις ασκώντας πίεση στο έμβολο.

- 7) Το ομογενοποίημα μεταφέρεται στη σύριγγα με το βαμβάκι, ώστε να διηθηθεί σε σωληνάριο falcon 50 mL, στο οποίο συμπληρώνεται πλήρες θρεπτικό υλικό μέχρι τα 30 mL.
- 8) Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300xg για 5 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθεται στο ίζημα 3 mL διαλύματος λύσης.
- 9) Το σωληνάριο επωάζεται για 4 λεπτά στον πάγο.
- 10) Προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό στο σωληνάριο μέχρι τα 30 mL και με ιδιαίτερη προσοχή τοποθετείται 1 mL FBS στον πυθμένα του.
- 11) Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300xg για 5 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό.
- 12) Εκτιμάται η βιωσιμότητα και η συγκέντρωση των σπληνοκυττάρων, τα οποία είτε χρησιμοποιούνται άμεσα σε πειραματικές δοκιμασίες, είτε καταψύχονται για μελλοντική χρήση.



Εικόνα 2.10. Ανατομή ποντικού, όπου με λευκό κύκλο σημειώνεται η θέση του σπλήνα του ζώου.

2.14. Παρασκευή μονοκλωνικών αντισωμάτων

Αντισώματα υψηλής ειδικότητας μπορούν να ληφθούν με σύντηξη Β κυττάρων από σπλήνα και καρκινικών κυττάρων ώστε να παραχθούν υβριδώματα, καθένα από τα οποία εκκρίνει αντίσωμα συγκεκριμένης ειδικότητας (Köhler and Milstein, 1975). Το επιθυμητό υβρίδωμα που παράγει το αντίσωμα, μπορεί να προσδιοριστεί με διαδικασία διαλογής. Το υβρίδωμα υποβάλλεται σε διαδικασία κλωνοποίησης, κατά την οποία επιλέγονται κλώνοι, των οποίων όλοι οι απόγονοι προέρχονται από το ίδιο πατρικό κύτταρο. Τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν υψηλή ειδικότητα και μπορεί να παραχθούν συνεχώς από τα *in vitro* καλλιεργούμενα υβριδώματα σε μεγάλες ποσότητες. Έτσι, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ανιχνευτές σε ένα μεγάλο φάσμα συστημάτων.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- KLH (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)
- Αντιγόνο: Cys-προΤα(100-109) συζευγμένο με KLH
- Ελεύθερα παθογόνων ποντίκια της φυλής BALB/c
- Κύτταρα της συγγενικής μυελωματικής σειράς ποντικού NSO
- Πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund (Complete Freund's Adjuvant, CFA) (Sigma-Aldrich), που περιέχει αδρανοποιημένα μυκοβακτήρια (*Mycobacterium tuberculosis*, *Tb*)
- Ατελές ανοσοενισχυτικό Freund (Incomplete Freund's Adjuvant, IFA, Sigma-Aldrich), που στερείται τα μυκοβακτηριακά συστατικά, άρα είναι μόνο γαλάκτωμα νερού σε έλαιο
- Βελόνες 20G
- Θρεπτικό υλικό DMEM (Lonza)
- Κυτταρικό συμπλήρωμα HAT (H-υποξανθίνη, A-αμινοπτερίνη, T-θυμιδίνη) και HT (H-υποξανθίνη, T-θυμιδίνη) (Sigma-Aldrich)
- Πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG, Sigma-Aldrich)
- Κύτταρα σιτιστές (feeders), που προέρχονται από περιτοναϊκές πλύσεις των ποντικών με φυσιολογικό ορό
- Hepes
- Πυροσταφυλικό νάτριο (sodium pyruvate) (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα DMEM-20/HEPES/pyruvate/HAT ή HT [πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM-20 που περιέχει 10 mM HEPES, 1 mM πυροσταφυλικό, 1X HAT ή 1X HT συμπλήρωμα]

- Μικροπλάκες καλλιέργειας 96 φρεατίων επίπεδου πυθμένα
- Μικροπλάκες καλλιέργειας 24 φρεατίων

Πρωτόκολλο εργασίας

Ανοσοποίηση του ζώου:

- 1) Προετοιμάζεται 0,5 mg πεπτιδίου Cys-προΤα(100-109) συζευγμένου με KLH ανά ζώο σε φυσιολογικό ορό και αναρροφάται σε σύριγγα.
- 2) Το CFA αναδεύεται καλά ώστε να διασπαρθούν οι βάκιλοι του μυκοβακτηρίου που καθιζάνουν στον πυθμένα του φιαλιδίου με το χρόνο. Μεταφέρεται όγκος CFA ίσος με τον όγκο του αντιγόνου σε μία νέα σύριγγα, η οποία συνδέεται με τη σύριγγα που περιέχει το αντιγόνο. Το αντιγόνο και το CFA γαλακτωματοποιούνται με συνεχή ανάμειξη.
- 3) Το γαλάκτωμα CFA/αντιγόνου μεταφέρεται σε σύριγγα με βελόνα 20G και ακολουθεί ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του περιεχομένου της σύριγγας σε κάθε ποντίκι.
- 4) Ακολουθούν αναμνηστικές ανοσοποιήσεις ανά οκτώ εβδομάδες με περίπου την ίδια δόση αντιγόνου, αναμειγμένου με IFA. Το CFA αποφεύγεται στους αναμνηστικούς εμβολιασμούς, καθώς προκαλεί έντονη φλεγμονή και αύξηση των αντι-Tb αντισωμάτων.
- 5) Οι τίτλοι των αντισωμάτων προσδιορίζονται με έμμεση ELISA (ακινητοποίηση του αντιγόνου, δηλαδή του δεκαπεπτιδίου) 5 ημέρες μετά από κάθε αναμνηστική ανοσοποίηση.

Κυτταρική σύντηξη και επιλογή των υβριδωμάτων:

Μερικές ημέρες πριν από τη σύντηξη, η συγγενική μυελωματική κυτταρική σειρά ανακαλλιεργείται. Την ημέρα της σύντηξης (2 ημέρες μετά την τελευταία αναμνηστική δόση), αφαιρούνται οι σπλήνες των ζώων, ομογενοποιούνται και το εναϊρόρημα των σπληνοκυττάρων αναμειγνύεται με τα μυελωματικά κύτταρα. Η σύντηξη των κυττάρων πραγματοποιείται στους 37°C υπό την παρουσία PEG, η οποία προάγει τη σύντηξη των κυτταρικών μεμβρανών. Το προκύπτον ίζημα συλλέγεται και τοποθετείται σε τρυβλία καλλιέργειας. Μετά από επώαση με HAT και κύτταρα σιτιστές (feeders) για πάνω από 2 εβδομάδες, τα υβριδώματα είναι έτοιμα για διαλογή. Η αμινοπτερίνη (A) που περιέχεται στο HAT είναι μία ισχυρή τοξίνη που εμποδίζει τη μεταβολική οδό σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων. Το κενό που δημιουργείται καλύπτεται με τη χορήγηση των μεταβολιτών υποξανθίνης (H) και θυμιδίνης (T). Έτσι, τα σπληνικά κύτταρα μπορούν να επιζήσουν στο καλλιεργητικό

υλικό HAT και να πεθάνουν φυσιολογικά ύστερα από 1-2 εβδομάδες. Τα μυελωματικά κύτταρα που έχουν μεταβολική ανεπάρκεια δεν μπορούν να επιζήσουν στο HAT και έτσι τελικά, μόνο τα συντηγμένα κύτταρα επιζούν στην καλλιέργεια, καθώς διαθέτουν την αθανασία των μυελωματικών κυττάρων και τη μεταβολική επάρκεια των σπληνοκυττάρων (Εικόνα 2.11). Τα κύτταρα σιτιστές πιστεύεται ότι παρέχουν αυξητικούς παράγοντες που προωθούν τον πολλαπλασιασμό των υβριδωμάτων.

- 1) Μυελωματικά κύτταρα NSO ελέγχονται στο μικροσκόπιο ώστε να είναι σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης, υγιή και ικανοποιητικά στον αριθμό. Συλλέγονται, φυγοκεντρώνονται και επαναιωρούνται σε DMEM χωρίς ορό.
- 2) Παράλληλα θυσιάζονται τα ζώα που πήραν την αναμνηστική δόση και αφαιρείται υπό άσηπτες συνθήκες ο σπλήνας τους, όπως ακριβώς περιγράφηκε στην ενότητα 2.12. Τα σπληνοκύτταρα σε αυτήν την περίπτωση επαναιωρούνται σε DMEM χωρίς ορό.
- 3) Αναμειγνύονται τα μυελωματικά και τα κύτταρα του σπλήνα σε αναλογία 1:1 σε σωληνάριο των 50 mL, ο οποίος καλύπτεται με DMEM χωρίς ορό. Το κυτταρικό μείγμα φυγοκεντρείται στα 500xg για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Όσο τα κύτταρα είναι στη φυγόκεντρο, προετοιμάζεται το υδατόλουτρο (διπλά ποτήρια ζέσεως με νερό), μέσα στο οποίο θα γίνει η σύντηξη. Η κυτταρική σύντηξη εκτελείται στους 37°C με την τοποθέτηση του σωληναρίου που περιέχει το μικτό (NSO και σπληνοκύτταρα) κυτταρικό ίζημα στο αυτοσχέδιο υδατόλουτρο.
- 5) Προστίθεται 1 mL προθερμασμένης PEG (50% σε DMEM) στο μικτό κυτταρικό ίζημα στάγδην, αναδεύοντας τα κύτταρα με το άκρο της πιπέτας μετά από κάθε σταγόνα.
- 6) Χρησιμοποιώντας μία καθαρή πιπέτα, προστίθεται 1 mL προθερμασμένου DMEM χωρίς ορό με τον ίδιο τρόπο και στη συνέχεια προστίθενται ακόμα 7 mL από το διάλυμα αυτό. Μακροσκοπικά, τα πρώτα συσσωματώματα κυττάρων αρχίζουν να γίνονται ορατά σε αυτό το σημείο.
- 7) Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 500xg για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Ενώ τα κύτταρα είναι στη φυγόκεντρο, το υδατόλουτρο και το σωληνάριο που περιέχει DMEM-20/HEPES/pyruvate ξαναζεσταίνονται.
- 8) Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το σωληνάριο τοποθετείται στο ποτήρι ζέσεως. Προστίθενται αρχικά 10 mL προθερμασμένου DMEM-20/HEPES/pyruvate στο ίζημα και στη συνέχεια προστίθεται και επιπλέον όγκος από το ίδιο διάλυμα.
- 9) Προστίθενται 2 σταγόνες του εναιωρήματος σε κάθε φρεάτιο της μικροπλάκας 96 φρεατίων και η πλάκα επωάζεται για μία νύχτα στον κλίβανο.

Παρακολούθηση και σίτιση των κυττάρων:

- 1) Μετά από μία ημέρα επώασης, τα φρεάτια ελέγχονται σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο. Θα πρέπει να υπάρχει μία μονοστιβάδα βιώσιμων κυττάρων στο κάτω μέρος και συσσωματώματα κυττάρων από πάνω.
- 2) Προστίθενται 2 σταγόνες DMEM-20/HEPES/pyruvate/HAT σε κάθε φρεάτιο και η πλάκα μεταφέρεται πίσω στον κλίβανο.
- 3) Τις ημέρες 2, 3, 4, 5, 7, 9 και 11, αναρροφάται το ήμισυ του όγκου του κάθε φρεατίου και προστίθενται 2 σταγόνες DMEM-20/HEPES/pyruvate/HAT σε κάθε φρεάτιο. Εφόσον η συχνότητα σχηματισμού επιτυχημένων βιώσιμων υβριδωμάτων είναι $\leq 10^{-5}$ όταν προστίθεται HAT, ο κυτταρικός θάνατος θα γίνει εμφανής τις ημέρες 2 και 3, ενώ τα υπόλοιπα βιώσιμα κύτταρα δε θα είναι εμφανή μέχρι να διαιρεθούν. Μεταξύ των ημερών 7 και 9, συσσωματώματα υβριδωματικών κυττάρων γίνονται ορατά στο ανεστραμμένο μικροσκόπιο.
- 4) Την ημέρα 14, το πρωτόκολλο σίτισης επαναλαμβάνεται με τη χρήση DMEM-20/HEPES/pyruvate/HT για τη θρέψη των κυττάρων.
- 5) Την ημέρα 15 προστίθεται DMEM-20/HEPES/pyruvate χωρίς HAT ή HT. Τα υβριδώματα είναι έτοιμα για διαλογή όταν τα περισσότερα από τα φρεάτια που περιέχουν αναπτυσσόμενα κύτταρα έχουν 10% έως 25% κάλυψη ή όταν το θρεπτικό τους υλικό καταναλώνεται (κιτρινίζει) μέσα σε 2 ημέρες από τη σίτισή τους.

Έλεγχος των υπερκειμένων των υβριδωμάτων:

Η συντριπτική πλειοψηφία των φρεατίων δε θα περιέχει υβριδώματα που παράγουν το επιθυμητό αντίσωμα ή μπορεί να περιέχει υβριδώματα που δεν είναι παραγωγικά. Ο σκοπός της διαλογής είναι να εντοπιστούν τα φρεάτια (<1% έως 5%) που περιέχουν υβριδώματα τα οποία να εκκρίνουν το επιθυμητό αντίσωμα.

- 1) Τα βιώσιμα υβριδώματα αφήνονται στον κλίβανο να αναπτυχθούν χωρίς σίτιση για 2 ημέρες. Αυτό είναι συνήθως αρκετό ώστε στο υπερκείμενο της καλλιέργειας να υπάρχει ικανοποιητική συγκέντρωση αντισώματος (κορεσμός).
- 2) Αφαιρούνται 100 μ L από κάθε φρεάτιο και ελέγχονται με έμμεση ELISA.

Καθιέρωση των υβριδωμάτων:

- 1) Μόλις τα υποψήφια υβριδώματα ταυτοποιηθούν, τα κύτταρα καταψύχονται και κλωνοποιούνται με «περιοριστική αραίωση». Μεταφέρεται όλο το περιεχόμενο του κύριου φρεατίου σε ένα φρεάτιο μικροπλάκας 24 φρεατίων.

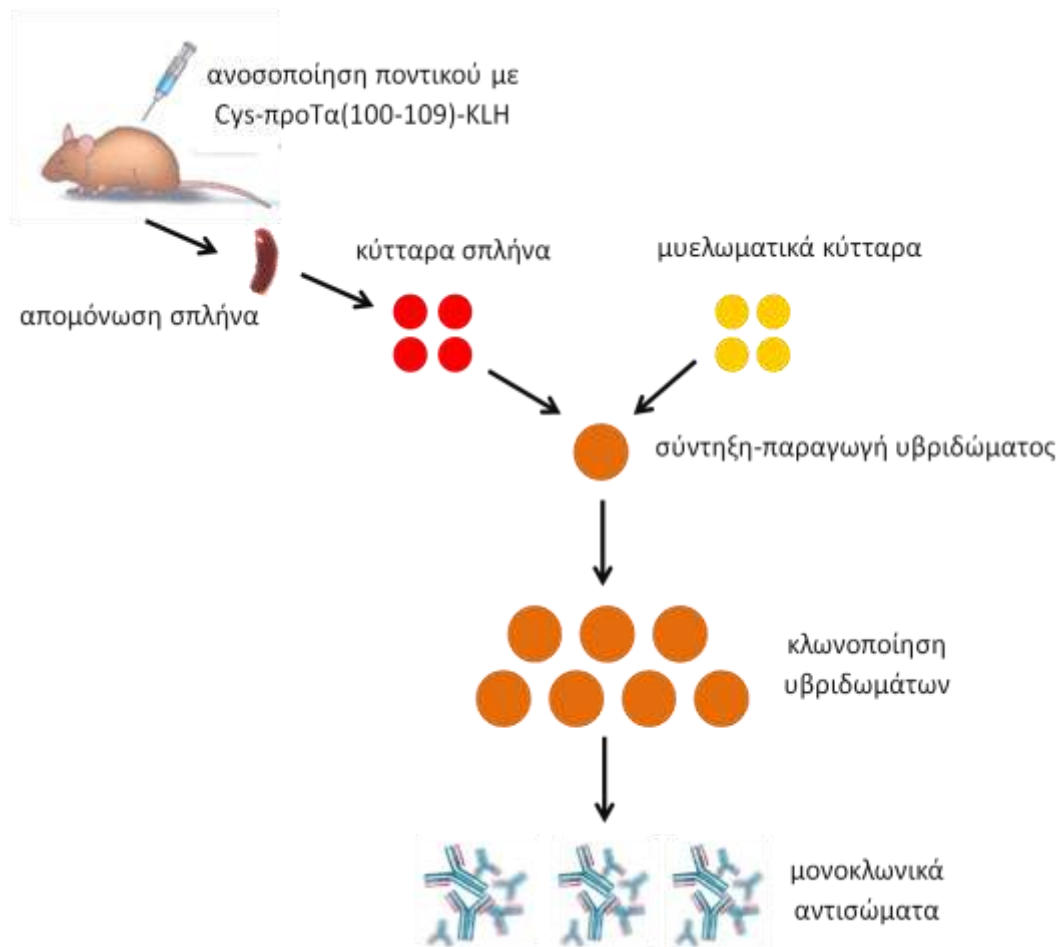
- 2) Προστίθενται στα κύτταρα του αρχικού φρεατίου 3 σταγόνες DMEM-20/HEPES/pyruvate και 1-1,5 mL από το ίδιο θρεπτικό υλικό στο νέο φρεάτιο. Ακολουθεί επώαση για 2-3 ημέρες στον κλίβανο.
- 3) Μετά το πέρασμα των 2-3 ημερών, τα κύτταρα είναι έτοιμα για τη διαδικασία της κλωνοποίησης, ενώ ένα μέρος φυγοκεντρείται στα 500xg για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο συλλέγεται για περαιτέρω χαρακτηρισμό του αντισώματος και το ίζημα των κυττάρων παγώνεται.

Κλωνοποίηση:

Η κλωνοποίηση απαιτείται ώστε να αποφευχθούν τα προβλήματα της πολυειδικότητας και να ελαχιστοποιηθεί η υπερανάπτυξη κυττάρων που δεν είναι παραγωγικά.

- 1) Επαναιωρείται το υποψήφιο υβρίδωμα και εκτιμάται η βιωσιμότητα ενός μικρού κλάσματος των κυττάρων με Trypan blue.
- 2) Ετοιμάζονται 10 mL κυττάρων με 50 βιώσιμα κύτταρα/mL και 10 mL με 5 βιώσιμα κύτταρα/mL σε θρεπτικό υλικό κλωνοποίησης. Ο βαθμός αραιώσεως είναι συνήθως πολύ μεγάλος και έτσι μπορεί να χρειαστούν σειριακές αραιώσεις.
- 3) Σε μικροπλάκα 96 φρεατίων μοιράζονται τα κυτταρικά εναιωρήματα (200 μ L/φρεάτιο) και η πλάκα επωάζεται για 7 ημέρες στον κλίβανο. Δοκιμάζονται αραιώσεις 10 κύτταρα/φρεάτιο έως και 1 κύτταρο/φρεάτιο, ώστε να καθοριστεί η βέλτιστη αραιώση για την ανάπτυξη των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα πρωτογενή υβριδώματα έχουν γενικά «φτωχή απόδοση» και ως εκ τούτου, πρέπει να τοποθετούνται σε κάθε φρεάτιο αρκετά κύτταρα, ώστε να προκύψει ένας εύλογος αριθμός κλώνων που θα αρχίσει να αυξάνεται.
- 4) Αναζητούνται φρεάτια με μονοκλωνικότητα στο ανεστραμμένο μικροσκόπιο πριν τη σίτιση των κυττάρων και συγκεκριμένα, αναζητούνται μονά συσσωματώματα κυττάρων στα φρεάτια αυτά.
- 5) Η ανάλυση διαλογής που χρησιμοποιήθηκε για την αρχική αναγνώριση, χρησιμοποιείται και για τον έλεγχο των φρεατίων με το επιθυμητό αντίσωμα τις ημέρες 7 έως 14.
- 6) Όταν ο επιθυμητός κλώνος αναγνωριστεί, τα κύτταρα εκπύσσονται σε ικανοποιητικό αριθμό και καταψύχονται.
- 7) Επανακλωνοποιούνται κάποιοι από τους θετικούς κλώνους, ενώ μόλις αυξηθούν, καταψύχονται άμεσα.

- 8) Μεταφέρεται το προϊόν της κάθε επανακλωνοποίησης σε DMEM-10/HEPES/pyruvate. Το επιθυμητό υβρίδωμα θα πρέπει να είναι πλέον σταθερό, όπως μία κυτταρική σειρά.
- 9) Καταψύχονται πολλαπλά φιαλίδια από διαφορετικές ημέρες με διαφορετικά δείγματα.
- 10) Αποψύχονται αντιπροσωπευτικά φιαλίδια και ελέγχονται τα κύτταρα για την ικανότητα ανάπτυξής τους και το υπερκείμενο των καλλιιεργειών για την περιεκτικότητά του σε αντίσωμα, ενώ καθορίζεται και ο ισότυπος του μονοκλωνικού αντισώματος.



Εικόνα 2.11. Διαδικασία παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων. Ποντίκι ανοσοποιείται με το επιθυμητό αντιγόνο [Cys-προΤα(100-109) συζευγμένο με KLH] και μόλις το ζώο δώσει ικανοποιητική αντισωματική απόκριση, αφαιρείται ο σπλήνας και παρασκευάζεται εναιώρημα κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα συντήκονται με συγγενική κυτταρική σειρά από μνέλωμα και το μείγμα της σύντηξης καλλιεργείται. Τα φρεάτια που περιέχουν αναπτυσσόμενα κύτταρα ελέγχονται για την παραγωγή του επιθυμητού αντισώματος και αν βρεθούν θετικά, οι καλλιέργειες κλωνοποιούνται.

2.15. Παρασκευή πολυκλωνικών αντισωμάτων

Η παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων διαρκεί λιγότερο χρόνο και απαιτεί λιγότερη προσπάθεια σε σχέση με την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων. Επίσης, χρειάζεται σχετικά απλός και εύκολα διαθέσιμος εξοπλισμός, ενώ παράγει αντιδραστήρια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανοσοκατακρήμνιση, ανοσοσύτρωμα και ανοσοδοκιμασίες. Το κουνέλι είναι το σύνηθες ζώο επιλογής για την παραγωγή πολυκλωνικών αντιορών, επειδή αποκλίνει γενετικά από τον άνθρωπο και μπορεί να παρέχει 25 mL ορού από κάθε αφάιμαξη χωρίς επιβλαβείς επιπτώσεις για το ζώο (Εικόνα 2.12).

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Αντιγόνο: Cys-προΤα(100-109) συζευγμένο με KLH
- Ελεύθερα παθογόνων κουνέλια Νέας Ζηλανδίας
- CFA
- IFA
- Θρεπτικό υλικό DMEM

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) 2 λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας ενίονται ενδοδερμικά με το δεκαπεπτίδιο, το οποίο προετοιμάζεται όπως ακριβώς και για τη διαδικασία παραγωγής των μονοκλωνικών αντισωμάτων (§ 2.14).
- 2) Η διαφορά είναι ότι για την παραγωγή των πολυκλωνικών αντισωμάτων στα κουνέλια η πρώτη αναμνηστική δόση αντιγόνου χορηγείται μετά από 6 εβδομάδες και οι επόμενες κάθε 4 εβδομάδες.
- 3) Συλλέγεται αίμα 7-10 ημέρες μετά από κάθε αναμνηστική ένεση, αφήνεται να πήξει και φυγοκεντρείται στα 300xg για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Λαμβάνονται οι οροί, οι οποίοι επειδή περιέχουν τα αντισώματα ονομάζονται πλέον αντιοροί, και μεταφέρονται σε καθαρά σωληνάρια. Από τον αντιορό και ακολουθώντας συγκεκριμένη διαδικασία (§ 2.16), απομονώνονται οι ειδικές για το αντιγόνο ανοσοσφαιρίνες.
- 5) Ελέγχονται με έμμεση ELISA για τον τίτλο των αντισωμάτων και στη συνέχεια αποθηκεύονται στους -80°C.



Εικόνα 2.12. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων παραγωγής πολυκλωνικών αντισωμάτων. Κουνέλι Νέας Ζηλανδίας ανοσοποιείται με το αντιγόνο, δηλαδή το δεκαπεπτίδιο Cys-προΤα(100-109) συζευγμένο με KLH, απομονώνεται ο αντιορός του και φορτώνεται σε στήλη συγγένειας. Οι ειδικές IgG εκλούνται και ελέγχονται με έμμεση ELISA.

2.16. Πρωτόκολλο απομόνωσης των ειδικών για το δεκαπεπτίδιο ανοσοσφαιρινών τάξης G (IgG) από τον αντιγόνο του κουνελιού

Η ανάκτηση συγκεκριμένων ανοσοσφαιρινών τάξης G από ένα πολύπλοκο μείγμα αντισωμάτων γίνεται εύκολα και γρήγορα, χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμες στήλες καθαρισμού πρωτεΐνης A ή G.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Στήλη καθαρισμού πρωτεΐνης G PROTEUS (ABD Serotec, MorphoSys)
- Ρητίνη Sulfo-Link (Pierce, Rockford, IL, USA)
- Διάλυμα DPBS
- Διάλυμα κιτρικού οξέος 0,1 M (ROTH, Essen, Germany)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl 0,5 M
- Τριοξική μεμβράνη κυτταρίνης 20 kDa (Sartorius, Göttingen, Germany)

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Οι ειδικές για το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) IgG απομονώνονται χρησιμοποιώντας το τροποποιημένο με την κυστεΐνη πεπτίδιο, που φέρει δύο επιπλέον κατάλοιπα β αλανίνης ως «spacer» [Cys-βAla-βAla-προΤα(100-109)], για την ειδική ακινητοποίησή του στη ρητίνη.
- 2) 2 mg του δεκαπεπτιδίου αυτού συζεύγνυται με 1 mL ρητίνης, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- 3) Μετά την απενεργοποίηση των υπολειμματικών αντιδραστικών ομάδων, 3 mL του αντιορού αραιώνονται με 3 mL DPBS και αναμειγνύονται όλη νύχτα στους 4°C.
- 4) Μετά από εντατικό ξέπλυμα της στήλης με DPBS, το αντίσωμα εκλούεται με 0,1 M κιτρικού οξέος (pH 2,5) και το έκλουσμα εξουδετερώνεται άμεσα με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl 0,5 M (pH 8,0).
- 5) Τα κλάσματα που περιέχουν αντισώματα συμπυκνώνονται σε τριοξική μεμβράνη κυτταρίνης 20 kDa και ξεπλένονται με DPBS. Η προκύπτουσα συγκέντρωση είναι 0,5 mg/mL.

2.17. Πρωτόκολλο ανταγωνιστικής ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) για τη μέτρηση του προΤα(100-109)

Στο συγκεκριμένο σύστημα ανταγωνιστικής ELISA, σημαίνεται με βιοτίνη το «αντιγόνο» [προΤα(100-109)] και ανταγωνίζεται με το αντιγόνο του δείγματος (μη σημασμένο) για την πρόσδεση στο αντίσωμα. Όσο λιγότερη ποσότητα αντιγόνου υπάρχει στο δείγμα, τόσο πιο πολύ σημασμένο αντιγόνο προσδένεται στο φρεάτιο και τόσο πιο ισχυρό σήμα καταγράφεται.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

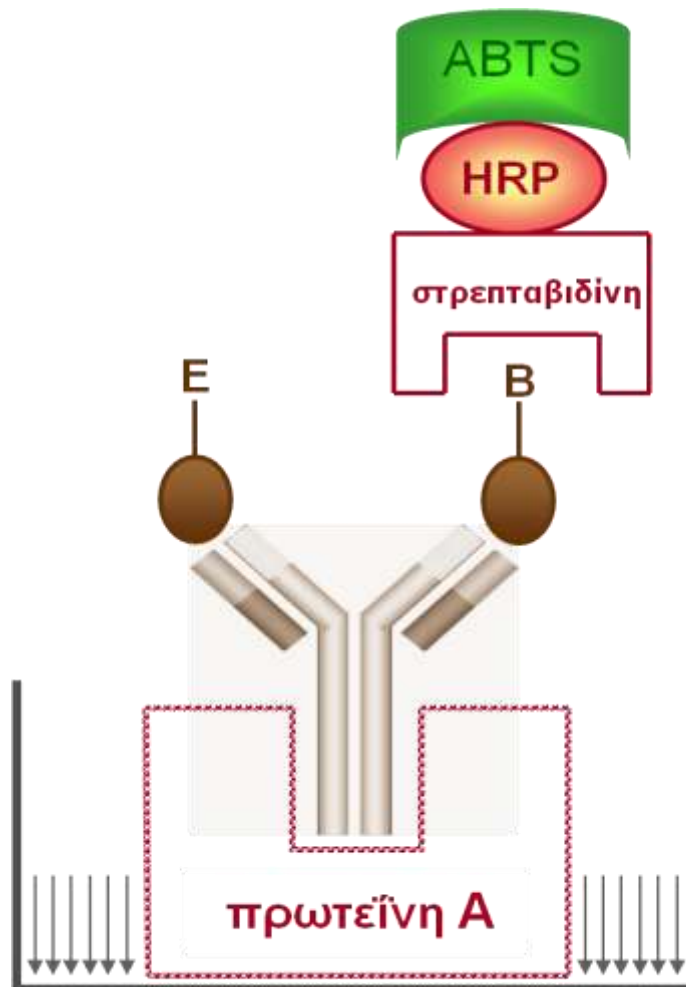
- Πρωτεΐνη Α, απομονωμένη από *Staphylococcus aureus* (Calbiochem, Darmstadt, Germany)
- Συζευγμένη με υπεροξειδάση (HRP) στρεπταβιδίνη (Jackson Immunoresearch, Dianova, Germany)
- BSA, κλάσμα V, pH 7,0 (PAA, Austria)
- Κιτρικό οξύ
- 2,2'-αζινο-δισ (3-αιθυλβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)-2NH₄ άλας (ABTS) χρωμογόνο για την υπεροξειδάση (SERVA, Heidelberg, Germany)
- Tween-20
- DPBS
- Ρυθμιστικό διάλυμα κορεσμού [2% w/v BSA σε DPBS]
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης [8 g NaCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,2 g KCl και 0,24 g KH₂PO₄ σε 1 L νερό, pH 7,4 και προστίθεται 0,05% v/v Tween 20]
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης [0,5% w/v BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης]
- Διάλυμα υποστρώματος [10 mg ABTS διαλυμένα σε 1 mL νερού αραιώνονται με 9 mL ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος (2,1 g κιτρικού οξέος διαλυμένα σε 100 mL νερού) και προστίθενται 10 μL H₂O₂ (30%), pH 4,5]
- Μικροπλάκες 96 φρεατίων Maxisorp (VWR International, Pennsylvania, USA)
- Αναδευτήρας DTS-2 (Neolab, Heidelberg, Germany)
- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών SpectraFluor (Tecan, Männedorf, Switzerland)

Πρωτόκολλο εργασίας (Εικόνα 2.13)

- 1) Μικροπλάκα 96 φρεατίων επιστρώνεται με πρωτεΐνη Α (10 μg/mL σε DPBS, 100 μL/φρεάτιο) και επώαζεται όλη νύχτα στους 4°C (ή εναλλακτικά 1 ώρα, στους 37°C).

Η πρωτεΐνη A προέρχεται από το βακτήριο *Staphylococcus aureus* και έχει την ιδιότητα να προσδένει την Fc περιοχή των ανοσοσφαιρινών IgG.

- 2) Παράλληλα, επωάζονται οι ειδικές για το δεκαπεπτίδιο IgG (0,75 µg/mL) με βιοτινυλιωμένο προΤα(100-109) (5 ng/mL) και ελεύθερο προΤα(100-109) (0,1 ng/mL-10 µg/mL) προς ανταγωνισμό, όλη νύχτα στους 4°C.
- 3) Την επόμενη μέρα, η πλάκα ξεπλένεται με DPBS και οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης καλύπτονται με διάλυμα κορεσμού (200 µL/φρεάτιο) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) 100 µL του προεπωασμένου μείγματος μεταφέρονται στην πλάκα, η οποία επωάζεται για 75 λεπτά στους 37°C σε αναδευτήρα στις 400 στροφές.
- 5) Ακολουθεί έκπλυση με διάλυμα πλύσης και προστίθενται 100 µL/φρεάτιο συζευγμένης με υπεροξειδάση (HRP) στρεπταβιδίνης σε διάλυμα αραιώσης (1/5000) και η πλάκα επωάζεται περαιτέρω για 90 λεπτά στους 37°C. Η στρεπταβιδίνη είναι απομονωμένη από το βακτήριο *Streptomyces avidinii* και δεσμεύει τη βιοτίνη (ικανότητα σύνδεσης 10 µg βιοτίνης ανά mg στρεπταβιδίνης).
- 6) Μετά από εντατική έκπλυση με διάλυμα πλύσης, 100 µL/φρεάτιο διαλύματος ενζυμικού υποστρώματος ABTS προστίθενται στην πλάκα, η οποία επωάζεται για 20 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
- 7) Τέλος, η οπτική πυκνότητα μετριέται σε μετρητή ELISA στα 405 nm.



Εικόνα 2.13. Σχηματική αναπαράσταση της ανταγωνιστικής ELISA για το προΤα(100-109). Μικροπλάκα επιστρώνεται με πρωτεΐνη Α και οι θέσεις μη ειδικής δέσμευσης καλύπτονται (↓↓↓↓) με BSA. Το προεπωασμένο μείγμα των ειδικών για το δεκαπεπτίδιο IgG και των δύο πεπτιδίων, ελεύθερου (E) και βιοτυνλιωμένου (B) προΤα(100-109), μοιράζεται στη μικροπλάκα, προστίθεται συζευγμένη με υπεροξειδάση (HRP) στρεπταβιδίνη και ABTS. Η πλάκα αποκτά πράσινο χρώμα και φωτομετρείται στα 405 nm.

2.18. Πρωτόκολλο DELFIA (Dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay) για τη μέτρηση του προΤα(100-109)

Η DELFIA είναι φθορισμομετρική μέθοδος, που χρησιμοποιείται εναλλακτικά των παραδοσιακών ELISA, στις οποίες απαιτείται ένζυμο για την παραγωγή σήματος. Στην DELFIA, δεν είναι απαραίτητη η χρήση ενζύμου, καθώς χρησιμοποιείται στη θέση του φθορίζον χηλικός παράγοντας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται αντίσωμα σημασμένο με Europium (Eu^{3+}), χημικό στοιχείο της σειράς των λανθανιδών, το οποίο είναι πρακτικά μη-φθορίζον. Με την προσθήκη διαλύματος ενίσχυσης, το Europium απελευθερώνεται μέσα σε λίγα λεπτά λόγω του χαμηλού pH του διαλύματος και σχηματίζει ταχέως μία νέα εξαιρετικά φθορίζουσα χηλική ένωση. Ο φθορισμός μετρείται άμεσα σε ειδικό μετρητή (Εικόνα 2.14).

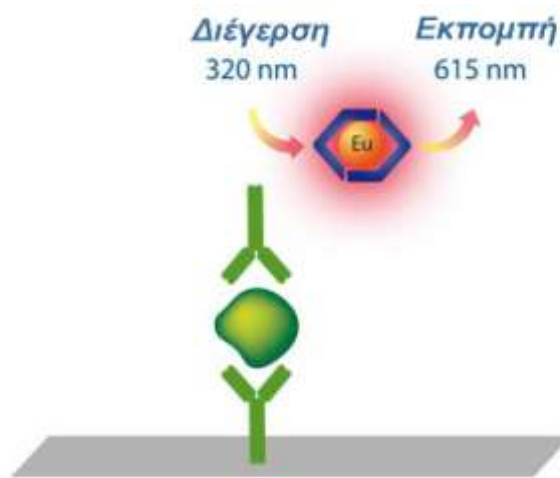
Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Διάλυμα κορεσμού [2% w/v BSA σε DPBS]
- Διάλυμα πλύσης (κωδικός 1244-114, Perkin Elmer, Massachusetts, USA)
- Διάλυμα αραιώσης (κωδικός 1244-111, Perkin Elmer)
- Διάλυμα ενίσχυσης (κωδικός 1244-105, Perkin Elmer)
- Διάλυμα στρεπταβιδίνης συζευγμένης με Europium (κωδικός 1244-360, Perkin Elmer)
- Πλάκες Maxisorp
- Μετρητής Wallac 1420 Victor Multilabel

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Μικροπλάκα 96 φρεατίων επιστρώνεται με πρωτεΐνη A (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε DPBS, 50 $\mu\text{L}/\text{φρεάτιο}$) και επωάζεται όλη νύχτα στους 4°C στο σκοτάδι.
- 2) Παράλληλα, επωάζονται οι ειδικές για το δεκαπεπτίδιο IgG (0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) με βιοτινυλιωμένο προΤα(100-109) (5 ng/mL) και ελεύθερο προΤα(100-109) (0,1 ng/mL -10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) προς ανταγωνισμό, όλη νύχτα στους 4°C .
- 3) Την επόμενη μέρα, η πλάκα ξεπλένεται με DPBS και οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης καλύπτονται με διάλυμα κορεσμού (200 $\mu\text{L}/\text{φρεάτιο}$) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Ακολουθεί επιμελής πλύση της πλάκας με διάλυμα πλύσης (200 $\mu\text{L}/\text{φρεάτιο}$) 3 φορές και στο τέλος γίνεται πλύση με DPBS.

- 5) 50 μL του προεπωασμένου μείγματος μεταφέρονται στην πλάκα, η οποία επωάζεται για 75 λεπτά σε αναδευτήρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6) Ακολουθεί πλύση με διάλυμα πλύσης 5 φορές, πλύση με DPBS και προστίθενται 50 μL /φρεάτιο συζευγμένης με Europium στρεπταβιδίνης σε διάλυμα αραίωσης (1/500).
- 7) Η πλάκα επωάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- 8) Μετά από έκπλυση με διάλυμα πλύσης, προστίθεται διάλυμα ενίσχυσης (100 μL /φρεάτιο) στην πλάκα, η οποία επωάζεται για 10 λεπτά στο σκοτάδι σε αναδευτήρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- 9) Τέλος, ο φθορισμός μετριέται σε ειδικό μετρητή στα 615 nm.



Εικόνα 2.14. Σχηματική αναπαράσταση της DELFIA. Χρησιμοποιείται πλάκα επικαλυμμένη με αντίσωμα για να εντοπίσει τον αναλύτη-στόχο στο δείγμα και ένα επισημασμένο με Europium (Eu^{3+}) αντίσωμα. Μετά την τελική πλύση, προστίθεται ειδικό διάλυμα ενίσχυσης ώστε να αποσυνδεθεί το Eu^{3+} και να σχηματίσει μία νέα, εξαιρετικά φθορίζουσα χηλική ένωση. Η χηλική αυτή ένωση διεγείρεται στα 320 nm και ο φθορισμός της μετριέται στα 615 nm.

2.19. Μέθοδοι κατακρήμνισης πρωτεϊνών από ορούς ανθρώπου και ποντικού

Οι πρωτεΐνες υψηλής αφθονίας του ορού/πλάσματος (όπως αλβουμίνη, τρανσφερίνη, απτοσφαιρίνη, ανοσοσφαιρίνες και λιποπρωτεΐνες) παρεμβαίνουν και καθιστούν προβληματική την αντίχνευση πρωτεϊνών/πεπτιδίων στα βιολογικά υγρά, ειδικά όταν είναι μικρής μοριακής μάζας ή/και βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Ως εκ τούτου, η απομάκρυνση μεγαλομοριακών πρωτεϊνών από τέτοια δείγματα είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών που είναι παρούσες σε μικρές ποσότητες. Για την απομάκρυνση των υψηλού μοριακού βάρους πρωτεϊνών του ορού, συνήθως χρησιμοποιούνται μέθοδοι κατακρήμνισης.

Διαφορική διαλυτοποίηση (Differential Solubilization, DS):

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Διάλυμα μετουσίωσης [2 M θειουρία, 7 M ουρία και 20 mM διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol, DTT)]
- Διάλυμα ACN-HCl [70% ακετονιτρίλιο με 12 mM HCl]
- Καθαρή ακετόνη (Riedel-de Haën, Hanover, Germany)
- Συσκευή εξάτμισης Savant Speed Vac (ThermoQuest, Egelsbach, Germany)

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Προστίθενται στον ορό 2 όγκοι από το διάλυμα μετουσίωσης αργά.
- 2) Αμέσως μετά προστίθενται 3,5 όγκοι κρύας ακετόνης και ακολουθεί καλή ανάμειξη.
- 3) Τα δείγματα επωάζονται για 1 ώρα στους 4°C υπό ανάδευση.
- 4) Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 19.000xg, για 15 λεπτά στους 4°C και συλλέγονται τα υπερκείμενα σε καθαρά σωληνάρια.
- 5) Προστίθενται 2 όγκοι από το διάλυμα του ACN-HCl, αναμειγνύονται καλά και επωάζονται για 1 ώρα στους 4°C υπό ανάδευση.
- 6) Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση στα 19.000xg, για 15 λεπτά στους 4°C και συλλέγονται τα υπερκείμενα σε καθαρά σωληνάρια.
- 7) Τα υπερκείμενα εξατμίζονται στο Speed Vac και είναι έτοιμα προς χρήση.

Απομάκρυνση της αλβουμίνης:

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

Εμπορικά διαθέσιμο kit, Biosepra-Blue Trisacryl (Pall Life Sciences, Germany)

- Κολώνες
- Υλικό Blue Trisacryl
- Διάλυμα δέσμευσης/πλύσης

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Προστίθεται ίσος όγκος του υλικού Blue Trisacryl στις ειδικές κολώνες με φίλτρο που παρέχει το kit.
- 2) Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 19.000xg για 1 λεπτό, το υλικό μένει πάνω από το φίλτρο και το υγρό που περνά κάτω από το φίλτρο απορρίπτεται.
- 3) Προστίθεται 0,5 mL νερού σε κάθε κολώνα, ακολουθεί καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό. Το υγρό που πέρασε κάτω από το φίλτρο απορρίπτεται και ακολουθεί μία ακόμα πλύση με νερό με τον ίδιο τρόπο.
- 4) Προστίθεται ορός σε αναλογία 1:1 με διάλυμα δέσμευσης pH 7, ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση ενός λεπτού. Οι κολώνες επωάζονται για 3 λεπτά σε πάγο.
- 5) Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό και το υγρό που περνά από το φίλτρο συλλέγεται και περνιέται εκ νέου από το φίλτρο της κολώνας. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές μέχρι να συλλεχθεί ο όγκος που αντιστοιχούσε στην αρχική ποσότητα ορού.

Κατακρήμνιση με ακετόνη:

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Καθαρή ακετόνη
- Συσκευή εξάτμισης Savant Speed Vac

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Τρεις όγκοι κρύας ακετόνης προστίθενται σε κάθε δείγμα ορού, ο οποίος αποκτά νεφελώδη σύσταση.
- 2) Τα δείγματα φυλάσσονται όλη νύχτα στους -20°C.
- 3) Την επόμενη μέρα, τα δείγματα φυγοκεντρώνται (10.000xg, 4°C) για 30 λεπτά και τα υπερκείμενα συλλέγονται σε καθαρά σωληνάρια (**Εικόνα 2.15**).
- 4) Η ακετόνη εξατμίζεται στο Speed Vac και τα δείγματα αναλύονται άμεσα.



Εικόνα 2.15. Οροί μετά από κατακρήμνιση με ακετόνη. Οι οροί μετά την προσθήκη κρύας ακετόνης διατηρούνται όλη νύχτα στους -20°C και την επόμενη μέρα φυγοκεντρώνονται σε υψηλές στροφές. Διακρίνονται οι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους ως λευκωπό ίζημα.

2.20. Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-flight mass spectrometry)

Πρόκειται για ήπια τεχνική ιονισμού που χρησιμοποιείται στη φασματομετρία μάζας, επιτρέποντας την ανάλυση βιομορίων (πρωτεϊνών, πεπτιδίων, σακχάρων) και μεγάλων οργανικών μορίων, τα οποία τείνουν να είναι εύθραυστα και να θραυσματοποιούνται, όταν ιονίζονται με συμβατικές μεθόδους ιονισμού. Επίσης, χρησιμοποιούνται διάφορες χημικές ενώσεις (όπως είναι τα παράγωγα του βενζοϊκού ή του σιναιπινικού οξέως) ως υποστρώματα (matrix), διευκολύνοντας την αποδέσμευση και τον ιονισμό των προς ανάλυση δειγμάτων. Η μέθοδος μέτρησης της μάζας των σωματιδίων προς το φορτίο που ονομάζεται «χρόνος πτήσης» (TOF) γίνεται ως εξής: ιόν με άγνωστη μάζα που φορτίζεται μετά από συγκρυστάλλωση με το υπόστρωμα εισέρχεται σε ένα φασματόμετρο μάζας και επιταχύνεται από ηλεκτρικό πεδίο γνωστής δύναμης. Η επιτάχυνση αυτή καταλήγει στο να αποκτήσουν τα ιόντα την ίδια κινητική ενέργεια, δεδομένου ότι όλα έχουν το ίδιο φορτίο. Η ταχύτητα του ιόντος εξαρτάται, ωστόσο, από την αναλογία μάζας προς φορτίο. Ο όρος MALDI αναφέρεται στην τεχνική ιονισμού του δείγματος στην πηγή, ενώ ο όρος TOF αφορά την τεχνική διάκρισης των ιόντων στον αναλυτή (**Εικόνα 2.16**).

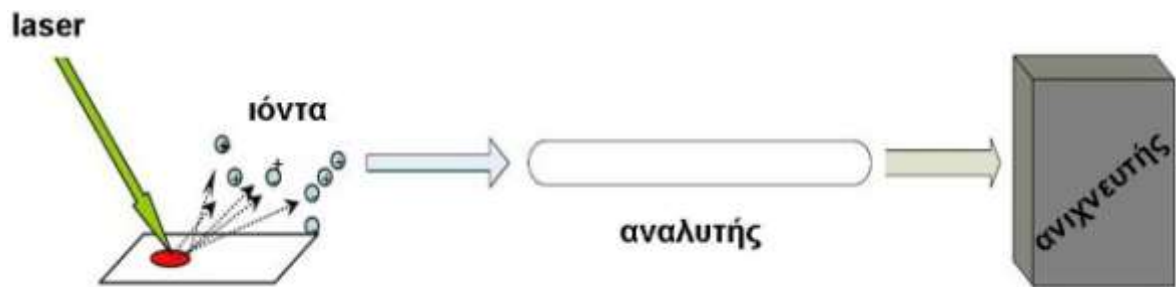
Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Πρότυπο πεπτιδικό διάλυμα βαθμονόμησης (Peptide Calibration Standard II; Bruker Daltonik)
- 2,5-διωδροξυβενζοϊκό οξύ (DHB) ως υπόστρωμα (matrix) (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα υποστρώματος [10 mg DHB διαλυμένα σε 50% ACN και 0,1% TFA]
- Χρυσή πλάκα-στόχος φασματομέτρου μάζας (Bruker Daltonik)
- MALDI-TOF φασματόμετρο μάζας (Bruker Reflex IV, Bruker Daltonik)

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Στην πλάκα-στόχο, επιστρώνεται 0,5 μL από το προς ανάλυση δείγμα και 0,5 μL από το πρότυπο πεπτιδικό διάλυμα βαθμονόμησης.
- 2) Ακολούθως προστίθεται 1 μL από το διάλυμα υποστρώματος και αναδεύεται ήπια με το προς ανάλυση δείγμα. Η πλάκα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τα δείγματα να στεγνώσουν πλήρως και να σχηματιστούν κρύσταλλοι, οι οποίοι είναι ορατοί με γυμνό μάτι.
- 3) Τότε η πλάκα τοποθετείται εντός του φασματόμετρου μάζας και ξεκινά η ανάλυση.

- 4) Η τάση επιτάχυνσης (accelerating voltage) για τα παραγόμενα πεπτιδικά ιόντα ρυθμίζεται στα 20 kV. Αρχικά συλλέγονται φάσματα από το φρεάτιο με το πρότυπο πεπτιδικό διάλυμα βαθμονόμησης και με βάση την ακριβή μάζα των πεπτιδίων που περιέχει, ελέγχεται η ακρίβεια των πεπτιδικών κορυφών που αναγνωρίζονται (external calibration).
- 5) Η ανάλυση συνεχίζεται με τη συλλογή φασμάτων πεπτιδικών κορυφών μάζας 700-2750 m/z, μετά από σύνολο 300 διεγέρσεων ιονισμού με το laser.
- 6) Από το τελικό φάσμα πεπτιδικών κορυφών (πεπτιδικό αποτύπωμα) κάθε δείγματος, με τη χρήση λογισμικού προσδιορίζεται η ακριβής μάζα κάθε πεπτιδικής κορυφής στο φάσμα.
- 7) Γίνεται σύγκριση των πεπτιδικών μαζών που παρατηρήθηκαν στο φάσμα, με τις θεωρητικές πεπτιδικές κορυφές που προκύπτουν από τον ιονισμό του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109). Στη σύγκριση αυτή τίθενται ως όρια ανοχής $\pm 0,2$ Da απόκλιση από τη θεωρητικά υπολογισμένη μάζα του πεπτιδίου.



Εικόνα 2.16. Σχηματική αναπαράσταση της βασικής αρχής λειτουργίας ενός MALDI-TOF φασματόμετρου μάζας. Τα ιόντα του δείγματος επιταχύνονται από την πηγή (laser) και εισάγονται στο σωλήνα πτήσης. Για μια δεδομένη ενέργεια, όσο βαρύτερο είναι ένα ιόν, τόσο πιο αργά «ταξιδεύει». Έτσι, ο χρόνος που χρειάζεται ένα ιόν για να διασχίσει την απόσταση από τον αναλυτή μέχρι τον ανιχνευτή προσδιορίζει τη μάζα του.

2.21. Επαγωγή συνθηκών κυτταρικού θανάτου

Δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες έχουν ήδη αποκαλύψει μία συνθήκη παραγωγής του ανοσοδραστικού δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε συνθήκες κυτταρικού θανάτου (Enkemann et al., 2000b; Evstafieva et al., 2000, 2003). Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι κατά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, την απόπτωση, η προΤα υπόκειται σε πέψη από τις ενεργοποιημένες κασπάσες 3 και 7 στο αμινοξύ D⁹⁹, παράγοντας με αυτόν τον τρόπο, το προΤα(100-109). Γνωρίζοντας, λοιπόν, ότι το γεγονός αυτό λαμβάνει χώρα ιδιαίτερα πρώιμα κατά την απόπτωση, κύτταρα HeLa, που φυσιολογικά υπερεκφράζουν την προΤα, οδηγήθηκαν σε απόπτωση με τη χρήση διαφορετικών επαγωγικών παραγόντων, ενώ παράλληλα, τα ίδια κύτταρα οδηγήθηκαν και σε νεκρωτικό θάνατο. Στη συνέχεια, η ίδια μέθοδος εφαρμόστηκε και σε άλλες κυτταρικές σειρές, καθώς και σε λευκοκυτταρικούς υποπληθυσμούς.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Καλλιέργεια κυττάρων
- Φλάσκες καλλιέργειας με φίλτρο
- Μικροπλάκες καλλιέργειας 6 φρεατίων
- RPMI-1640
- Διάλυμα HEPES
- TNF-α
- Διάλυμα εμετίνης (αναστολέας της πρωτεϊνσύνθεσης μέσω δέσμευσης στη 40S υπομονάδα του ριβοσώματος) (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα ακτινομυκίνης D (αναστολέας της μεταγραφής) (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα δοξορουβικίνης (αναστολέας της βιοσύνθεσης μακρομορίων) (Sigma-Aldrich)
- Αναστολέας πρωτεασών Complete Mini (Roche)

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Τα κύτταρα αποκολλώνται από τη φλάσκα και εκτιμάται η βιωσιμότητά τους με Trypan blue. Εφόσον είναι $\geq 95\%$, τα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις πειραματικές διαδικασίες.

- 2) Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 300xg για 5 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση $0,5 \times 10^6$ κύτταρα/mL.
- 3) Τα κύτταρα επιστρώνονται σε μικροπλάκες 6 φρεατίων και μεταφέρονται στον κλίβανο, ώστε να προσκολληθούν στον πυθμένα των φρεατίων.
- 4) Την επόμενη μέρα, τα κύτταρα έχουν καλύψει τον πυθμένα των φρεατίων και είναι έτοιμα για την επαγωγή κυτταρικού θανάτου.
- 5) Το υπερκείμενο των φρεατίων απορρίπτεται και ακολουθεί προσεκτική πλύση με DPBS προς απομάκρυνση όσων κυττάρων αιωρούνται, άρα δεν είναι ζωντανά.
- 6) Προστίθεται στα φρεάτια θρεπτικό υλικό χωρίς ορό που περιέχει τους επαγωγικούς παράγοντες της απόπτωσης/νέκρωσης και οι πλάκες τοποθετούνται στον κλίβανο προς επώαση. Τα κύτταρα χωρίστηκαν σε ομάδες που επώαστηκαν με:
 - θρεπτικό υλικό (μάρτυρας)
 - 5, 10 και 20 ng/mL TNF- α
 - 5 ng/mL TNF- α και 1 μ g/mL εμετίνη
 - 5 ng/mL TNF- α και 5 μ g/mL ακτινομυκίνη D
 - 0,1, 1, 10 και 100 μ g/mL δοξορουβικίνη
- 7) Μετά το πέρας του επιθυμητού χρονικού διαστήματος (4 ώρες), το υπερκείμενο των φρεατίων συλλέγεται, φυγοκεντρείται στα 300xg για 5 λεπτά, μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο που περιέχει αναστολέα πρωτεασών και καταψύχεται στους -20°C μέχρι να αναλυθεί.

2.22. Έλεγχος αποπτωτικών-νεκρωτικών δεικτών με κυτταρομετρία ροής

Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα και χαρακτηριστικά μορφολογικά γνωρίσματα, μεταξύ των οποίων η απώλεια της ασυμμετρίας της πλασματικής μεμβράνης. Στα αποπτωτικά κύτταρα, το μεμβρανικό φωσφολιπίδιο φωσφατιδυλοσερίνη (PS) μετατοπίζεται από την εσωτερική προς την εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και έτσι εκτίθεται στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Η αννεξίνη V (Annexin V) είναι μία 35-36 kDa Ca^{2+} εξαρτώμενη πρωτεΐνη δέσμησης φωσφολιπιδίων, η οποία εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τη PS, και συνδέεται με τα κύτταρα που την έχουν εκτεθειμένη στην επιφάνειά τους. Η αννεξίνη V μπορεί να συζευχθεί με φθοριοχρώματα, όπως το FITC, και συνεπώς να χρησιμεύσει ως ανιχνευτής των κυττάρων που οδηγούνται σε απόπτωση μέσω ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής. Καθώς η μετακίνηση της PS λαμβάνει χώρα στα αρχικά στάδια της απόπτωσης, η χρώση με FITC-αννεξίνη V μπορεί να εντοπίσει την απόπτωση σε προγενέστερο στάδιο σε σχέση με τις δοκιμασίες που βασίζονται σε πυρηνικές αλλαγές, όπως ο κατακερματισμός του DNA. Η χρώση με FITC-αννεξίνη V προηγείται της απώλειας της ακεραιότητας της μεμβράνης, η οποία συνοδεύει τα τελευταία στάδια του κυτταρικού θανάτου που προκύπτει είτε από αποπτωτικές, είτε από νεκρωτικές διεργασίες. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με χρωστικές όπως το ιωδιούχο προπίδιο (PI) για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των πρώιμα αποπτωτικών κυττάρων (FITC-αννεξίνη V+, PI-). Σε ζωντανά κύτταρα με άθικτη μεμβράνη το PI παραμένει εξωκυτταρικά, ενώ οι μεμβράνες των νεκρών και κατεστραμμένων κυττάρων είναι διαπερατές σε αυτό. Έτσι, κύτταρα που θεωρούνται ζωντανά είναι FITC-αννεξίνη V-/PI-, κύτταρα που βρίσκονται σε πρώιμη απόπτωση είναι FITC-αννεξίνη V+/PI-, κύτταρα που είναι όψιμα αποπτωτικά FITC-αννεξίνη V+/PI+ και τα νεκρωτικά είναι FITC-αννεξίνη V-/PI+ (Εικόνα 2.17).

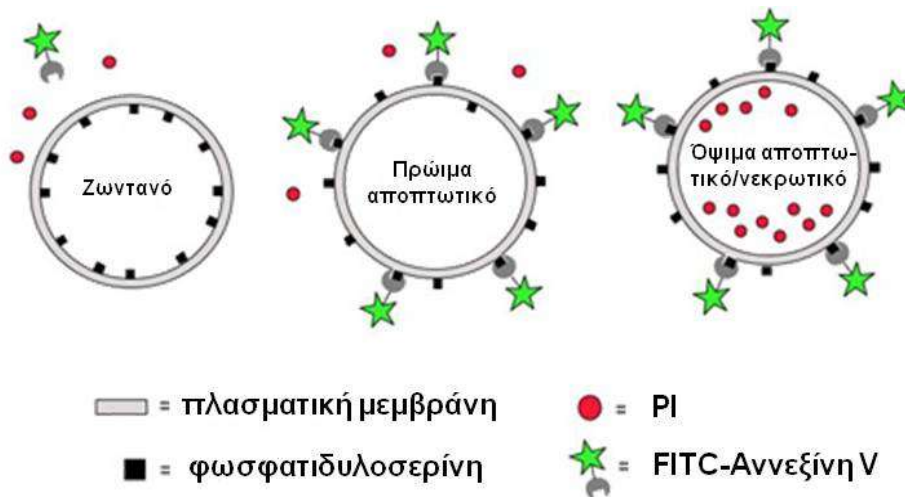
Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Κυτταρική σειρά, υποπληθυσμοί λευκοκυττάρων ή σπληνοκύτταρα ποντικού
- FITC-αννεξίνη V
- Ιωδιούχο προπίδιο (PI)
- 10X ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης της Αννεξίνης V (0,1 M HEPES/NaOH (pH 7,4), 1,4 M NaCl και 25 mM $CaCl_2$). Το αρχικό διάλυμα αραιώνεται 10 φορές με απεσταγμένο νερό και είναι έτοιμο προς χρήση (1X)
- Σύριγγες ινσουλίνης
- Σωληνάρια πολυστυρενίου όγκου 5 mL

- Κυτταρόμετρο ροής FACSCanto II

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Τα κύτταρα, από τα φρεάτια των οποίων συλλέχθηκε το υπερκείμενο όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, πρέπει να αποκολληθούν ώστε να βαφούν και να αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής. Το ίδιο πρωτόκολλο ακολουθείται και όταν χρησιμοποιούνται υποπληθυσμοί λευκοκυττάρων ή σπληνοκύτταρα ποντικού, μόνο που για τα αιωρούμενα κύτταρα παραλείπεται το βήμα της αποκόλλησης.
- 2) Η αποκόλληση γίνεται με άσκηση ήπιας πίεσης με το πίσω μέρος του εμβόλου μίας σύριγγας ινσουλίνης για μερικά δευτερόλεπτα. Λόγω της εξάρτησης της αλληλεπίδρασης αννεξίνης V-PS από το ασβέστιο, είναι σημαντικό να αποφεύγονται διαλύματα που περιέχουν EDTA ή άλλες χηλικές ενώσεις ασβεστίου κατά την αποκόλληση.
- 3) Τα κύτταρα συλλέγονται σε σωληνάριο, φυγοκεντρώνται (300xg, 5 λεπτά) και το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- 4) Προστίθεται κρύο DPBS και ακολουθεί φυγοκέντρηση ώστε τα κύτταρα να ξεπλυθούν καλά. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται 2 φορές.
- 5) Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/mL.
- 6) 100 μ L του διαλύματος αυτού (1×10^5 κύτταρα) μεταφέρονται στα ειδικά σωληνάρια κυτταρομετρίας, όπου προστίθενται 5 μ L FITC-αννεξίνης V και 5 μ L PI.
- 7) Τα κύτταρα αναδεύονται ήπια και επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- 8) Προστίθενται σε κάθε σωληνάριο 400 μ L 1X διαλύματος δέσμευσης και τα δείγματα αναλύονται σε κυτταρόμετρο ροής εντός μίας ώρας.



Εικόνα 2.17. Χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι η εξωτερίκευση του λιπιδίου φωσφατιδυλοσερίνη (PS) από την εσωτερική προς την εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Η FITC-αννεξίνη V δεσμεύεται ειδικά με τη PS και επιτρέπει την ανίχνευση της εξωτερικής PS με κυτταρομετρία ροής, και ως εκ τούτου των αποπτωτικών κυττάρων. Όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με ιωδιούχο προπίδιο (PI) που σχετίζεται με την ακεραιότητα της μεμβράνης, καθίσταται δυνατή η διάκριση πρώιμα αποπτωτικών κυττάρων (μόνο αννεξίνη V θετικά) από τα όψιμα αποπτωτικά/νεκρωτικά κύτταρα (αννεξίνη V και PI θετικά).

2.23. *In vivo* μοντέλα βακτηριακών λοιμώξεων σε ποντίκια

Μετά την *in vitro* επαγωγή απόπτωσης σε κυτταρικές σειρές και σε υποπληθυσμούς λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος, το επόμενο βήμα ήταν η ανάπτυξη *in vivo* μοντέλων βακτηριακών λοιμώξεων σε πειραματόζωα. Επιλέχθηκαν μοντέλα που περιελάμβαναν την πρόκληση λοίμωξης με στελέχη βακτηρίων υψηλής μολυσματικότητας σε ποντίκια, καθώς χρειαζόμασταν ένα σύστημα όπου θα προκαλείτο μαζική απόπτωση μονοκυττάρων/μακροφάγων, άρα αυξημένη απελευθέρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) στον ορό των ζώων. Η ποσοτικοποίηση του δεκαπεπτιδίου στον ορό έγινε με την αναπτυχθείσα ειδική και ευαίσθητη ELISA (§ 2.17).

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Βακτηριακά εναιωρήματα *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium urealyticum*, *Pasteurella multocida* και *Klebsiella oxytoca*, από την Εργαστηριακή Συλλογή του «Cantacuzino Institute», Βουκουρέστι, Ρουμανία
- Ποντίκια των φυλών BALB/c και C57BL/6
- Αναστολέας πρωτεασών Complete Mini

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Αρσενικά ποντίκια των φυλών BALB/c και C57BL/6 (ηλικίας 6-8 εβδομάδων) στεγάζονται (2-4 ζώα ανά κλουβί) υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία (22°C) και φωτοπερίοδο (12 ώρες φως, 12 ώρες σκοτάδι) με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Η μεταχείριση των ζώων γίνεται σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία για τα ζωϊκά πειράματα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.
- 2) 0,5 mL από κάθε βακτηριακό εναιώρημα [10^3 μονάδες σχηματισμού αποικιών (CFU)] χορηγείται ενδοπεριτοναϊκά σε όλα τα ποντίκια. Το αίμα συλλέγεται μέσω παρακέντησης του οπισθο-βολβικού πλέγματος, χρησιμοποιώντας γυάλινη πιπέττα Pasteur, πριν τη μόλυνση (0 ώρες) και σε επιλεγμένα χρονικά σημεία μετά από αυτή (2, 24 και 72 ώρες).
- 3) Όλα τα ζώα θανατώνονται με αυχενική εξάρθρωση στις 72 ώρες μετά τη μόλυνση.
- 3) Τα δείγματα του αίματος που συλλέγονται από κάθε ζώο, τοποθετούνται σε σωληνάρια Eppendorf, αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να πήξουν και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται (300xg, 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου).

- 4) Οι οροί μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης μεταφέρονται σε καθαρά σωληνάρια, όπου προστίθεται αναστολέας πρωτεασών. Ακολούθως, διαιρούνται περαιτέρω και μεταφέρονται στους -80°C για αποθήκευση.
- 5) Κάθε φορά αποψύχονται μόνο τα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν, ώστε να αποκλειστούν διακυμάνσεις στη συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου λόγω επαναλαμβανόμενων κύκλων ψύξης-απόψυξης.
- 6) Πριν από κάθε μέτρηση, οι οροί κατακρημνίζονται με ακετόνη όπως περιγράφεται στην § 2.19.

In vivo μοντέλο θανατηφόρου σηψαιμίας σε ποντίκια

Μετά τα πρώτα μοντέλα βακτηριακών λοιμώξεων στα ποντίκια, αποφασίστηκε η εφαρμογή ενός ακόμα πιο επιθετικού μοντέλου θανατηφόρου σηψαιμίας, διάρκειας μόλις 48 ωρών.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Βακτηριακά εναιωρήματα *Klebsiella pneumoniae* L-78 (κλινικά απομονωμένο στέλεχος) και *Klebsiella pneumoniae* ATCC43816 (πρότυπο στέλεχος), που παραχωρήθηκαν από τη Δρ. Β. Μυριαγκού, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα
- Ποντίκια της φυλής ICR (CD-1)
- Αναστολέας πρωτεασών Complete Mini

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Θηλυκά ποντίκια της φυλής ICR (CD-1) (ηλικίας 6-8 εβδομάδων) ενοφθαλμίζονται ενδοπεριτοναϊκά με 0,5 mL από κάθε βακτηριακό εναιώρημα (LD_{50} : 5×10^3 για το πρότυπο στέλεχος και 10^8 για το L-78).
- 2) Το αίμα συλλέγεται μέσω παρακέντησης του οπισθο-βολβικού πλέγματος, χρησιμοποιώντας γυάλινη πιπέττα Pasteur, πριν τη μόλυνση (0 ώρες) και σε επιλεγμένα χρονικά σημεία μετά από αυτή (3, 6, 12, 24 και 48 ώρες).
- 3) Από επιλεγμένα ζώα λαμβάνονται υπό άσηπτες συνθήκες ο σπλήνας και το ήπαρ.
- 4) Όλα τα ζώα θανατώνονται με αυχενική εξάρθρωση στις 48 ώρες μετά τη μόλυνση, καθώς εμφανίζουν κλινικά χαρακτηριστικά γενικευμένης σήψης.
- 7) Η συλλογή των δειγμάτων του αίματος και η επεξεργασία τους γίνονται όπως ακριβώς περιγράφηκε και στα προηγούμενα μοντέλα.

3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μελέτη της επίδρασης της προθυμοσίνης α (προΤα) και του ανοσοδραστικού της δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109), στα ανθρώπινα ουδετερόφιλα

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, αλλά και από αποτελέσματα του εργαστηρίου μας, είναι γνωστό ότι η προΤα παρουσιάζει πλειοτροπική δράση, ενεργοποιώντας τις δραστικές λειτουργίες πολλών κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τα κύτταρα του ειδικού σκέλους της ανοσίας, είναι γνωστό ότι επάγει τον πολλαπλασιασμό των βοηθητικών και τη λυτική ικανότητα των κυτταροτοξικών Τ κυττάρων, την παραγωγή IL-2 από αυτά, καθώς και την επιφανειακή έκφραση του υποδοχέα της IL-2 (Voutsas et al., 2000). Παράλληλα, η προΤα επιδρά και σε κύτταρα του φυσικού σκέλους της ανοσίας, αυξάνοντας την έκφραση των MHC μορίων τάξης II σε ανθρώπινα μονοκύτταρα (Baxevanis et al., 1992), ενισχύοντας την κυτταροτοξικότητα των NK και LAK κυττάρων (Skopeliti et al., 2009) και επάγοντας την ωρίμανση φαινοτυπικά και λειτουργικά ανοσοϊκανών δενδριτικών κυττάρων (Skopeliti et al., 2009; Ioannou et al., 2013). Πλέον πρόσφατα, δείξαμε ότι η προΤα και το ανοσοδραστικό της δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) προσδένονται στον TLR-4 και σηματοδοτούν καταρροϊκά αυτού, οδηγώντας ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα προς ενεργοποίηση και ενίσχυση της αντιγονοπαρουσιαστικής τους ικανότητας (Ioannou et al., 2013).

Μία μελέτη, δεκαπέντε χρόνια πριν, σε κύτταρα της φυσικής ανοσίας έδειξε ότι η προΤα ενεργοποιεί και τα ουδετερόφιλα ασθενών με καρκίνο, αυξάνοντας τη χημειοταξία και την κυτταροτοξικότητά τους εναντίον καρκινικών κυττάρων-στόχων (Heidecke et al., 1997). Βασιζόμενοι, λοιπόν, σε αυτή την πρώτη αναφορά, θελήσαμε να διευρύνουμε τη μελέτη στα ουδετερόφιλα, εξετάζοντας την επίδραση όχι μόνο της προΤα, αλλά και του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109), στον πολυπληθέστερο λευκοκυτταρικό υποπληθυσμό του περιφερικού αίματος, ο οποίος εκφράζει, μεταξύ άλλων υποδοχέων της φυσικής ανοσίας, και τον TLR-4. Η μελέτη σχεδιάστηκε ώστε να περιλαμβάνει την ανάλυση βασικών λειτουργιών που επιτελούν τα ουδετερόφιλα [φαγοκυττάρωση, παραγωγή και απελευθέρωση δραστικών ριζών (αναπνευστική έκρηξη) και κυτταροτοξική δράση]. Επιλέξαμε, επίσης, να μελετήσουμε συγκριτικά τη δράση των δύο πεπτιδίων σε ουδετερόφιλα που προέρχονταν από το περιφερικό αίμα ανοσοϊκανών (υγιών δοτών), αλλά και ανοσοανεπαρκών (ασθενών με καρκίνο του μαστού) ατόμων.

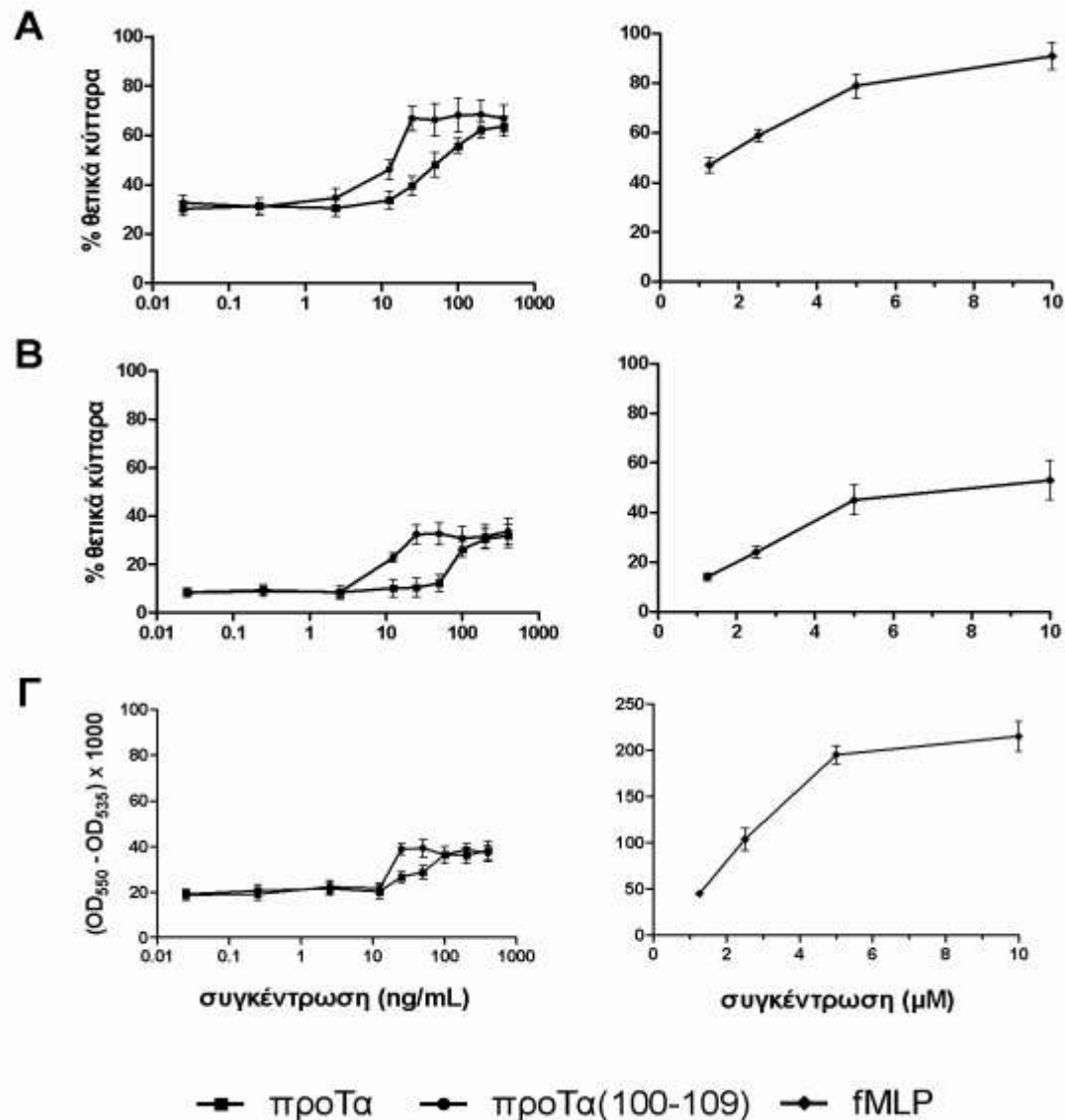
3.1.1. Το προΤα(100-109) ενισχύει τις βασικές λειτουργίες των ουδετερόφιλων σε επίπεδα ανάλογα με αυτά που επάγονται από την προΤα

Αρχικά, προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των δύο πεπτιδίων που επάγουν τη μέγιστη ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων. Για τη δοσοεξαρτώμενη μελέτη χρησιμοποιήσαμε ουδετερόφιλα υγιών δοτών, τα οποία επώασαμε με διαφορετικές συγκεντρώσεις προΤα, προΤα(100-109) ή με το ανοσοεπαγωγικό τριπεπτίδιο fMLP, ως θετικό μάρτυρα. Ως μάρτυρα, επίσης, χρησιμοποιήσαμε και το πεπτίδιο scrambled προκειμένου να αποδειχθεί ότι η δραστηριότητα του ανοσοδραστικού δεκαπεπτιδίου είναι ειδική για την αλληλουχία του (Πίνακας 3.1). Οι επώσεις ουδετερόφιλων και επαγωγικών παραγόντων διήρκησαν 90 λεπτά στη δοκιμασία φαγοκυττάρωσης, 10 λεπτά στη δοκιμασία ενδοκυτταρικής παραγωγής $\cdot\text{O}_2^-$ και 20 λεπτά στη δοκιμασία εξωκυτταρικής απελευθέρωσης $\cdot\text{O}_2^-$, σύμφωνα με τα αντίστοιχα πρωτόκολλα που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2, § 2.4, § 2.5 και § 2.6.

Ως βέλτιστες επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις των 25 ng/mL για το προΤα(100-109) και 200 ng/mL για την προΤα, καθώς ενίσχυσαν ικανοποιητικά τις δραστηριότητες των ουδετερόφιλων, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις των πεπτιδίων δεν οδήγησαν σε περαιτέρω ενεργοποίησή τους (Εικόνα 3.1). Για το χημειοτακτικό τριπεπτίδιο fMLP επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 5 μM , η οποία διέγειρε επαρκώς τα ουδετερόφιλα. Τέλος, το πεπτίδιο scrambled επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί στην ίδια συγκέντρωση με το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109), δηλ. στα 25 ng/mL.

Πίνακας 3.1. Αμινοξικές αλληλουχίες της ανθρώπινης προΤα, του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) και του πεπτιδίου scrambled.

προΤα	1 SDAAVDTSS	11 ITTKDLKEKK	21 EVVEEAENGR	31 DAPANGNANE	41 ENGEQEADNE	51 VDEEEEEEGGE
προΤα (100-109)	61 EEEEEEEGDG	71 EEEDGDEDEE	81 AESATGKRAA	91 EDDEDDVDT	101 KKQKTDEDD	
πεπτίδιο scrambled					T KKQKTDEDD	K ETDKDKTDQ



Εικόνα 3.1. Δοσοεξαρτώμενη διέγερση των ουδετερόφιλων που προέρχονται από υγιείς δότες με προΤα, προΤα(100-109) και fMLP. Τα ουδετερόφιλα ενεργοποιήθηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις προΤα ή προΤα(100-109) (0,025-400 ng/mL, αριστερά γραφήματα) ή με fMLP (1,25-10 μΜ, δεξιά γραφήματα) και ελέγχθηκαν για τη φαγοκυτταρική τους ικανότητα (Α), την ενδοκυτταρική παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$ (Β) και την εξωκυτταρική απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$ (Γ). Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm SD από ουδετερόφιλα απομονωμένα από 3 διαφορετικούς δότες.

Για την *in vitro* εκτίμηση της φαγοκυτταρικής ικανότητας των ουδετερόφιλων, χρησιμοποιήθηκαν σωματίδια zymosan, ένα αδιάλυτο κλάσμα σωματιδίων από το κυτταρικό τοίχωμα του *S. cerevisiae*, που λειτουργεί ως πρότυπο σύστημα μυκητιασικής μόλυνσης (Lee et al., 2011). Μη διεγερμένα ουδετερόφιλα από το περιφερικό αίμα υγιών δοτών παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα εγκόλπωσης σωματιδίων zymosan σε σχέση με τα

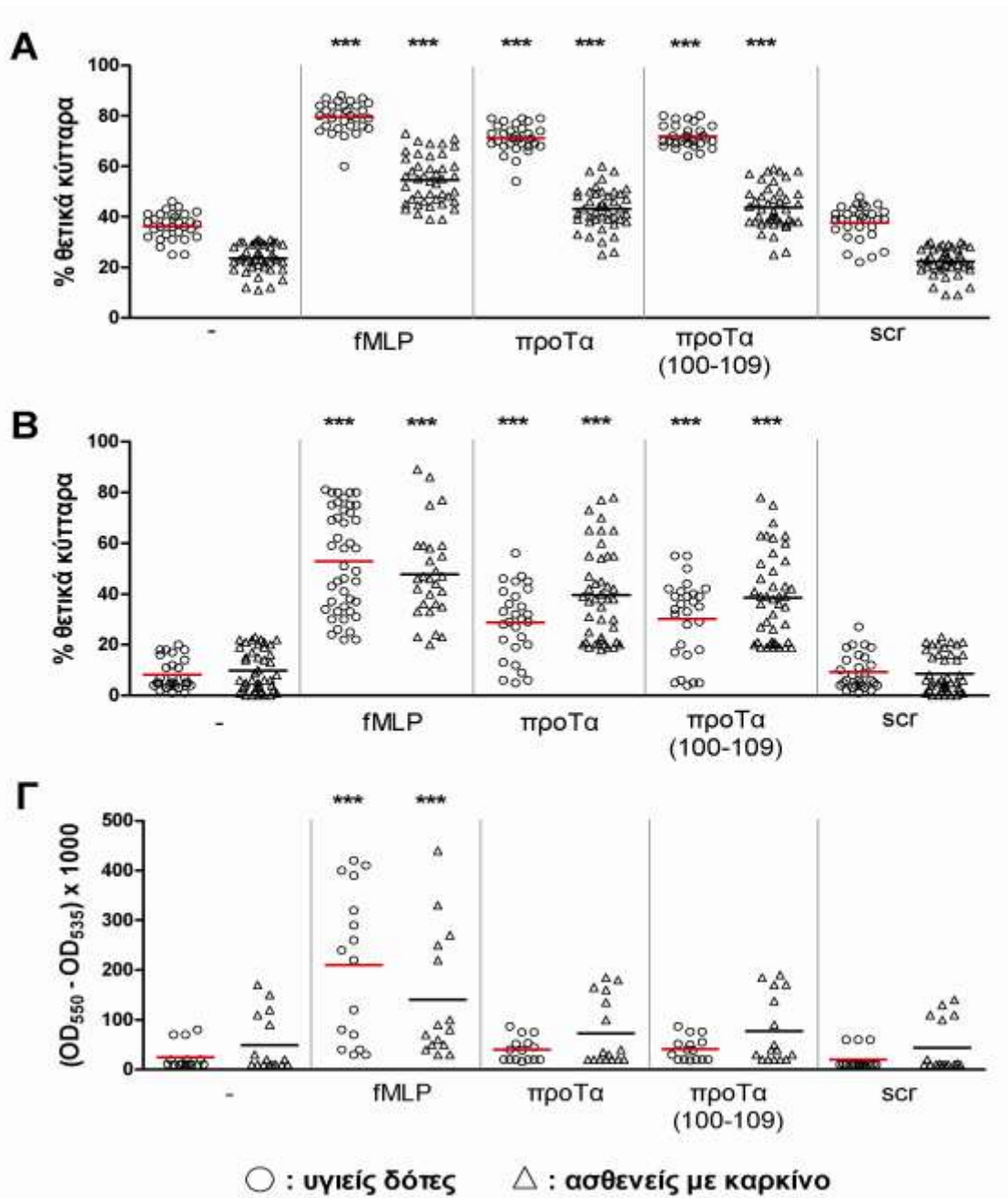
ουδετερόφιλα που απομονώθηκαν από ασθενείς με καρκίνο του μαστού (36,2% έναντι 23,6%, αντίστοιχα). Παρουσία fMLP, η φαγοκυττάρωση σωματιδίων zymosan από τα ουδετερόφιλα και των δύο ομάδων αυξήθηκε περίπου 2 φορές (79,6% και 54,6% για τους υγιείς δότες και τους ασθενείς με καρκίνο, αντίστοιχα, $p < 0,001$ σε σύγκριση με τα μη διεγερμένα κύτταρα) (**Εικόνα 3.2A**). Η ενεργοποίηση με προΤα(100-109) ή προΤα αύξησε τη φαγοκυτταρική ικανότητα των ουδετερόφιλων τόσο των υγιών δοτών όσο και των ασθενών με καρκίνο του μαστού (71,9% και 71,2%, 43,7% και 43,1%, αντίστοιχα, $p < 0,001$ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα βασικά επίπεδα φαγοκυττάρωσης). Το πεπτίδιο scrambled δε φάνηκε να ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα πάνω από το βασικό επίπεδο φαγοκυττάρωσης, υποδεικνύοντας ότι, για τη δοκιμασία αυτή, η δράση του προΤα(100-109) στα ουδετερόφιλα είναι ειδική για την αλληλουχία του (**Πίνακας 3.1**).

Γενικότερα, τα ουδετερόφιλα που απομονώθηκαν από ασθενείς με καρκίνο του μαστού παρουσίασαν χαμηλότερες βασικές τιμές φαγοκυττάρωσης σωματιδίων zymosan από εκείνες των υγιών ατόμων, ενώ η μειωμένη αυτή φαγοκυτταρική τους ικανότητα αποκαταστάθηκε περίπου στα αρχικά φυσιολογικά επίπεδα των υγιών δοτών (36,2%) μετά από ενεργοποίηση με προΤα(100-109) ή προΤα (43,7% και 43,1%, αντίστοιχα) (**Εικόνα 3.2A**). Το γεγονός αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με την ήδη γνωστή ικανότητα της προΤα να επαναφέρει σε φυσιολογικά επίπεδα τις κατασταλαμμένες λειτουργίες και άλλων ανοσοκυττάρων που προέρχονται από καρκινοπαθείς (Baxevanis et al., 1993).

Τα βασικά επίπεδα ενδοκυτταρικής παραγωγής $\cdot\text{O}_2^-$ δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των μη διεγερμένων ουδετερόφιλων από υγιείς δότες και ασθενείς με καρκίνο (8,2% έναντι 9,8%, αντίστοιχα). Όπως ήταν αναμενόμενο, η διέγερση με fMLP αύξησε την ενδοκυτταρική παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$ κατά 5 φορές (52,9% για τους υγιείς δότες και 47,6% για τους ασθενείς με καρκίνο, $p < 0,001$ σε σύγκριση με τους αντίστοιχους αρνητικούς μάρτυρες). Η επώαση των ουδετερόφιλων με προΤα(100-109) ή προΤα τετραπλασίασε την ενδοκυτταρική παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$ και των δύο ομάδων (30,2% και 28,8% για τους υγιείς δότες, 38,6% και 39,7% για τους ασθενείς με καρκίνο, αντίστοιχα, $p < 0,001$ σε σύγκριση με τα βασικά επίπεδα $\cdot\text{O}_2^-$), ενώ η επώαση με το πεπτίδιο scrambled δεν ενίσχυσε περαιτέρω την παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$ (**Εικόνα 3.2B**). Σε αντίθεση με τη δοκιμασία φαγοκυττάρωσης, τόσο η προΤα όσο και το προΤα(100-109) αύξησαν περισσότερο τα επίπεδα παραγωγής $\cdot\text{O}_2^-$ στα ουδετερόφιλα που προέρχονταν από ασθενείς με καρκίνο του μαστού σε σχέση με εκείνα των υγιών δοτών. Αυτό το εύρημα είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, στις οποίες ουδετερόφιλα από ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, του λάρυγγα και ορισμένες μορφές λευχαιμίας παρουσίασαν αυξημένη παραγωγή ριζών ως απάντηση σε ανοσοεπαγωγικούς παράγοντες, όπως το PMA, τα

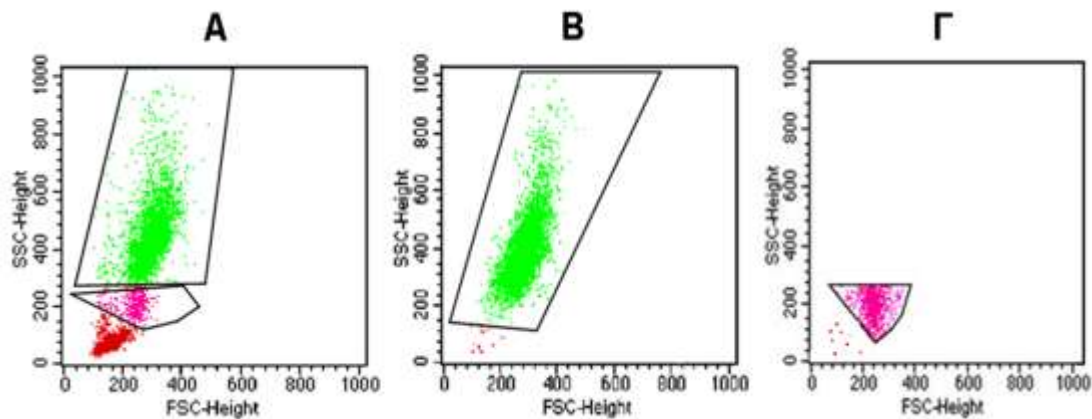
οψωνοποιημένα σωματίδια zymosan και το fMLP (Klink et al., 2008; Szuster-Ciesielska et al., 2004; Tsai et al., 2008).

Για να προσδιορίσουμε αν τα ενδοκυτταρικά παραγόμενα μόρια $\cdot\text{O}_2^-$ απελευθερώνονται και εξωκυτταρικά, αξιολογήσαμε φωτομετρικά την αναγωγή του κυτοχρώματος c από τα μόρια $\cdot\text{O}_2^-$ σε επιλεγμένα δείγματα, από τα οποία ήταν διαθέσιμος ικανοποιητικός αριθμός ουδετερόφιλων. Τα βασικά επίπεδα απελευθέρωσης $\cdot\text{O}_2^-$ ήταν υψηλότερα στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού σε σχέση με τους υγιείς δότες (49,3 έναντι 24,7, αντίστοιχα). Η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων με fMLP οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα αναγωγής του κυτοχρώματος c και στις δύο ομάδες (210,0 για τους υγιείς δότες και 140,7 για τους ασθενείς με καρκίνο, $p < 0,001$), ενώ το πεπτίδιο scrambled δεν είχε καμία θετική επίδραση. Τα προΤα(100-109)- ή προΤα-ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα που προέρχονταν από τους υγιείς δότες απελευθέρωσαν κατά 1,5 φορές περισσότερο $\cdot\text{O}_2^-$ (41,1 και 40,6) και αυτή η αύξηση ήταν αντίστοιχη και στα ουδετερόφιλα από τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού (73,1 και 77,1) (Εικόνα 3.2Γ). Ωστόσο, η ενίσχυση της εξωκυτταρικής απελευθέρωσης $\cdot\text{O}_2^-$ από το προΤα(100-109) και την προΤα δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μη διεγερμένα ουδετερόφιλα.

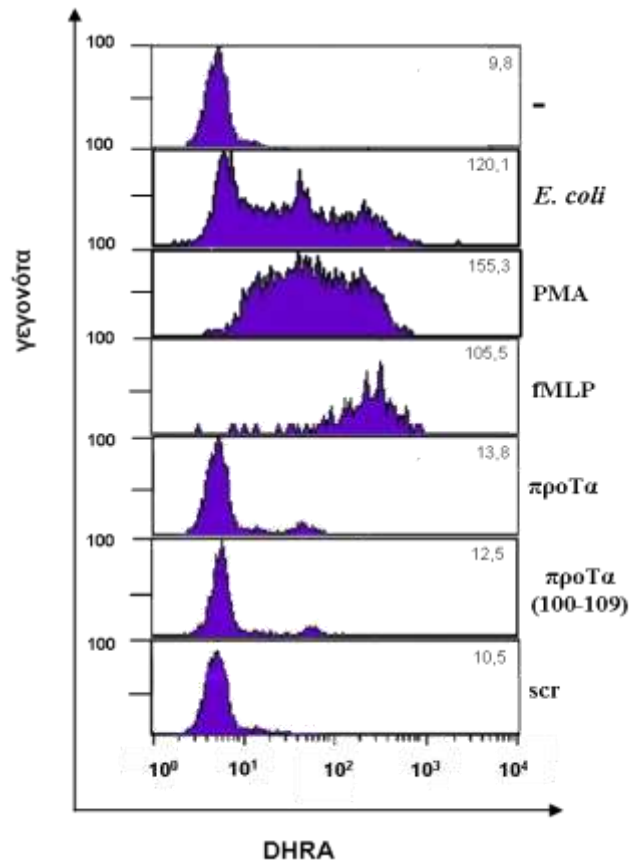


Εικόνα 3.2. Επίδραση του προΤα(100-109) και της προΤα στις βασικές λειτουργίες των ουδετερόφιλων. Ουδετερόφιλα από υγιείς δότες (○) και ασθενείς με καρκίνο του μαστού (△) μελετήθηκαν ως προς τη φαγοκυτταρική τους ικανότητα (Α), την ενδοκυτταρική παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$ (Β) και την εξωκυτταρική απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$ (Γ). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει την τιμή που καταγράφηκε για ένα δότη (για τα Α και Β: υγιείς δότες n=30, ασθενείς με καρκίνο n=44, για το Γ: υγιείς δότες n=16, ασθενείς με καρκίνο n=15). Οι οριζόντιες γραμμές παρουσιάζουν τη μέση τιμή κάθε ομάδας. (-): ουδετερόφιλα σε σκέτο θρεπτικό υλικό, scr: ουδετερόφιλα ενεργοποιημένα με το πεπτίδιο scrambled, ***: $p < 0,001$ όπως υπολογίστηκε με two-way ANOVA.

Για την επιβεβαίωση και ποσοτικοποίηση της ευρύτερης δραστηριότητας των ενδοκυτταρικά παραγόμενων και εξωκυτταρικά απελευθερούμενων ριζών, χρησιμοποιήσαμε μία εμπορικά διαθέσιμη δοκιμασία, το Bursttest, το οποίο καταγράφει την οξείδωση της διϋδροροδαμίνης (DHR) σε ροδαμίνη (R). Εφαρμόζοντας, αρχικά, τη δοκιμασία σε δείγματα ολικού περιφερικού αίματος από υγιείς δότες (**Εικόνα 3.3Α**), δεν ανιχνεύσαμε αξιοσημείωτες αλλαγές στα επίπεδα των παραγόμενων ριζών μετά από διέγερση των ουδετερόφιλων με προΤα(100-109) ή προΤα [μέση ένταση φθορισμού (MFI) 12,5 και 13,8, αντίστοιχα] σε σύγκριση με εκείνα που καταγράφηκαν για τον αρνητικό μάρτυρα (MFI 9,8). Αντίθετα, σημαντική ενίσχυση της οξειδωτικής έκρηξης των ουδετερόφιλων παρατηρήθηκε στους τρεις θετικούς μάρτυρες, δηλαδή όταν επιδράσαμε στα ίδια ουδετερόφιλα με *E. coli*, PMA και fMLP (MFI 120,1, 155,3 και 105,5, αντίστοιχα) (**Εικόνα 3.4**).

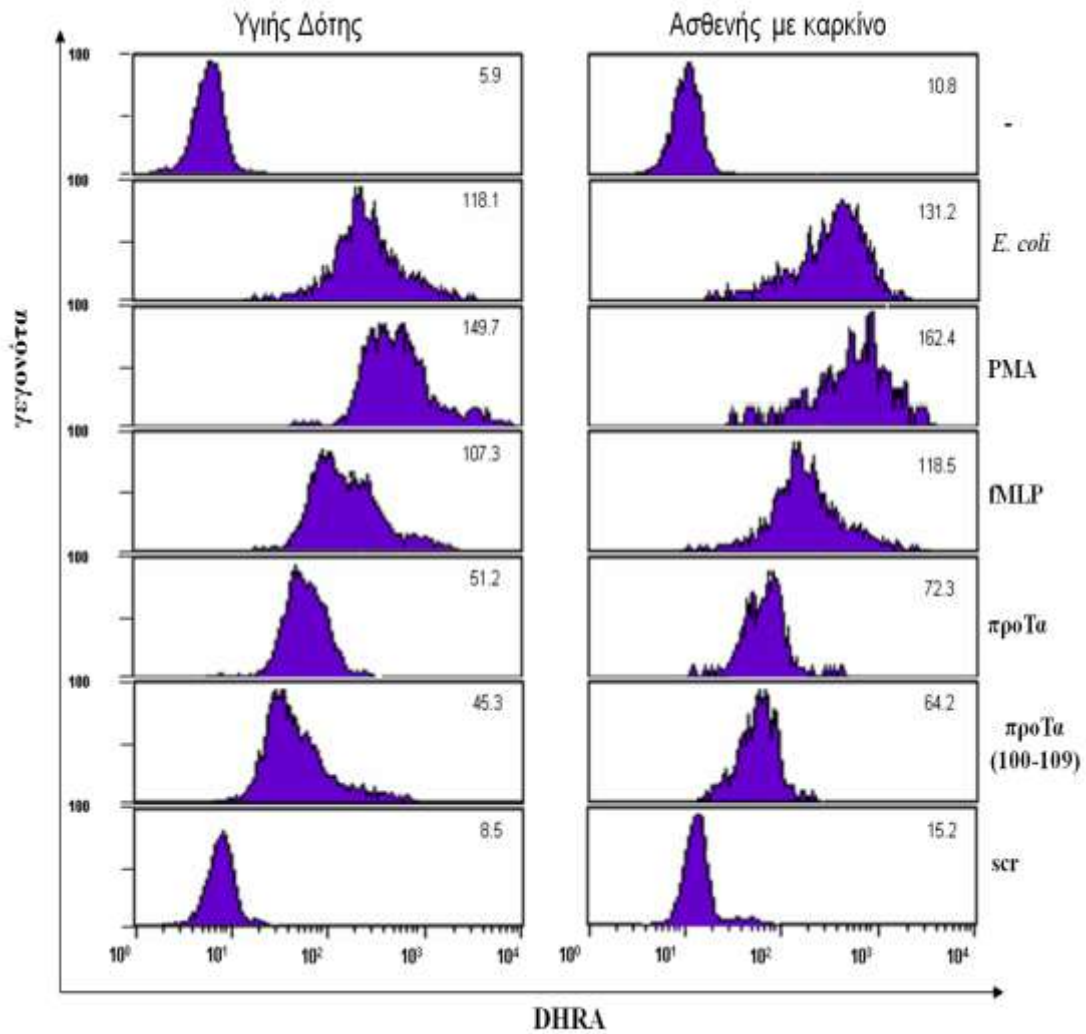


Εικόνα 3.3. Ενδεικτικά στικτογράμματα απεικόνισης των υποπληθυσμών του ολικού αίματος (Α), των απομονωμένων ουδετερόφιλων (Β) και των απομονωμένων μονοκυττάρων (Γ), από έναν υγιή δότη. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται ο πληθυσμός των ουδετερόφιλων, ενώ με ροζ ο πληθυσμός των μονοκυττάρων.



Εικόνα 3.4. Επίδραση του προΤα(100-109) και της προΤα στην οξειδωτική έκρηξη των ουδετερόφιλων. Ολικό αίμα επωάστηκε σε σκέτο θρεπτικό υλικό (-), παρουσία *E. coli*, PMA ή fMLP (θετικοί μάρτυρες), προΤα, προΤα(100-109) ή πεπτιδίου scrambled (scr). Αναλύθηκαν συνολικά 10^4 οριοθετημένα (gated) γεγονότα. Οι αριθμοί απεικονίζουν τη μέση ένταση φθορισμού (MFI). Τα ιστογράμματα είναι από έναν αντιπροσωπευτικό υγιή δότη από τους 3 που αναλύθηκαν.

Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήσαμε απομονωμένα ουδετερόφιλα τόσο από υγιείς δότες όσο και από ασθενείς με καρκίνο του μαστού (**Εικόνα 3.3B**), παρατηρήθηκε ένα σαφέστερο πρότυπο αναπνευστικής έκρηξης. Το MFI των κυττάρων που παρήγαγαν δραστικές ρίζες αυξήθηκε στις ομάδες που ενεργοποιήθηκαν με *E. coli*, PMA, fMLP, προΤα και προΤα(100-109) (MFI 118,1, 149,7, 107,3, 51,2 και 45,3 για τους υγιείς δότες και 131,2, 162,4, 118,5, 72,3, 64,2 για τους ασθενείς με καρκίνο, αντίστοιχα) σε σύγκριση με τα μη διεγερμένα κύτταρα (MFI 5,9 και 10,8, αντίστοιχα) (**Εικόνα 3.5**). Συνολικά, η αναπνευστική έκρηξη των ουδετερόφιλων από ασθενείς με καρκίνο του μαστού ήταν εντονότερη σε σύγκριση με εκείνη των ουδετερόφιλων των υγιών ατόμων και συμφωνεί με τα αποτελέσματα από τις δοκιμασίες αναγωγής του NBT (ενδοκυτταρική παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$) και του κυτοχρώματος c (εξωκυτταρική απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$) (**Εικόνα 3.2**).

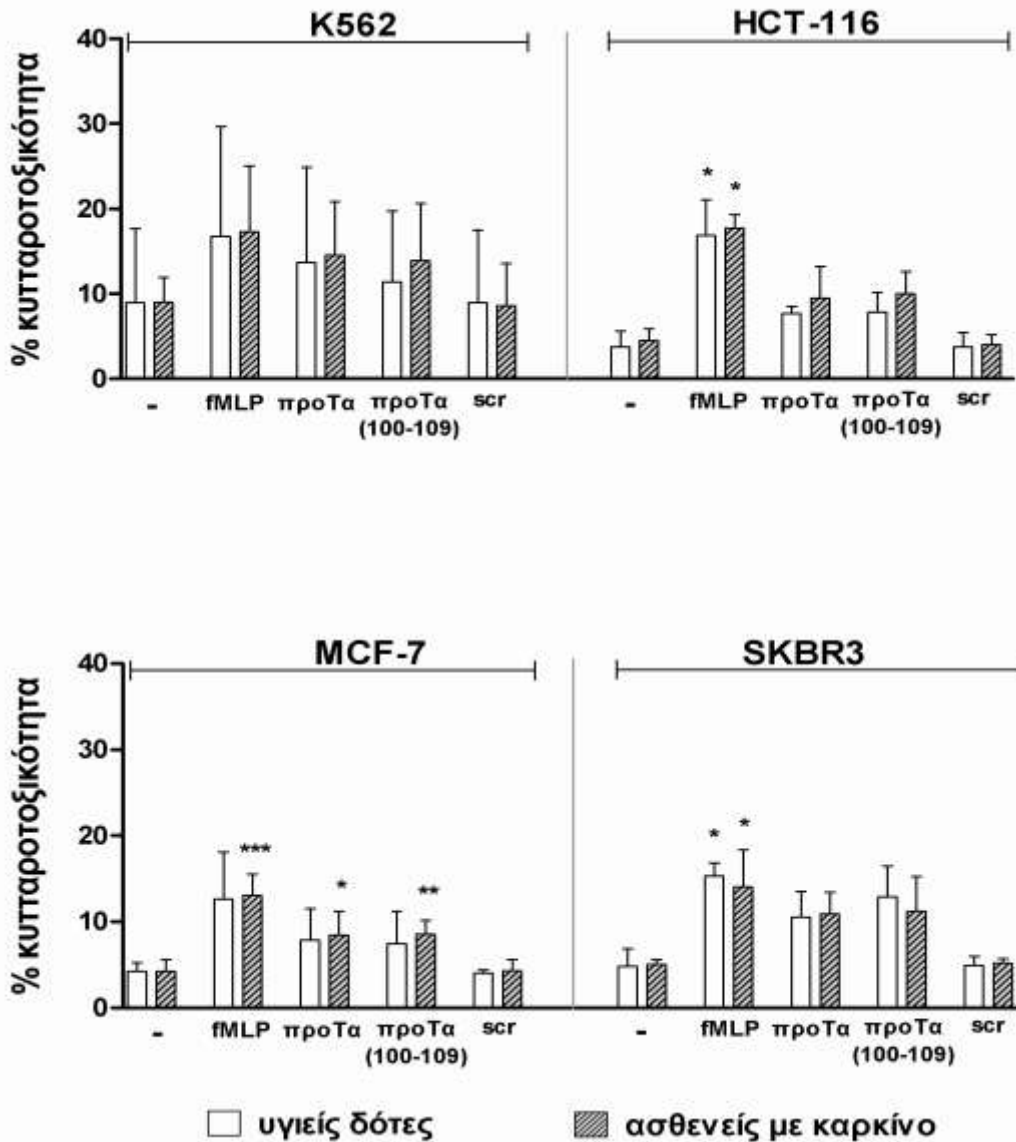


Εικόνα 3.5. Επίδραση του proTa(100-109) και της proTa στην οξειδωτική έκρηξη απομονωμένων ουδετερόφιλων. Τα ουδετερόφιλα επώαστηκαν και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τον τρόπο που αναφέρεται στη λεζάντα της **Εικόνας 3.4**. Τα ιστογράμματα είναι από έναν αντιπροσωπευτικό υγιή δότη και μία ασθενή με καρκίνο του μαστού από τους 5 που αναλύθηκαν.

3.1.2. Το προΤα(100-109) και η προΤα αυξάνουν την κυτταροτοξικότητα των ουδετερόφιλων εναντίον καρκινικών κυττάρων-στόχων

Παρά το γεγονός ότι τα ουδετερόφιλα χρησιμοποιούν διάφορους μηχανισμούς για να λύουν καρκινικά κύτταρα-στόχους, η πιο σημαντική κυτταροτοξική τους δραστηριότητα πιστεύεται ότι μεσολαβείται από τις ROS (Koga et al., 2004). Για την εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης των ουδετερόφιλων, χρησιμοποιήσαμε τέσσερις διαφορετικές ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές ως στόχους: μία λευχαιμική (K562), ένα αδενοκαρκίνωμα εντέρου (HCT-116) και δύο αδενοκαρκινώματα μαστού (MCF-7 και SKBR3).

Παρατηρήσαμε ότι η μέση βασική κυτταροτοξικότητα των ουδετερόφιλων των υγιών δοτών και των ασθενών με καρκίνο του μαστού έναντι όλων των στόχων ήταν ιδιαίτερα χαμηλή (4-10%) και αυξήθηκε έως και 3 περίπου φορές, μετά από ενεργοποίησή τους με fMLP (12,6-17,7%) (**Εικόνα 3.6**). Επίσης, η κυτταροτοξική δραστηριότητα των ουδετερόφιλων αυξήθηκε κατά 1,5 έως 2 φορές μετά από διέγερσή τους με προΤα(100-109) (7,4-13,8%) ή προΤα (7,8-14,5%), ενώ το πεπτίδιο scrambled, σε όλες τις περιπτώσεις δεν ενίσχυσε τη λυτική ικανότητα των ουδετερόφιλων. Στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα κυτταροτοξικότητας μεταξύ των ουδετερόφιλων που ενεργοποιήθηκαν με fMLP, τόσο από υγιείς δότες όσο και από ασθενείς με καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με τους αντίστοιχους μάρτυρες, παρατηρήθηκαν έναντι των στόχων HCT-116 και SKBR3 ($p<0,05$). Τέλος, τα ουδετερόφιλα από ασθενείς με καρκίνο του μαστού που ενεργοποιήθηκαν με fMLP, προΤα(100-109) ή προΤα παρουσίασαν στατιστικά σημαντική ενίσχυση της κυτταροτοξικότητάς τους μόνο έναντι της καρκινικής σειράς μαστού MCF-7 σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα-στόχους (13,1%, 8,5% και 8,5% έναντι 4,3% του μάρτυρα, $p<0,0001$, $p=0,0019$ και $p=0,0152$, αντίστοιχα) (**Εικόνα 3.6**).



Εικόνα 3.6. Επίδραση του προΤα(100-109) και της προΤα στην κυτταροτοξική δραστηριότητα των ουδετερόφιλων. Ουδετερόφιλα από υγιείς δότες (n=15) και ασθενείς με καρκίνο του μαστού (n=10) ενεργοποιήθηκαν με fMLP, προΤα, προΤα(100-109) ή με το πεπτίδιο scrambled (scr) και χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-τελεστές έναντι των καρκινικών κυττάρων-στόχων K562, HCT-116, MCF-7 και SKBR3. Η αναλογία κυττάρων-τελεστών προς κύτταρα-στόχους ήταν 30:1 σε όλες τις περιπτώσεις. Τα δεδομένα εκφράζονται ως % μέση κυτταροτοξικότητα \pm SD. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,0001$ σε σύγκριση με τα μη διεγερμένα ουδετερόφιλα (-) με χρήση του Student's t-test.

Γενικά, τα ουδετερόφιλα από τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού παρουσίασαν ελαφρώς υψηλότερη ικανότητα λύσης των καρκινικών σειρών σε σχέση με εκείνα των υγιών δοτών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με την ήδη καταγεγραμμένη ικανότητά

τους να παράγουν και να απελευθερώνουν αυξημένα επίπεδα δραστικών ριζών σε σχέση με τα ουδετερόφιλα των υγιών δοτών. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι αν και τα ουδετερόφιλα προέρχονταν από το περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού, δεν παρατηρήθηκε λύση μόνο των καρκινικών σειρών μαστού (MCF-7 και SKBR3). Η συνολικά χαμηλή κυτταροτοξικότητα που καταγράψαμε, σε συνδυασμό με τη λύση όλων των καρκινικών κυττάρων-στόχων που χρησιμοποιήσαμε από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, υποδεικνύει ότι είναι λιγότερο δραστικά από τα NK και τα CTLs (Baxevanis et al., 2002; Skopeliti et al., 2009) και ικανά να μεσολαβούν μόνο περιορισμένου εύρους, μη ειδικές κυτταροτοξικές απαντήσεις. Παρόλα αυτά, τόσο το προΤα(100-109) όσο και η προΤα ενίσχυσαν και τη λυτική ικανότητα των ουδετερόφιλων, ενώ, όπως και στις προηγούμενες δοκιμασίες, το πεπτίδιο scrambled δεν προκάλεσε αντίστοιχη ενεργοποίηση, υποδηλώνοντας ότι η δραστικότητα του προΤα(100-109) είναι ειδική και πλήρως εξαρτώμενη από την πρωτοταγή του δομή.

3.1.3. Συσχέτιση της απόκρισης των ουδετερόφιλων στο προΤα(100-109) και την προΤα με ειδικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων του μαστού

Η πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο του μαστού και η επιλογή της ενδεικνυόμενης θεραπευτικής αγωγής, έχουν ήδη συσχετιστεί με την ηλικία του ασθενούς κατά την αρχική διάγνωση, αλλά και με ειδικά χαρακτηριστικά του όγκου, μεταξύ άλλων το μέγεθος, τον ιστολογικό τύπο και το grade, τη διήθηση των σύστοιχων μασχαλιαίων λεμφαδένων, καθώς και την έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων, προγεστερόνης και HER-2/*neu* από τα καρκινικά κύτταρα (Bertos and Park, 2011). Είναι, επίσης, γνωστό ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η παρουσία καρκίνου συνδυάζεται με δευτεροπαθή ανοσοανεπάρκεια, ενώ παράλληλα, πολλές διαταραχές που συνοδεύουν τη νόσο συμβάλλουν και αυτές στην επίταση της ανοσοκαταστολής. Μάλιστα, τα πιο προχωρημένα στάδια της ασθένειας συχνά προκαλούν σοβαρή έκπτωση των λειτουργιών τόσο της κυτταρικής όσο και της χυμικής ανοσίας, καταλήγοντας σε γενικευμένη «παράλυση» των ανοσολογικών απαντήσεων (Reiche et al., 2004).

Για να διαπιστωθεί, λοιπόν, κατά πόσο η παρατηρούμενη ικανότητα διέγερσης των ουδετερόφιλων των καρκινοπαθών εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της πρωτοπαθούς νεοπλασματικής εστίας, συσχετίσαμε αρχικά την *in vitro* απόκριση των ουδετερόφιλων στο προΤα(100-109) ή την προΤα με το grade του όγκου. Οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού της παρούσας μελέτης κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις ιστολογικά επιβεβαιωμένες ομάδες, με όγκους grade I (n=4), II (n=18) και III (n=18) (Πίνακες 3.2 και 3.3). Χρησιμοποιώντας τη στατιστική δοκιμασία two-way ANOVA, φάνηκε ότι οι λειτουργικές απαντήσεις των ουδετερόφιλων ως προς τα πεπτίδια (δηλαδή, η φαγοκυτταρική ικανότητα και η παραγωγή και απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$) ήταν παρόμοιες, ανεξάρτητα από το grade της νόσου.

Πίνακας 3.2. Χαρακτηριστικά των όγκων των ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Αριθμός ασθενών	44
Ηλικία κατά τη διάγνωση; μέση (\pm SD)	61,56 (\pm 12,82) χρόνια
Ιστολογία του όγκου	
<i>in situ</i> πορογενές	4
διηθητικό πορογενές	23
διηθητικό λοβιακό	10
διηθητικό (άλλοι τύποι) ^α	7
Μέγεθος του όγκου (mm)	
\leq 20	11
>20	28
άγνωστο	5
Βαθμός κακοήθειας (grade) του όγκου ^β	
I	4
II	18
III	18
Μασχαλιαίοι λεμφαδένες ^γ	
αρνητικοί	17
θετικοί	23
ΔΕ ^δ	4
ER υποδοχείς ^ε	
αρνητικοί	6
θετικοί	17
άγνωστο	21
PR υποδοχείς ^{στ}	
αρνητικοί	8
θετικοί	16
άγνωστο	20
HER-2/ <i>neu</i> υποδοχείς	
αρνητικοί	28
θετικοί	7
άγνωστο	9

^α 3 μικτού τύπου, 1 απροσδιόριστο, 1 βλεννώδες, 1 ηθμοειδές και 1 αποκρινές

^β μόνο για τα διηθητικά καρκινώματα

^γ θετικοί: μεταστατική εστία τουλάχιστον σε ένα σύστοιχο λεμφαδένα

^δ δε γίνεται εκτομή λεμφαδένων στα *in situ* καρκινώματα

^ε υποδοχείς οιστρογόνων

^{στ} υποδοχείς προγεστερόνης

Χρησιμοποιώντας την ίδια στατιστική δοκιμασία, εξετάστηκε η ύπαρξη πιθανών συσχετίσεων και με τις υπόλοιπες παραμέτρους. Ωστόσο, δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε και μεταξύ των υπόλοιπων χαρακτηριστικών και της ανταπόκρισης στο προΤα(100-109) ή την προΤα. Εξαιρέση αποτέλεσαν η ηλικία των ασθενών και η έκφραση του HER-2/*neu* υποδοχέα. Συγκεκριμένα, η φαγοκυτταρική ικανότητα και η απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$ συσχετίστηκαν οριακά με την ηλικία κατά τη διάγνωση ($p=0,0446$ και $p=0,005$, αντίστοιχα), ενώ μόνο η απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$ συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του HER-2/*neu* υποδοχέα ($p<0,0001$) (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.3. Στατιστική συσχέτιση (τιμές p) των χαρακτηριστικών των ασθενών με καρκίνο του μαστού και της ανταπόκρισης των ουδετερόφιλων τους στα πεπτίδια εντός των υποομάδων του Πίνακα 3.2.

Χαρακτηριστικά	Φαγοκυτταρική Ικανότητα	Παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$	Απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$
Ηλικία κατά τη διάγνωση ^α	0,0446	ΜΣ ^γ	0,005
Ιστολογία του όγκου ^β	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Μέγεθος του όγκου	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Βαθμός κακοήθειας (grade)	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Σύστοιχοι λεμφαδένες	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
ER υποδοχείς	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
PR υποδοχείς	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
HER-2/ <i>neu</i> υποδοχείς	ΜΣ	ΜΣ	<0,0001

^α συσχέτιση των ηλικιακών ομάδων ≤ 50 και >50

^β συσχέτιση των ομάδων: διηθητικό πορογενές, διηθητικό λοβιακό και άλλοι τύποι διηθητικών καρκινωμάτων

^γ ΜΣ: μη στατιστικά σημαντικές τιμές

Συμπερασματικά, λοιπόν, το προΤα(100-109) ενισχύει τις βασικές λειτουργίες των ανθρώπινων ουδετερόφιλων και μάλιστα αποκαθιστά τις μειωμένες λειτουργίες των κυττάρων αυτών στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού, στα επίπεδα των υγιών δοτών. Η επίδραση αυτή του δεκαπεπτιδίου είναι αντίστοιχη με εκείνη της ακέραιης προΤα και ανεξάρτητη από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των όγκων των ασθενών.

3.2. Το ανοσοδραστικό δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) και η προΤα ενισχύουν τις βασικές λειτουργίες και των ανθρώπινων μονοκυττάρων

Είναι γνωστό ότι τα μονοκύτταρα ασκούν αντίστοιχες δραστικές λειτουργίες με εκείνες των ουδετερόφιλων. Συγκεκριμένα, τα μονοκύτταρα κυκλοφορούν στο αίμα για περίπου 8 ώρες και στη συνέχεια, μεταναστεύουν στους ιστούς όπου διαφοροποιούνται σε ειδικά για κάθε τύπο ιστού μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα (Shi and Pamer, 2011). Διαθέτουν αντιμικροβιακές και κυτταροτοξικές δράσεις αλλά, σε αντίθεση με τα ουδετερόφιλα, έχουν την ικανότητα συνεχούς λυσοσωμικής δραστηριότητας και αναγέννησης, χρησιμοποιώντας αερόβιες και αναερόβιες μεταβολικές οδούς, ανάλογα με τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου στους ιστούς. Επιπλέον, αποτελούν συνδετικό κρίκο μεταξύ φυσικής και ειδικής ανοσίας, καθώς διαθέτουν ικανότητα αντιγονοπαρουσίασης (Palucka et al., 1998).

Θελήσαμε, λοιπόν, να μελετήσουμε την επαγωγή της φαγοκυττάρωσης και της αναπνευστικής έκρηξης από το προΤα(100-109) και την προΤα και σε έναν ακόμα κυτταρικό υποπληθυσμό του φυσικού σκέλους της ανοσίας, τα μονοκύτταρα. Η επιλογή του συγκεκριμένου υποπληθυσμού έγινε και βάσει της ιδιότητάς τους να εκφράζουν TLR-4, ενώ πολύ πρόσφατα η ομάδα μας έδειξε την ικανότητα του προΤα(100-109) και της προΤα να επάγουν την ωρίμανση των κατεξοχήν αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, των δενδριτικών κυττάρων που προέρχονται από *in vitro* διαφοροποίηση μονοκυττάρων περιφερικού αίματος ανθρώπου (Ioannou et al., 2013).

Για τη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα λευκαφαίρεσης περιφερικού αίματος από υγιείς δότες (buffy coats), καθώς και δείγματα αίματος από ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Μονοπύρηνια περιφερικού αίματος φυγοκεντρήθηκαν σε κλίση Ficoll και τα μονοκύτταρα απομονώθηκαν με βάση τη χαρακτηριστική τους ιδιότητα να προσκολλώνται σε πλαστικές επιφάνειες (Elkord et al., 2005). Τα μονοκύτταρα ενεργοποιήθηκαν με τους ίδιους ακριβώς παράγοντες όπως και τα ουδετερόφιλα, και υποβλήθηκαν σε τέσσερις βασικές δοκιμασίες, με τις οποίες ελέγξαμε την ενίσχυση της λειτουργικότητάς τους από τα πεπτίδια προΤα(100-109) και προΤα. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η φαγοκυτταρική τους ικανότητα, η ενδοκυτταρική παραγωγή και εξωκυτταρική απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$, ενώ παράλληλα, εφαρμόστηκε η δοκιμασία Bursttest για τον ποσοτικό προσδιορισμό της οξειδωτικής τους έκρηξης.

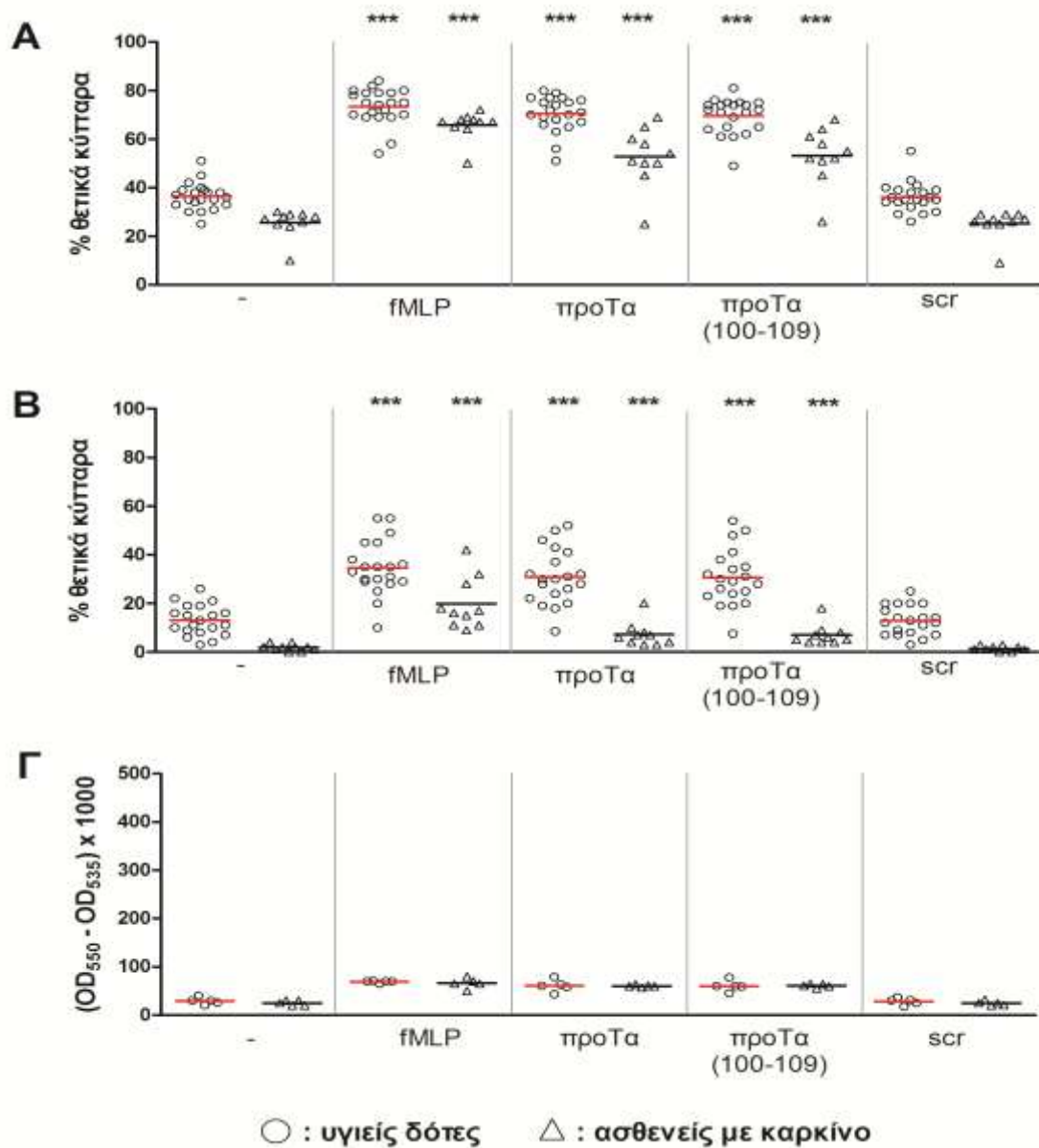
Τα μονοκύτταρα των υγιών δοτών παρουσίασαν υψηλότερα βασικά επίπεδα φαγοκυττάρωσης σωματιδίων zymosan σε σχέση με τα μονοκύτταρα που απομονώθηκαν από τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού (36,4% έναντι 25,6%, αντίστοιχα). Παρουσία fMLP, η φαγοκυτταρική ικανότητα των μονοκυττάρων αυξήθηκε κατά 2 φορές (73,4% και 65,7% για

τους υγιείς δότες και τους ασθενείς με καρκίνο, αντίστοιχα, $p < 0,001$ σε σύγκριση με τα μη διεγερμένα κύτταρα). Η ενεργοποίηση με προΤα(100-109) ή προΤα ενίσχυσε τη φαγοκυτταρική ικανότητα των μονοκυττάρων τόσο των υγιών δοτών όσο και των ασθενών με καρκίνο του μαστού (69,5% και 70,4%, 53,2% και 52,7%, αντίστοιχα, $p < 0,001$ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα βασικά επίπεδα φαγοκυττάρωσης) (**Εικόνα 3.7Α**). Το πεπτίδιο scrambled δεν είχε καμία επίδραση ούτε σε αυτή τη δοκιμασία, ενώ γενικά τα μονοκύτταρα των καρκινοπαθών εμφάνισαν μειωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα σε σχέση με εκείνα των υγιών δοτών, όπως ακριβώς παρατηρήσαμε και για τα ουδετερόφιλα της ομάδας αυτής. Το πρότυπο φαγοκυττάρωσης των μονοκυττάρων, καθώς και τα επίπεδα ενίσχυσής της ήταν παρόμοια με εκείνα των ουδετερόφιλων, καθώς είναι γνωστό ότι και οι δύο αυτοί κυτταρικοί τύποι διαθέτουν εξίσου σημαντική ικανότητα φαγοκυττάρωσης (Dale et al., 2008).

Η ενδοκυτταρική παραγωγή $\cdot O_2^-$ διέφερε σημαντικά μεταξύ των μη διεγερμένων μονοκυττάρων από τους υγιείς δότες και τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού (13,1% έναντι 1,8%, αντίστοιχα), ενώ η επώαση με το πεπτίδιο scrambled δεν προκάλεσε περαιτέρω ενεργοποίησή τους. Αντίθετα, η διέγερση με fMLP αύξησε την ενδοκυτταρική παραγωγή $\cdot O_2^-$ κατά 2,5 φορές στους υγιείς δότες (34,7%) και κατά 10 φορές στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού (19,9%, $p < 0,001$ και στις δύο ομάδες, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους αρνητικούς μάρτυρες). Η επώαση των μονοκυττάρων με προΤα(100-109) ή προΤα διπλασίασε την ενδοκυτταρική παραγωγή $\cdot O_2^-$ των υγιών δοτών (30,7% και 30,9%, αντίστοιχα, $p < 0,001$) και τετραπλασίασε εκείνη των ασθενών με καρκίνο του μαστού (7,0% και 7,2%, αντίστοιχα, $p < 0,001$) σε σύγκριση πάντα με τα βασικά επίπεδα παραγωγής $\cdot O_2^-$ (**Εικόνα 3.7Β**). Τα μονοκύτταρα παρουσίασαν γενικά μειωμένη παραγωγή ριζών σε σύγκριση με τα ουδετερόφιλα, καθώς είναι γνωστό ότι τα ουδετερόφιλα αναπτύσσουν εντονότερες αναπνευστικές εκρήξεις (Dale et al., 2008).

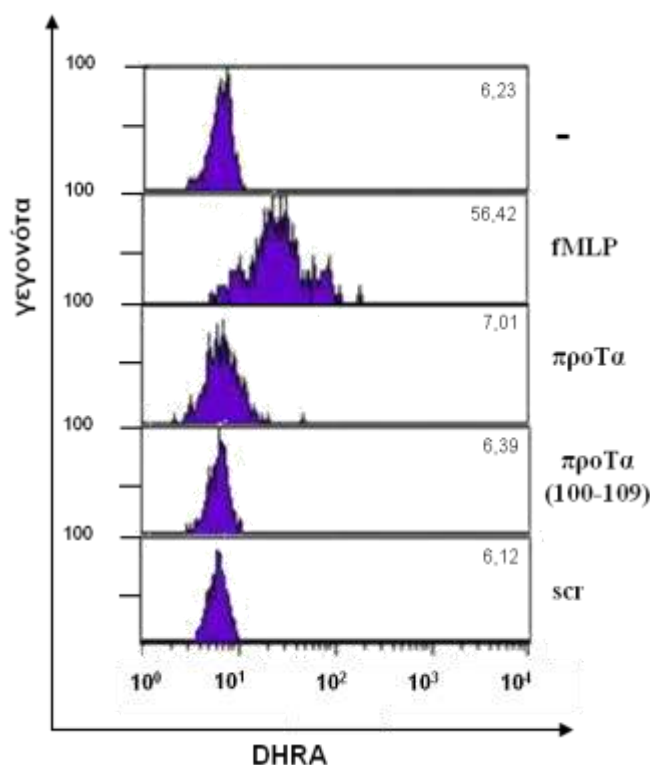
Τα βασικά επίπεδα απελευθέρωσης $\cdot O_2^-$ από τα μονοκύτταρα ήταν παρόμοια σε υγιείς δότες και ασθενείς με καρκίνο του μαστού (29,2 έναντι 25,0, αντίστοιχα), ενώ το πεπτίδιο scrambled δε φάνηκε να έχει καμία επίδραση. Η ενεργοποίηση με fMLP αύξησε κατά 2,5 φορές την απελευθέρωση $\cdot O_2^-$ και στις δύο ομάδες (66,0 για τους υγιείς δότες και 69,2 για τους ασθενείς με καρκίνο). Η ενεργοποίηση με προΤα(100-109) ή προΤα διπλασίασε την απελευθέρωση $\cdot O_2^-$ (60,8 και 60,4 για τους υγιείς δότες, 60,4 και 61 για τους ασθενείς με καρκίνο) (**Εικόνα 3.7Γ**). Ωστόσο, ο αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκε με τη δοκιμασία αναγωγής του κυτοχρώματος c ήταν περιορισμένος, καθώς τα μονοκύτταρα συνιστούν μόνο το 3-10% των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος και έτσι η απομόνωση ενός επαρκούς αριθμού δεν ήταν πάντα επιτυχής, ιδιαίτερα από τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Γι'

αυτό το λόγο, στη δοκιμασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν επιλεγμένα δείγματα, τα οποία έδωσαν υψηλά ποσοστά θετικών κυττάρων στη δοκιμασία της ενδοκυτταρικής παραγωγής $\cdot\text{O}_2^-$.



Εικόνα 3.7. Επίδραση του proTa(100-109) και της proTa στις βασικές λειτουργίες των μονοκυττάρων. Μονοκύτταρα από υγιείς δότες (○) και ασθενείς με καρκίνο του μαστού (△) μελετήθηκαν ως προς τη φαγοκυτταρική τους ικανότητα (A), την ενδοκυτταρική παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$ (B) και την εξωκυτταρική απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$ (Γ). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τα επίπεδα που καταγράφηκαν για κάθε δότη (για τα A και B: υγιείς δότες n=20, ασθενείς με καρκίνο n=10, για το Γ: υγιείς δότες n=5, ασθενείς με καρκίνο n=5). Οι οριζόντιες γραμμές απεικονίζουν τις μέσες τιμές από κάθε ομάδα. (-): μονοκύτταρα σε θρεπτικό υλικό, scr: μονοκύτταρα ενεργοποιημένα με το πεπτίδιο scrambled. ***: $p < 0,001$ όπως υπολογίστηκε με two-way ANOVA.

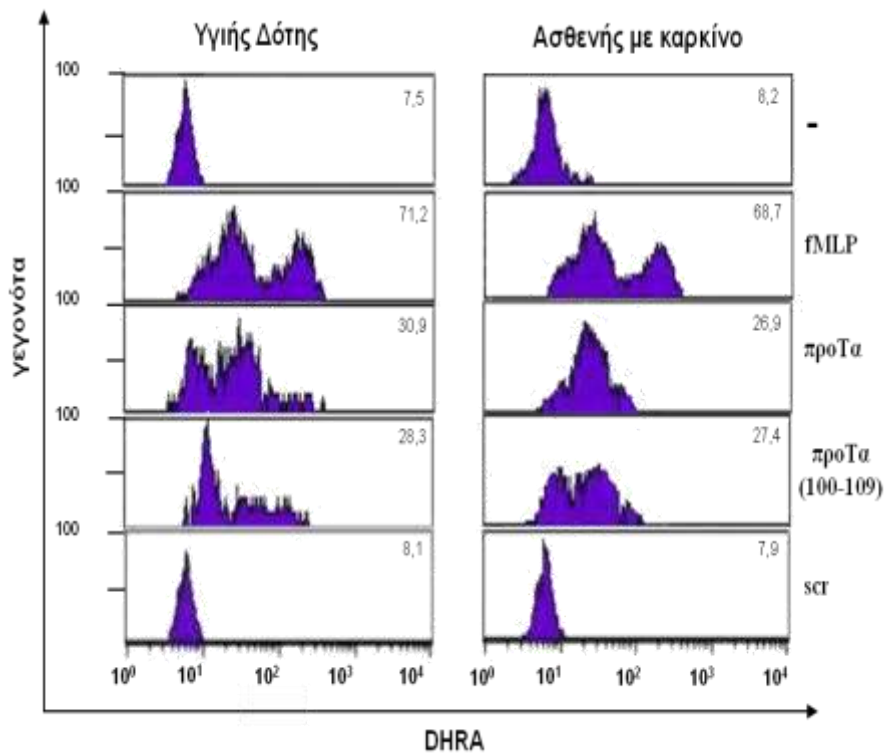
Όσον αφορά τη δοκιμασία Bursttest, αρχικά χρησιμοποιήσαμε ολικό αίμα από υγιείς δότες (**Εικόνα 3.3Α**), ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μόνο το τριπεπτίδιο fMLP, ως ένας ήπιος τρόπος διέγερσης, όπως φάνηκε από τα προηγούμενα πειράματα με τα ουδετερόφιλα. Τα δύο πεπτίδια δεν κατάφεραν να ενισχύσουν την οξειδωτική έκρηξη των μονοκυττάρων, όταν χρησιμοποιήθηκε ολικό αίμα στο οποίο συνυπήρχαν όλοι οι κυτταρικοί υποπληθυσμοί, σε αντίθεση με το fMLP που ενίσχυσε σημαντικά την οξειδωτική έκρηξη [MFI 6,39 για το προΤα(100-109), 7,01 για την προΤα και 56,42 για το fMLP σε σχέση με το μάρτυρα με MFI 6,23] (**Εικόνα 3.8**).



Εικόνα 3.8. Επίδραση του προΤα(100-109) και της προΤα στην οξειδωτική έκρηξη μονοκυττάρων. Ολικό αίμα επώαστηκε σε σκέτο θρεπτικό υλικό (-), με fMLP (θετικός μάρτυρας), προΤα, προΤα(100-109) ή το πεπτίδιο scrambled (scr). Αναλύθηκαν 10^4 οριοθετημένα (gated) γεγονότα. Οι αριθμοί απεικονίζουν τη μέση ένταση φορτισμού (MFI). Τα ιστογράμματα προέρχονται από έναν αντιπροσωπευτικό υγιή δότη από τους 3 που αναλύθηκαν.

Όταν η δοκιμασία επαναλήφθηκε με τη χρήση απομονωμένων μονοκυττάρων (**Εικόνα 3.3Γ**), παρατηρήσαμε ενίσχυση της οξειδωτικής έκρηξης από το προΤα(100-109) και την προΤα, ακριβώς όπως και στην περίπτωση των ουδετερόφιλων. Το MFI των κυττάρων που παράγααν δραστικές ρίζες αυξήθηκε στις ομάδες που ενεργοποιήθηκαν με fMLP, προΤα(100-109) και προΤα (MFI 71,2, 28,3 και 30,9 στους υγιείς δότες και 68,7, 27,4 και 26,9 στους ασθενείς με καρκίνο, αντίστοιχα) σε σύγκριση με τα μη διεγερμένα κύτταρα (MFI

7,5 και 8,2, αντίστοιχα) (Εικόνα 3.9). Επίσης, τα επίπεδα οξειδωτικής έκρηξης ήταν παρόμοια τόσο στους υγιείς δότες όσο και στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού, σε αντίθεση με τα ουδετερόφιλα των καρκινοπαθών, τα οποία ανέπτυξαν εντονότερη οξειδωτική έκρηξη σε σχέση με εκείνα των υγιών δοτών. Επομένως, το προΤα(100-109) και η προΤα, μπορούν να ενισχύσουν εξίσου σημαντικά την αναπνευστική έκρηξη των απομονωμένων μονοκυττάρων που προέρχονται τόσο από υγιείς δότες, όσο και από καρκινοπαθείς.



Εικόνα 3.9. Επίδραση του προΤα(100-109) και της προΤα στην οξειδωτική έκρηξη μονοκυττάρων. Απομονωμένα μονοκύτταρα επώαστηκαν και τα αποτελέσματά τους αναλύθηκαν όπως αναφέρεται στη λεζάντα της Εικόνας 3.8. Τα ιστογράμματα είναι από έναν αντιπροσωπευτικό υγιή δότη και μία ασθενή με καρκίνο του μαστού από τους 3 συνολικά που αναλύθηκαν.

Λαμβάνοντας υπόψιν όλες τις παραπάνω παρατηρήσεις από τη μελέτη των μονοκυττάρων, συμπεραίνουμε ότι τα δύο πεπτιδία, το προΤα(100-109) και η προΤα, επιδρούν σε βασικές λειτουργίες των μονοκυττάρων, δηλαδή, αυξάνουν τη φαγοκυτταρική τους ικανότητα και ενισχύουν την αναπνευστική έκρηξη, τόσο όταν τα μονοκύτταρα προέρχονται από υγιείς δότες όσο και από ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

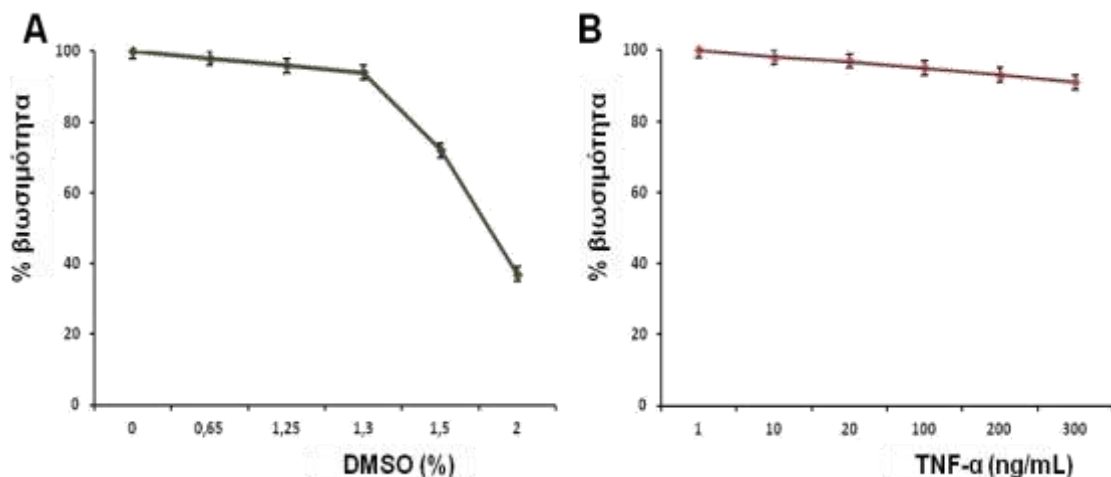
3.3. Μελέτη της επίδρασης του ανοσοδραστικού δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) και της προΤα στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HL-60

Τα *in vitro* αποτελέσματα της επίδρασης των δύο πεπτιδίων σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, καθώς και η αποκατάσταση των μειωμένων λειτουργιών των κυττάρων αυτών στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού, υποδεικνύουν ότι το προΤα(100-109) και η προΤα δρουν ανοσοενισχυτικά και σε κύτταρα της φυσικής ανοσίας. Όμως, τα κύτταρα αυτά έχουν περιορισμένο χρόνο διατήρησης σε *in vitro* καλλιέργειες και είναι ανομοιογενή λόγω της απομόνωσής τους από διαφορετικούς δότες. Προκειμένου να έχουμε στη διάθεσή μας μεγάλο αριθμό κυττάρων της φυσικής ανοσίας, με όσο το δυνατόν πιο ομοιογενή χαρακτηριστικά, επιλέξαμε να διαφοροποιήσουμε *in vitro* κύτταρα της ανθρώπινης προμυελοκυτταρικής λευχαιμικής σειράς HL-60, προς ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα. Η σειρά HL-60 αποτελεί ιδανική επιλογή, καθώς είναι η μοναδική κυτταρική σειρά που έχει τη δυνατότητα *in vitro*, σε σύντομο χρονικό διάστημα, να διαφοροποιείται υπό την επίδραση επαγωγικών παραγόντων προς όλους τους τύπους λευκοκυττάρων (Collins, 1987). Άρα, θα μπορούσε να αποτελέσει μία γρήγορη και συνεχή πηγή παροχής μεγάλου αριθμού λευκοκυττάρων για *in vitro* πειράματα, αλλά και για τη μελλοντική προοπτική σχεδιασμού ενός *in vivo* μοντέλου ανοσοθεραπείας σε ποντίκια.

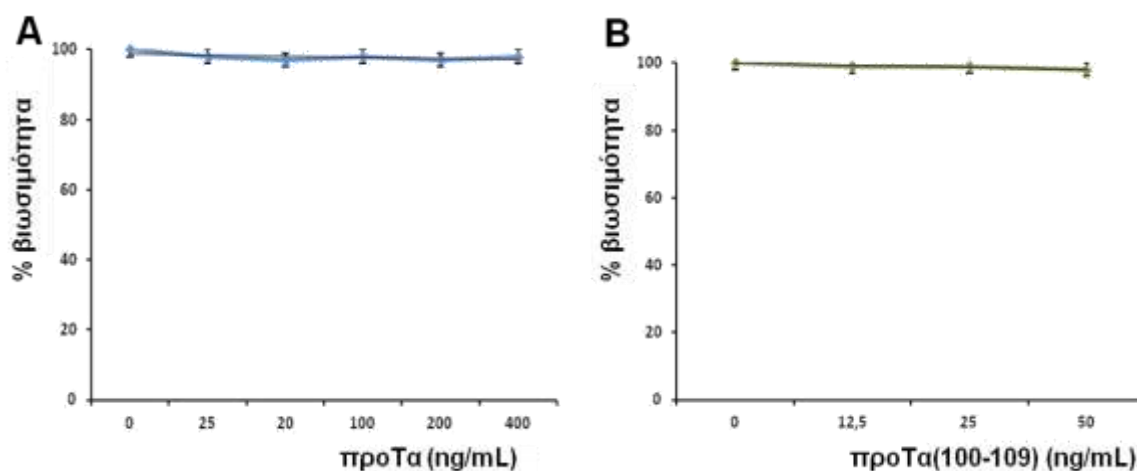
Στη συγκεκριμένη μελέτη, επιλέξαμε να διαφοροποιήσουμε κύτταρα HL-60 με δύο καθιερωμένους επαγωγικούς παράγοντες: με τον κρυοπροστατευτικό παράγοντα DMSO προς ουδετερόφιλα και με την κυτταροκίνη TNF- α προς μονοκύτταρα. Παράλληλα, μελετήσαμε την ικανότητα του προΤα(100-109) και της προΤα να δρουν ως πιθανοί παράγοντες διαφοροποίησης των κυττάρων HL-60 προς ουδετερόφιλα ή μονοκύτταρα, αλλά και την ικανότητα των πεπτιδίων να ενισχύουν τις λειτουργίες των ήδη διαφοροποιημένων κυττάρων HL-60 με τους καθιερωμένους παράγοντες DMSO προς ουδετερόφιλα και TNF- α προς μονοκύτταρα.

Αρχικά, χρησιμοποιήσαμε διαφορετικές συγκεντρώσεις DMSO (0,65-2%) και TNF- α (1-300 ng/mL), προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση των παραγόντων η οποία διαφοροποιεί τα κύτταρα HL-60 που διαθέτουμε στο εργαστήριο, χωρίς να επιφέρει σημαντική μείωση της βιωσιμότητάς τους (Bunce et al., 1983). Βασιζόμενοι στην πλούσια βιβλιογραφία γύρω από τη διαφοροποίηση των κυττάρων HL-60 και μετά από μία αρχική κινητική μελέτη που πραγματοποιήσαμε (αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται), επιλέξαμε το χρονικό διάστημα των 4 ημερών, ως καταλληλότερο για την καταγραφή ικανοποιητικών ποσοστών διαφοροποίησης (Le Cabec et al., 1997; Stika et al., 2006).

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.10**, συγκεντρώσεις DMSO ίσες και μεγαλύτερες του 1,5% επέφεραν σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων HL-60 έως και 40%, ενώ αντίθετα ο TNF- α μείωσε μεν την κυτταρική βιωσιμότητα, αλλά όχι σε επίπεδα χαμηλότερα του 85%, ακόμα και σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις. Έτσι, επιλέξαμε τις συγκεντρώσεις 1,3% DMSO και 100 ng/mL TNF- α για τα πειράματα διαφοροποίησης που θα ακολουθήσουν. Παράλληλα, κύτταρα HL-60 επώαστηκαν για 4 ημέρες και με διαφορετικές συγκεντρώσεις προΤα(100-109) ή προΤα. Παρατηρήσαμε ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων HL-60 δε μειώθηκε αισθητά και σε όλες τις χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις ήταν >97%, επιβεβαιώνοντας ότι τα δύο πεπτίδια δεν είναι τοξικά για τα κύτταρα (**Εικόνα 3.11**). Αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε τα δύο πεπτίδια στις ανοσοδραστικές τους συγκεντρώσεις, δηλαδή, στα 25 ng/mL για το προΤα(100-109) και στα 200 ng/mL για την προΤα (Samara et al., 2013a).

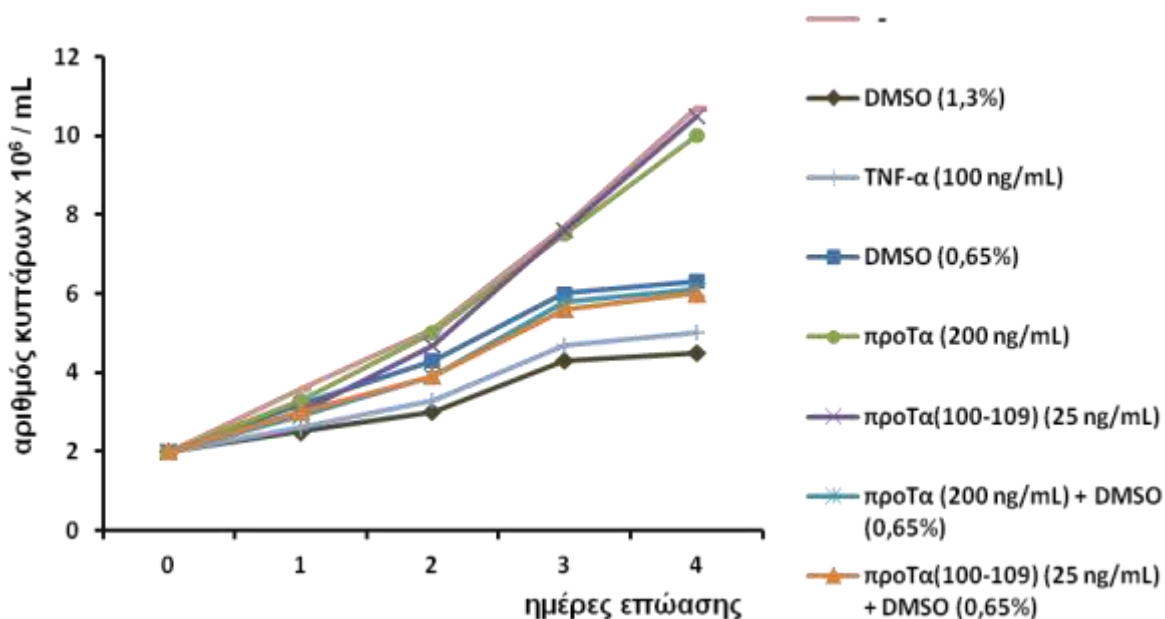


Εικόνα 3.10. Καμπύλη βιωσιμότητας των κυττάρων HL-60 συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων DMSO (0,65-2%) (A) και TNF- α (1-300 ng/mL) (B), μετά από επώαση 4 ημερών. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SD από τρία πειράματα.



Εικόνα 3.11. Καμπύλη βιωσιμότητας των κυττάρων HL-60 συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων προΤα (25-400 ng/mL) (A) και προΤα(100-109) (12,5-50 ng/mL) (B), μετά από επώαση 4 ημερών. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SD από τρία πειράματα.

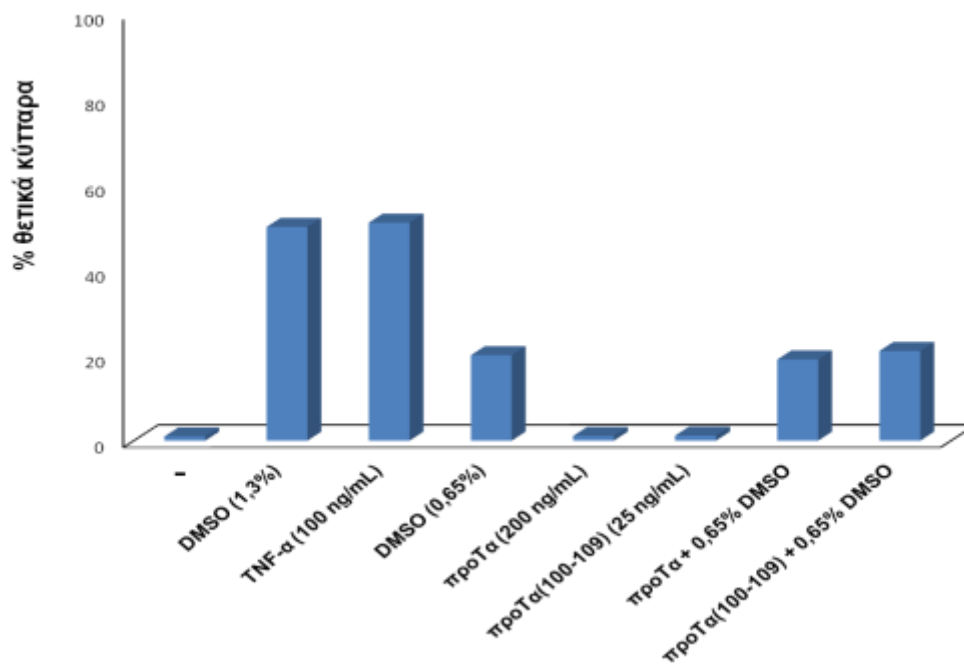
Κύτταρα HL-60 επώαστηκαν για 4 ημέρες με τους εξής παράγοντες: 1,3% DMSO, 100 ng/mL TNF- α , 0,65% DMSO, 200 ng/mL προΤα, 25 ng/mL προΤα(100-109) και συνδυασμούς 0,65% DMSO με προΤα ή προΤα(100-109), προκειμένου να ελέγξουμε την πιθανότητα συνεργιστικής δράσης του DMSO και των ανοσοδραστικών μας πεπτιδίων. Κύτταρα που επώαστηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό απετέλεσαν τον αρνητικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Τα διαφοροποιημένα HL-60 κύτταρα μελετήθηκαν ως προς το ρυθμό ανάπτυξής τους και τη βιωσιμότητά τους μετά από χρώση με Trypan blue. Αναστολή του ρυθμού πολλαπλασιασμού, που είναι ενδεικτική της έναρξης της διαφοροποίησης (Fleck et al., 2005), παρατηρήθηκε, κυρίως, στην περίπτωση των κυττάρων HL-60 που επώαστηκαν με 1,3% DMSO και 100 ng/mL TNF- α και, δευτερευόντως, όταν χρησιμοποιήθηκε η μισή περιεκτικότητα DMSO μόνη της ή σε συνδυασμό με τα πεπτίδια (**Εικόνα 3.12**). Αντίθετα, η επώαση των κυττάρων HL-60 με προΤα(100-109) ή προΤα δεν είχε καμία επίδραση στο πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό και ο ρυθμός ανάπτυξής τους ήταν αντίστοιχος με αυτόν του αρνητικού μάρτυρα (-).



Εικόνα 3.12. Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων HL-60 κατά την επώασή τους για 1-4 ημέρες με σκέτο θρεπτικό υλικό (-), 1,3% DMSO, TNF-α, 0,65% DMSO, προΤα, προΤα(100-109) ή συνδυασμούς 0,65% DMSO με προΤα ή προΤα(100-109). Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι από τρία πειράματα. Η τυπική απόκλιση (SD) ήταν σε όλες τις περιπτώσεις <5% και δεν παρουσιάζεται.

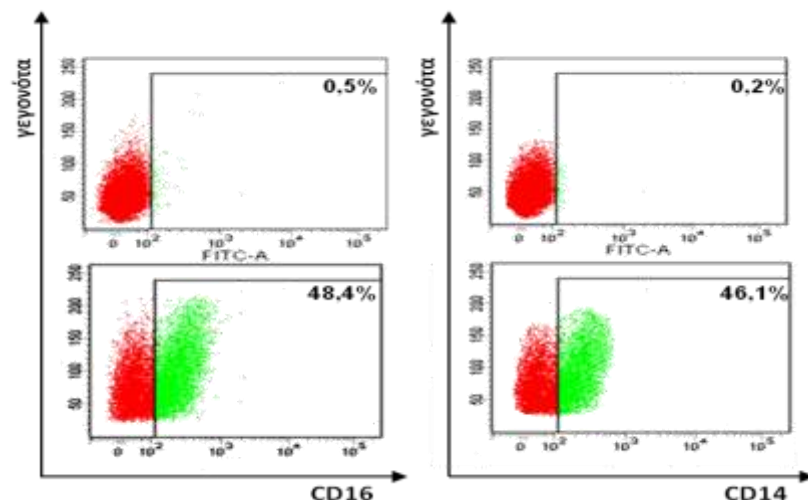
Προς επιβεβαίωση των αρχικών αποτελεσμάτων που λάβαμε από την αναστολή του πολλαπλασιασμού, τα διαφοροποιημένα κύτταρα υποβλήθηκαν, στη συνέχεια, στη δοκιμασία αναγωγής του NBT, μετά από διέγερση με PMA, που αποτελεί γνωστό διεγέρτη της παραγωγής δραστικών ριζών. Ικανότητα παραγωγής ριζών διαθέτουν μόνο όσα κύτταρα έχουν διαφοροποιηθεί προς ουδετερόφιλα ή μονοκύτταρα και όχι τα αδιαφοροποίητα HL-60 κύτταρα (Fleck et al., 2005).

Παρατηρήσαμε ότι μόνο τα κύτταρα HL-60 που επώαστηκαν με 1,3% DMSO ή 100 ng/mL TNF-α παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό θετικών κυττάρων που παράγει ενδοκυτταρικά $\cdot\text{O}_2^-$ (περίπου 50%) και άρα έχουν διαφοροποιηθεί προς ουδετερόφιλα ή μονοκύτταρα, αντίστοιχα. Τα ποσοστά των θετικών κυττάρων στις ομάδες που επώαστηκαν με 0,65% DMSO μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με προΤα(100-109) ή προΤα ήταν περίπου 25%, ενώ με τα πεπτίδια μόνα τους τα ποσοστά κυμαίνονταν στα επίπεδα του αρνητικού μάρτυρα (**Εικόνα 3.13**).



Εικόνα 3.13. Εκτίμηση του % ποσοστού διαφοροποίησης των κυττάρων HL-60 με τη δοκιμασία αναγωγής του NBT. Τα κύτταρα HL-60 επώαστηκαν για 4 ημέρες με τους ίδιους επαγωγικούς παράγοντες που αναφέρονται στην **Εικόνα 3.12** και διεγέρθηκαν με 200 ng/mL PMA για 10 λεπτά. Το ποσοστό των θετικών κυττάρων που καταγράφηκε υπολογίστηκε όπως στην **Εικόνα 3.2B**. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι από τρία πειράματα. Η τυπική απόκλιση (SD) ήταν σε όλες τις περιπτώσεις <5% και δεν παρουσιάζεται.

Τέλος, τα διαφοροποιημένα με DMSO ή TNF-α κύτταρα, τα οποία παρήγαγαν ενδοκυτταρικά $\cdot\text{O}_2^-$, ελέγχθηκαν και με κυτταρομετρία ροής για την έκφραση των χαρακτηριστικών επιφανειακών μορίων-δεικτών CD16 για τα ουδετερόφιλα και CD14 για τα μονοκύτταρα. Με βάση τα στικτογράμματα, παρατηρούμε ότι τα αδιαφοροποίητα κύτταρα HL-60 εκφράζουν σε ελάχιστο ποσοστό τα χαρακτηριστικά επιφανειακά μόρια των ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων (0,5% το CD16 και 0,2% το CD14, αντίστοιχα), καθώς στην πλειοψηφία τους είναι προμυελοκύτταρα. Ωστόσο, όταν τα κύτταρα αυτά διαφοροποιήθηκαν υπό την επίδραση DMSO ή TNF-α, παρατηρήσαμε επαγωγή της επιφανειακής έκφρασης των ανάλογων δεικτών (48,4% το CD16 και 46,1% το CD14, αντίστοιχα) (**Εικόνα 3.14**).

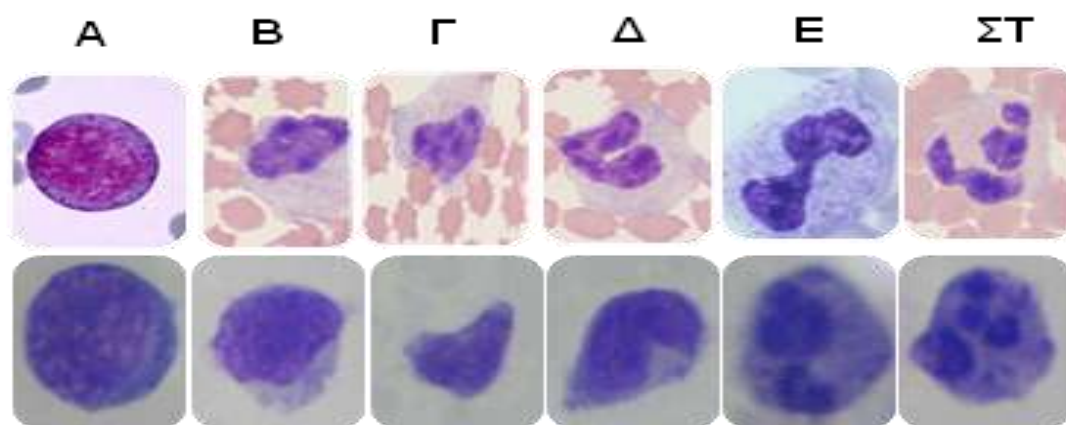


Εικόνα 3.14. Έκφραση των επιφανειακών μορίων δεικτών CD16 (για τα ουδετερόφιλα) και CD14 (για τα μονοκύτταρα) σε αδιαφοροποίητα κύτταρα HL-60 (άνω) και σε κύτταρα HL-60 που διαφοροποιήθηκαν για 4 ημέρες με DMSO (αριστερά) ή TNF- α (δεξιά), αντίστοιχα (κάτω). Ενδεικτικά στικτογράμματα από ένα πείραμα από τα συνολικά 3 που πραγματοποιήθηκαν με αντίστοιχα αποτελέσματα.

Κύτταρα HL-60 που επώαστηκαν με DMSO και διαφοροποιήθηκαν προς ουδετερόφιλα, υποβλήθηκαν σε χρώση May-Grünwald-Giemsa, προκειμένου να μελετηθεί η μορφολογία των πυρήνων τους, αφού είναι γνωστό ότι κατά τη φυσιολογική διαδικασία ωρίμανσης των ουδετερόφιλων μεσολαβούν πολλαπλά στάδια μέχρι το ώριμο ουδετερόφιλο (Chang et al., 2006). Θελήσαμε, λοιπόν, να μελετήσουμε αν αυτή η φυσιολογική διαδικασία ακολουθείται και κατά την *in vitro* διαφοροποίηση κυττάρων HL-60 προς ουδετερόφιλα, με τον επαγωγικό παράγοντα DMSO.

Παρατηρήσαμε ότι υπό την επίδραση 1,3% DMSO στα κύτταρα HL-60 για 4 ημέρες, ταυτοποιήσαμε κύτταρα σε όλα τα στάδια ωρίμανσης, με το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων να παραμένει στο στάδιο του ραβδοπύρηνου ουδετερόφилου, δηλαδή, δύο «στάδια» πριν το πλήρως ώριμο ουδετερόφιλο (**Εικόνα 3.15**). Αντίθετα, υπό την επίδραση προΤα(100-109) ή προΤα, η συντριπτική πλειοψηφία των κυττάρων ήταν προμυελοκύτταρα, με μεγάλο στρογγυλό πυρήνα, διάσπαρτη πυρηνική χρωματίνη και χωρίς ικανότητα παραγωγής ριζών οξυγόνου (Collins et al., 1978), παρατηρήσεις που συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα των προηγούμενων δοκιμασιών (**Πίνακας 3.4**). Φάνηκε, λοιπόν, ότι κατά την *in vitro* διαφοροποίηση των κυττάρων HL-60 προς ουδετερόφιλα, η πλειονότητα των κυττάρων «σταματούν» σε πρώιμα στάδια και μόνο ένας χαμηλός αριθμός διαφοροποιείται

πλήρως προς ώριμα ουδετερόφιλα, με ιδιότητες αντίστοιχες των ουδετερόφιλων που απομονώνονται από ανθρώπινο περιφερικό αίμα.



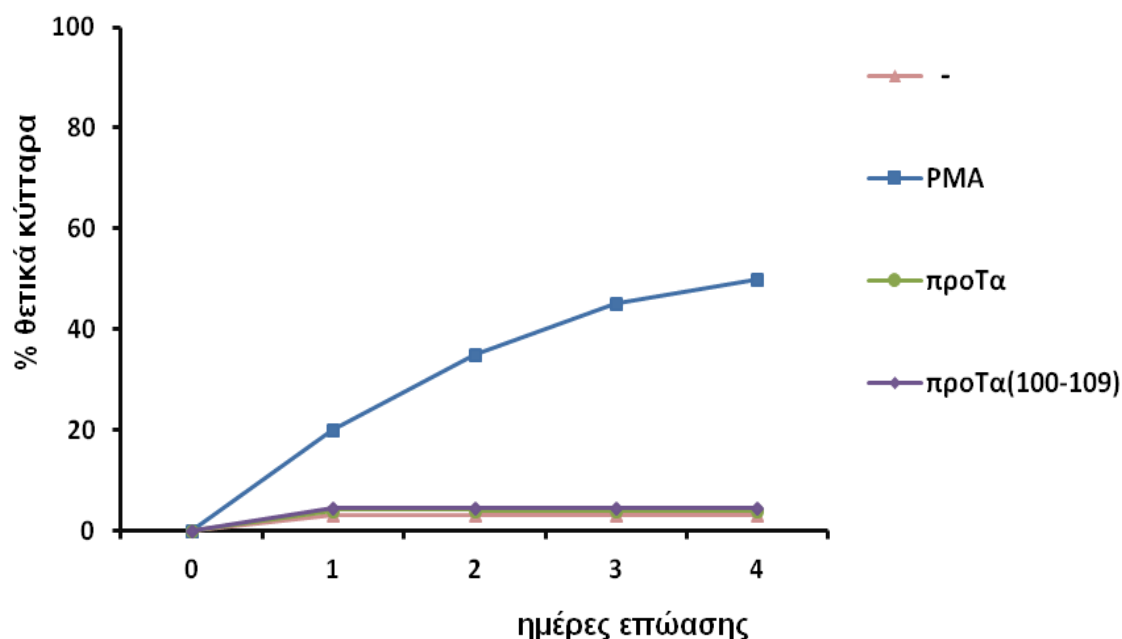
Εικόνα 3.15. Χαρακτηριστικές εικόνες κυττάρων HL-60 κατά την 4^η ημέρα διαφοροποίησής τους με 1,3% DMSO προς ουδετερόφιλα, μετά από χρώση May-Grünwald-Giemsa. Προς σύγκριση, παραθέτουμε αντιπροσωπευτικές εικόνες από τη βιβλιογραφία (άνω σειρά) και εικόνες από τα διαφοροποιημένα προς ουδετερόφιλα HL-60 στο εργαστήριό μας (κάτω σειρά), μετά από παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο (100X). Τα διαδοχικά στάδια ωρίμανσης είναι: προμυελοκύτταρο (Α), μυελοκύτταρο (Β), μεταμυελοκύτταρο (Γ), “banded” ή ραβδοπύρηνιο ουδετερόφιλο (Δ), “early segmented” ουδετερόφιλο (Ε) και “mature segmented” ή ώριμο ουδετερόφιλο (ΣΤ). Ενδεικτικά αποτελέσματα από ένα πείραμα από τα τρία που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας 3.4. Ποσοστά κυττάρων κατά τα στάδια διαφοροποίησης των κυττάρων HL-60 προς ώριμα ουδετερόφιλα, μετά από τετραήμερη επίδραση με τους παράγοντες διαφοροποίησης.

Παράγοντας διαφοροποίησης	Κυτταρική μορφολογία*					
	Προμυελο κύτταρο	Μυελο κύτταρο	Μεταμυελο κύτταρο	Banded	Early segmented	Mature segmented
1,3% DMSO	+	+/-	+	++ (~ 50%)	+	+
0,65% DMSO	++	+/-	+	+ (<50%)	+/-	+/-
προΤα	+++	+/-	+	+ (<<50%)	-	-
προΤα(100-109)	+++	+/-	+	+ (<<50%)	-	-
προΤα + 0,65% DMSO	++	+/-	+	+ (<50%)	+/-	+/-
προΤα(100-109) + 0,65% DMSO	++	+/-	+	+ (<50%)	+/-	+/-

*Τα αποτελέσματα είναι μέσοι όροι από 3 πειράματα.

Εφόσον το προΤα(100-109) και η προΤα δεν επέδειξαν ικανότητα διαφοροποίησης, χρησιμοποιήθηκαν ως διεγέρτες της παραγωγής $\cdot\text{O}_2^-$ από τα ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα HL-60. Ελέγχσαμε την παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$ κάθε μέρα, κατά τη διάρκεια της τετραήμερης επώασης των κυττάρων HL-60 με το DMSO. Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματά μας, τα δύο πεπτίδια, προΤα(100-109) και προΤα, δεν κατάφεραν να ενισχύσουν την παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$ ούτε και στα διαφοροποιημένα με τους καθιερωμένους επαγωγικούς παράγοντες HL-60 κύτταρα, σε αντίθεση με το PMA που προκάλεσε έντονη παραγωγή ριζών (Εικόνα 3.16).



Εικόνα 3.16. Μεταβολή του % ποσοστού των θετικών κυττάρων με τη δοκιμασία ενδοκυτταρικής παραγωγής $\cdot\text{O}_2^-$ (NBT) σε διαφοροποιημένα με DMSO, HL-60 κύτταρα, ανά ημέρα επώασης με τον παράγοντα διαφοροποίησης. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι από τρία πειράματα. Η τυπική απόκλιση (SD) ήταν σε όλες τις περιπτώσεις <5% και δεν παρουσιάζεται.

Αν και τα δύο πεπτίδια, η προΤα και το προΤα(100-109), ενισχύουν σημαντικά τις λειτουργίες σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα απομονωμένα από το περιφερικό αίμα, δεν μπόρεσαν να επιδείξουν αντίστοιχη ικανότητα διέγερσης κυττάρων που διαφοροποιούνται *in vitro* προς τους ίδιους υποπληθυσμούς. Υποθέτουμε ότι σε κύτταρα που διαφοροποιούνται *in vitro*, μπορεί να απουσιάζουν ή να εκφράζονται σε μειωμένα επίπεδα, βασικά μόρια απαραίτητα για την ενδοκυτταρική σηματοδότηση που οδηγεί σε ενεργοποίηση. Ίσως, οι διαφορές αυτές να οφείλονται στη διαφορετική έκφραση του TLR-4 ή/και των συνοδών του μορίων (CD14, MD-2) από τα διαφοροποιημένα ή μη HL-60 κύτταρα, αφού ο TLR-4 είναι

υποδοχέας μέσω του οποίου δρουν η προΤα και το προΤα(100-109) (Ioannou et al., 2013). Δεν προχωρήσαμε σε περαιτέρω διερεύνηση της αιτίας, καθώς τα γενικότερα ποσοστά διαφοροποίησης των κυττάρων HL-60 προς ουδετερόφιλα ή μονοκύτταρα, ακόμα και υπό την επίδραση των καθιερωμένων παραγόντων DMSO ή TNF-α, ήταν σημαντικά χαμηλότερα από εκείνα που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Fleck et al., 2005).

3.4. Παραγωγή αντισωμάτων για την ανάπτυξη ανοσοδοκιμασίας ELISA για το δεκαπεπτιδίο προΤα(100-109) – ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της δοκιμασίας

Η ανοσοενισχυτική δράση τόσο της προΤα όσο και του προΤα(100-109) σε βασικές λειτουργίες των ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων περιφερικού αίματος υγιών δοτών και ασθενών με καρκίνο έρχεται να προστεθεί στις ήδη γνωστές εξωκυτταρικές ανοσοενισχυτικές δράσεις, κυρίως του ακέραιου πολυπεπτιδίου αλλά και του ανοσοδραστικού του τμήματος, στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Ioannou et al., 2012). Παράλληλα, γνωρίζουμε ήδη μία συνθήκη παραγωγής του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) κατά τον κυτταρικό θάνατο, καθώς κατά την απόπτωση, η προΤα υπόκειται ενδοκυτταρικά σε πέψη από τις ενεργοποιημένες κασπάσες στο D⁹⁹ (Evstafieva et al., 2003). Στην προσπάθεια σύνδεσης των δύο ρόλων της προΤα, του εξωκυτταρικού και του ενδοκυτταρικού, πολύ πρόσφατα δεδομένα του εργαστηρίου μας υποστηρίζουν ότι τα δύο μόρια δρουν ως σήματα κινδύνου, αφού η εξωκυτταρική τους απελευθέρωση, η αναγνώρισή τους από κύτταρα της φυσικής ανοσίας και η σηματοδότηση μέσω TLRs, μπορούν να επάγουν την ενίσχυση των ανοσολογικών απαντήσεων (Bianchi 2007; Ioannou et al., 2013).

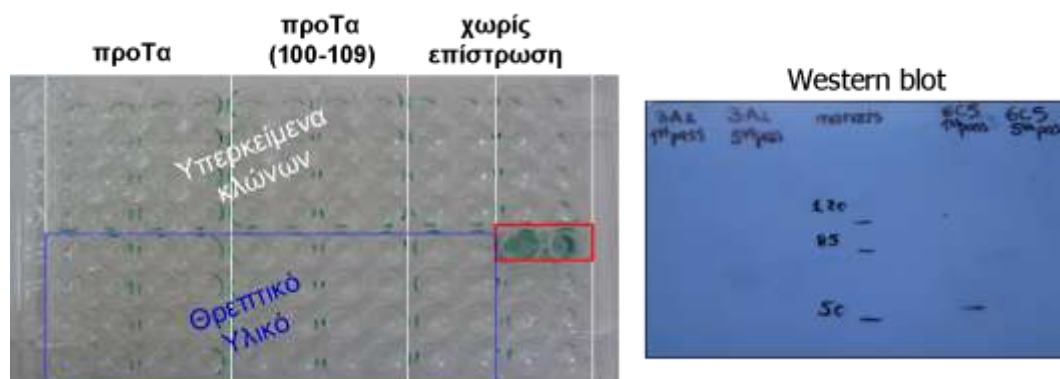
Όλα τα παραπάνω ευρήματα μας οδήγησαν στην προσπάθεια ανάπτυξης μίας δοκιμασίας, η οποία να μπορεί να προσδιορίζει με ακρίβεια τα ενδογενή πεπτιδία, την προΤα, αλλά κυρίως το δεκαπεπτιδίο προΤα(100-109), που απελευθερώνονται εξωκυτταρικά σε περιπτώσεις μαζικού θανάτου των κυττάρων, ο οποίος είναι συχνός και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως η σήψη. Επικεντρωθήκαμε, έτσι, στη δημιουργία τόσο μονοκλωνικών όσο και πολυκλωνικών αντισωμάτων εναντίον του δεκαπεπτιδίου, ώστε να αναπτυχθεί μία ιδιαίτερα ευαίσθητη και ειδική ανοσοδοκιμασία τύπου ELISA.

3.4.1. Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων για το προΤα(100-109)

Παρόλο που τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν το βασικό πλεονέκτημα να αναγνωρίζουν ένα μόνο επίτοπο του αντιγόνου και τα παραγόμενα υβριδώματα αποτελούν σταθερή και ανανεώσιμη πηγή πανομοιότυπης ειδικότητας αντισωμάτων, μονοκλωνικά αντισώματα έναντι ολόκληρης της προΤα έχουν παραχθεί επιτυχώς μόνο μία φορά (Sukhacheva et al., 2002). Στα πειράματά μας για την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων, ποντίκια της φυλής BALB/c ανοσοποιήθηκαν με 0,5 mg Cys-προΤα(100-109) συζευγμένο με KLH. Τα σπληνοκύτταρα των ποντικών συντήχθηκαν με τη συγγενική μυελωματική σειρά ποντικού NSO και οι θετικές κυτταρικές σειρές που προέκυψαν, κλωνοποιήθηκαν. Προέκυψαν, έτσι, 2 υβριδικοί κλώνοι (3A2 και 6C5) οι οποίοι παρήγαγαν αντισώματα έναντι του προΤα(100-109), όπως φάνηκε από την αρχική ανάλυση των

υπερκειμένων των καλλιιεργειών τους. Και τα δύο υπερκείμενα περιείχαν αντισώματα με υψηλό τίτλο και συγγένεια τόσο για το προΤα(100-109) όσο και για το ακέραιο πολυπεπίδιο.

Στη συνέχεια, συλλέχθηκαν υπερκείμενα από τις καλλιέργειες των υβριδωμάτων σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά από διαδοχικές (2-6) ανακαλλιέργειες και ελέγχθηκαν ως προς τη σταθερή παραγωγή μονοκλωνικού αντισώματος. Δυστυχώς, κανένα από τα υβριδώματα που αρχικά ήταν θετικά, δεν παρήγαγε σταθερά μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του προΤα(100-109), όπως φάνηκε τόσο με άμεση ELISA όσο και με ανοσοστύπωμα κατά Western (Εικόνα 3.17). Υποθέτουμε ότι η ιδιαίτερα χαμηλή ανοσογονικότητα των δύο πεπτιδίων, η οποία είναι και βιβλιογραφικά γνωστή (Klimentzou et al., 2006), πιθανόν και η τάξη των παραγόμενων ανοσοσφαιρινών, συντέλεσαν στην αποτυχία σταθερής παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων από τα υβριδώματα που δημιουργήθηκαν.



Εικόνα 3.17. Φωτογραφίες της μικροπλάκας ELISA (αριστερά) και της ανάλυσης κατά Western (δεξιά). Η μικροπλάκα επιστρώθηκε με προΤα, προΤα(100-109) ή ήταν χωρίς επίστρωση και μετά τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων με BSA, προστέθηκαν υπερκείμενα των υβριδικών κλώνων ή θρεπτικό υλικό. Τα φρεάτια με την κόκκινη επισήμανση (πράσινο χρώμα) ήταν οι θετικοί μάρτυρες της δοκιμασίας. Τα ίδια υπερκείμενα των υβριδικών κλώνων αναλύθηκαν και με ανοσοστύπωμα κατά Western, όπου εντοπίστηκε μία αχνή ζώνη μοριακής μάζας ~60kDa μόνο στην πρώτη ανακαλλιέργεια του κλώνου 6C5, έπειτα από ιδιαίτερα μεγάλο χρόνο έκθεσης του φιλμ (90 λεπτά). Ενδεικτικά αποτελέσματα ενός από τα συνολικά 3 πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

3.4.2. Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων για το προΤα(100-109)

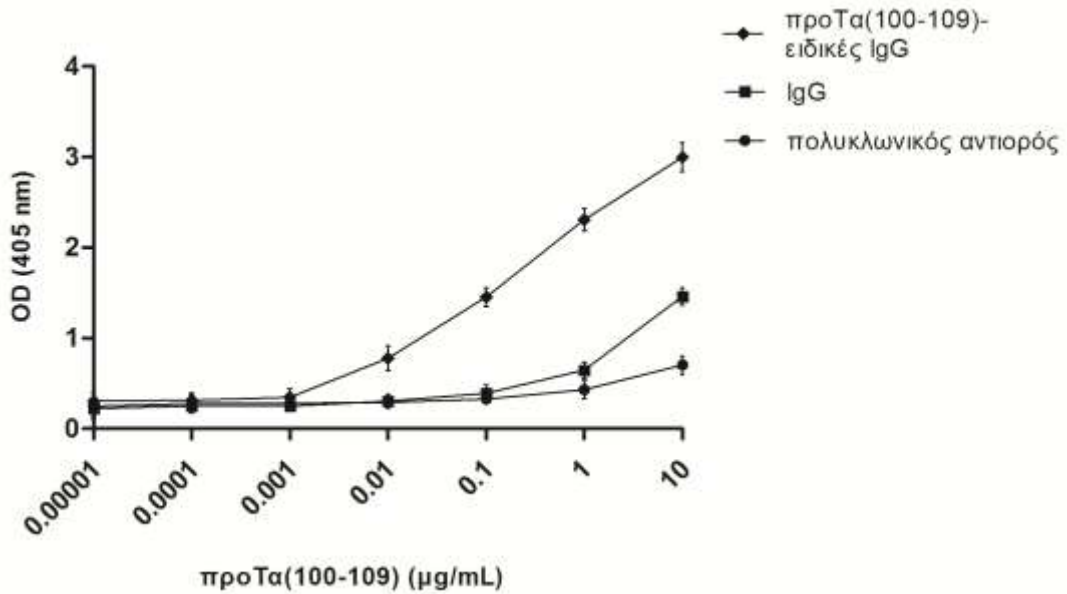
Για την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων, ανοσοποιήσαμε κουνέλια Νέας Ζηλανδίας με το ίδιο αντιγόνο όπως και τα ποντίκια, και απομονώσαμε τον αντιγόρο τους. Ένα μέρος των πολυκλωνικών αντισωμάτων από τον αντιγόρο του κουνελιού καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη πρωτεΐνης G, απ' όπου απομονώθηκαν οι ολικές IgG. Το υπόλοιπο μέρος καθαρίστηκε σε ειδική στήλη σφαιρόζης, στην οποία, μέσω του

καταλοίπου Cys, είχαμε ακινητοποιήσει το δεκαπεπτίδιο, ώστε να απομονωθούν μόνο οι ειδικές για το δεκαπεπτίδιο IgG.

Επιπλέον, για την ανάπτυξη της ανοσοδοκιμασίας συνθέσαμε ικανή ποσότητα ελεύθερου και βιοτινυλιωμένου προΤα(100-109), προσδένοντας τη βιοτίνη στο αμινοτελικό άκρο του πεπτιδίου, με τη βοήθεια αμινοεξανοϊκού οξέως. Μετά την ανάπτυξη της βασικής ανοσοδοκιμασίας, πραγματοποιήσαμε σειρά βελτιστοποιήσεων της μεθόδου, προκειμένου να αυξηθεί το χρήσιμο εύρος μέτρησης και η ευαισθησία της, να αξιολογηθεί η ευρωστία της και να ελαχιστοποιηθούν πιθανές παρεμβολές από άλλα μόρια, ώστε να ενδείκνυται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του προΤα(100-109) σε βιολογικά δείγματα.

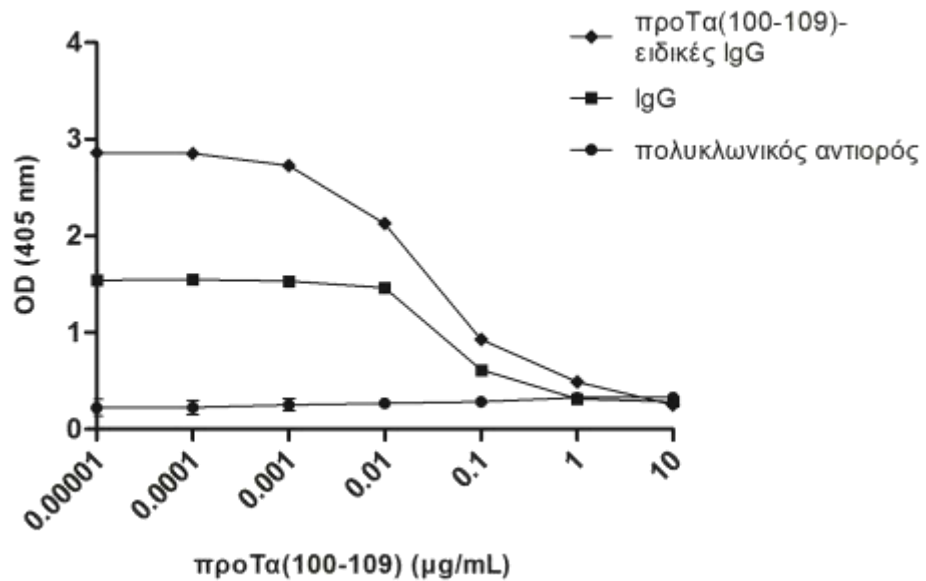
3.4.3. Ευαισθησία της αναπτυχθείσας ELISA για το προΤα(100-109)

Για την ανάπτυξη ELISA ειδικής για το προΤα(100-109) και αρκετά ευαίσθητης ώστε να ανιχνεύει χαμηλές συγκεντρώσεις του δεκαπεπτιδίου, ελέγξαμε και τους 3 τύπους αντιορού, δηλαδή τον απομονωμένο από το ζώο, τις ολικές IgG και τις ειδικές για το δεκαπεπτίδιο IgG. Προκειμένου να διαπιστώσουμε ποιο από τα τρία κλάσματα ανοσοσφαιρινών παρουσιάζει την καλύτερη ευαισθησία χρησιμοποιήσαμε, αρχικά, σύστημα άμεσης ELISA, όπου επιστρώσαμε μικροπλάκες με τον πολυκλωνικό αντιορό του κουνελιού (αραιωμένο 1/200.000 σε DPBS), τις καθαρισμένες ολικές IgG (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε DPBS) και τις ειδικές για το προΤα(100-109) IgG (0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε DPBS, 100 $\mu\text{L}/\text{φρεάτιο}$, για όλους τους τύπους των αντισωμάτων). Η μικροπλάκα επώαστηκε για 18 ώρες (overnight) στους 4°C. Προστέθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις βιοτινυλιωμένου προΤα(100-109) (0,01 ng/mL -10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) αραιωμένου σε DPBS και οι οπτικές απορροφήσεις (OD) μετρήθηκαν στα 405 nm. Όπως παρατηρήσαμε, οι ειδικές για το προΤα(100-109) IgG παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία δέσμευσης του βιοτινυλιωμένου δεκαπεπτιδίου, σε σύγκριση και με τις IgG και με τον πολυκλωνικό αντιορό (**Εικόνα 3.18**).



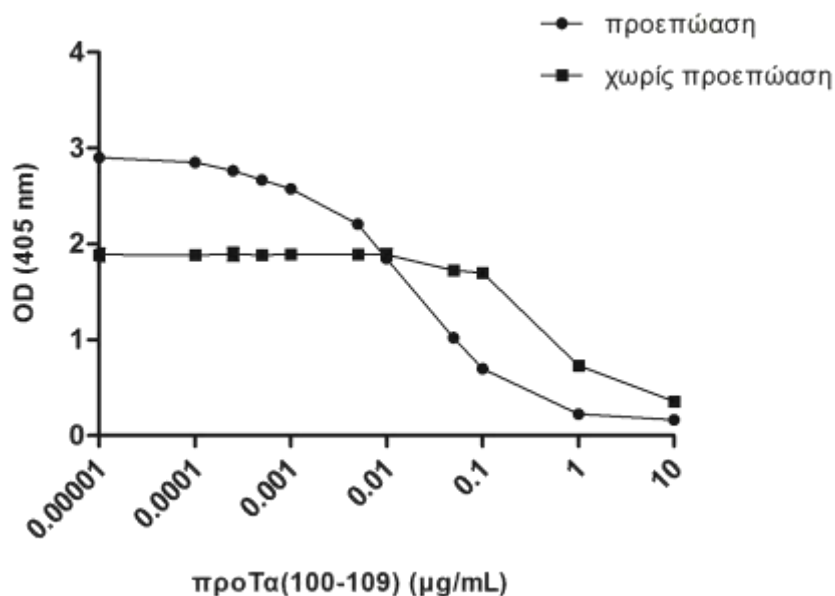
Εικόνα 3.18. Οι ειδικές για το προΤα(100-109) IgG προσδένουν το βιοτινυλιωμένο δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) με υψηλή ευαισθησία. Οι μικροπλάκες επιστρώθηκαν με τον πολυκλωνικό αντιορό κουνελιού, τις καθαρισμένες από αυτόν IgG ή τις ειδικές για το προΤα(100-109) IgG και στα φρεάτια προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις βιοτινυλιωμένου προΤα(100-109) (0,01 ng/mL-10 μg/mL) αραιωμένου σε DPBS (άμεση ELISA). Κάθε αραιώση επαναλήφθηκε εις τριπλούν. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SD από τρία πειράματα.

Προκειμένου να αυξήσουμε την ευαισθησία, μελετήσαμε διάφορα πρωτόκολλα επίστρωσης των μικροπλακών, με τη χρήση διαφορετικών πρωτεϊνών επίστρωσης: αβιδίνης, στρεπταβιδίνης και πρωτεΐνης A, με την πρωτεΐνη A να αποτελεί την τελική επιλογή για την ανάπτυξη της ELISA (αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Τα ίδια κλάσματα ανοσοσφαιρινών αξιολογήθηκαν περαιτέρω σε ανταγωνιστικό σύστημα ELISA. Σειριακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ελεύθερου προΤα(100-109) (0,01 ng/mL-10 μg/mL) προεπώαστηκαν με συγκεκριμένη συγκέντρωση (5 ng/mL) βιοτινυλιωμένου προΤα(100-109), παρουσία των προαναφερθέντων κλασμάτων ανοσοσφαιρινών και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μικροπλάκες ELISA που είχαν ήδη επικαλυφθεί με πρωτεΐνη A. Οι μη ειδικές θέσεις δέσμησης καλύφθηκαν με διάλυμα κορεσμού, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, § 2.17. Παρατηρήσαμε ότι η πιο ευαίσθητη καμπύλη προέκυψε με τη χρήση των ειδικών για το προΤα(100-109) IgG, με χρήσιμο εύρος μέτρησης από 0,1 ng/mL-10 μg/mL δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) (**Εικόνα 3.19**).



Εικόνα 3.19. Πρότυπες καμπύλες για το προΤα(100-109) σε σύστημα ανταγωνιστικής ELISA. Ελεύθερο και βιοτινυλιωμένο προΤα(100-109) επώαστηκαν με τον πολυκλωνικό αντιορό του κουνελιού, τις καθαρισμένες από αυτόν IgG ή τις ειδικές για το προΤα(100-109) IgG και μεταφέρθηκαν σε προεπιστρωμένη με πρωτεΐνη A μικροπλάκα. Η συγκέντρωση του ελεύθερου πεπτιδίου-ανταγωνιστή ήταν 0,01 ng/mL-10 μg/mL. Παρουσιάζονται μέσες τιμές \pm SD από τρία πειράματα.

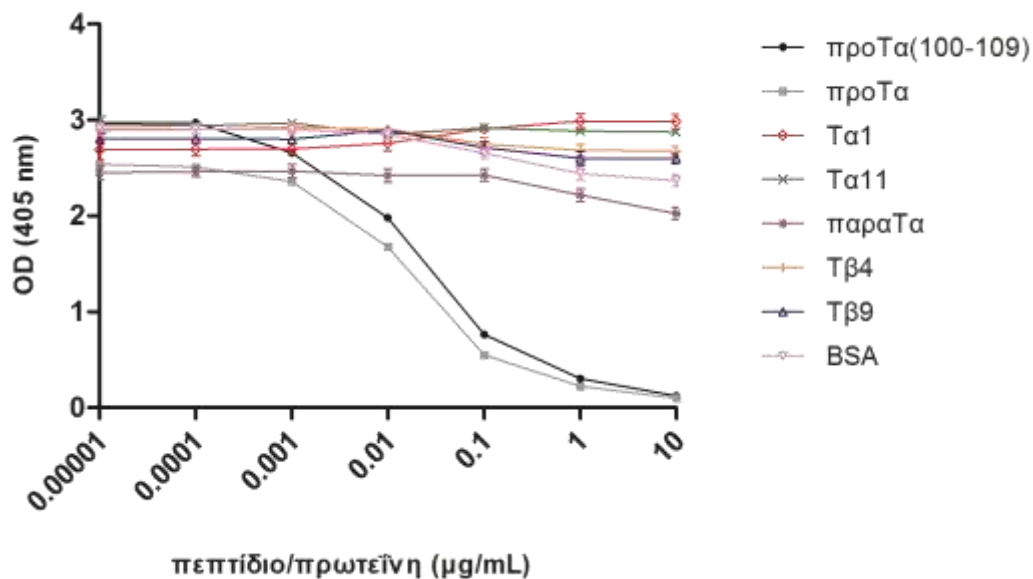
Παράλληλα, δοκιμάσαμε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους επώασης των πεπτιδίων-αντιγόνων με τα αντισώματα. Ελεύθερο και βιοτινυλιωμένο προΤα(100-109) και οι ειδικές για το προΤα(100-109) IgG προστέθηκαν στη μικροπλάκα, χωρίς ή με προεπώαση για 18 ώρες στους 4°C. Παρατηρήσαμε ότι η προεπώαση πεπτιδίων-αντισωμάτων παρείχε την υψηλότερη ευαισθησία, χωρίς να αυξάνεται το σήμα υποβάθρου και, έτσι, επιλέχθηκε ως πρότυπη συνθήκη για τα επόμενα πειράματα (**Εικόνα 3.20**).



Εικόνα 3.20. Η προεπώαση του προΤα(100-109) με τις ειδικές IgG αυξάνει την ευαισθησία της ELISA. Ελεύθερο και βιοτινυλιωμένο προΤα(100-109) προεπώαστηκαν για 18 ώρες στους 4°C ή δεν προεπώαστηκαν με τις προΤα(100-109)-ειδικές IgG. Οι απεικονιζόμενες τιμές αφορούν μέσους όρους \pm SD από τρία πειράματα.

3.4.4. Ειδικότητα της αναπτυχθείσας ELISA για το προΤα(100-109)

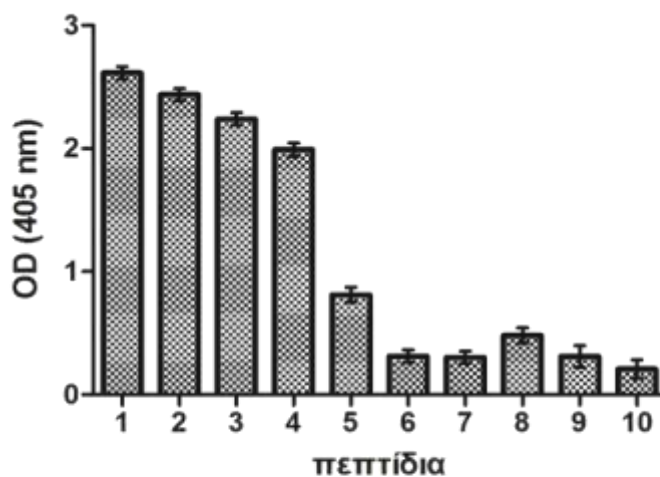
Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα της βελτιστοποιημένης ανταγωνιστικής ELISA προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας μία σειρά από μόρια, ως ανταγωνιστές. Οι ειδικές για το προΤα(100-109) IgG και το βιοτινυλιωμένο προΤα(100-109) προεπώαστηκαν με: προΤα(100-109), ακέραιη προΤα, BSA και τις θυμοσίνες, παραθυμοσίνη α (παραΤα), θυμοσίνη α1 (Τα1), θυμοσίνη α11 (Τα11), θυμοσίνη β4 (Τβ4) και θυμοσίνη β9 (Τβ9). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.21**, τα αντισώματα αναγνώρισαν και δέσμευσαν ειδικά το δεκαπεπτίδιο, καθώς και την ακέραιη προΤα, αλλά δεν παρουσίασαν διασταυρούμενη αντιδραστικότητα έναντι οποιασδήποτε άλλης θυμοσίνης ή της BSA.



Εικόνα 3.21. Οι ειδικές για το προΤα(100-109) IgG αναγνωρίζουν την ακέραη προΤα, αλλά δεν παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίδραση με άλλες θυμοσίνες. Διάφορες συγκεντρώσεις των πεπτιδίων επώαστηκαν με βιοτινυλιωμένο προΤα(100-109) και τις ειδικές για το προΤα(100-109) IgG. Οι τιμές που απεικονίζονται είναι οι μέσοι όροι \pm SD από δύο πειράματα. Τα1: θυμοσίνη α1, Τα11: θυμοσίνη α11, παραΤα: παραθυμοσίνη α, Τβ4: θυμοσίνη β4, Τβ9: θυμοσίνη β9, BSA: αλβουμίνη ορού μόσχου.

3.4.5. Ο ανοσοκυρίαρχος επίτοπος των αντι-προΤα(100-109) αντισωμάτων εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 103-109

Για τον προσδιορισμό των αμινοξέων που είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση με το αντίσωμα, συνθετικά πεπτίδια που στερούνταν είτε αμινο- είτε καρβοξυ-τελικών αμινοξέων από την αλληλουχία του προΤα(100-109), ελέγχθηκαν ως προς τη δέσμευσή τους από τις ειδικές για το προΤα(100-109) IgG. Το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) και το πεπτίδιο scrambled χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας, αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.22**, η αντιδραστικότητα των αντισωμάτων μειώθηκε σημαντικά με την αφαίρεση των αμινοξέων μετά τη θέση 106, υποδηλώνοντας ότι ο κύριος ανοσογονικός επίτοπος των ειδικών αντι-προΤα(100-109) IgG εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 103-109.



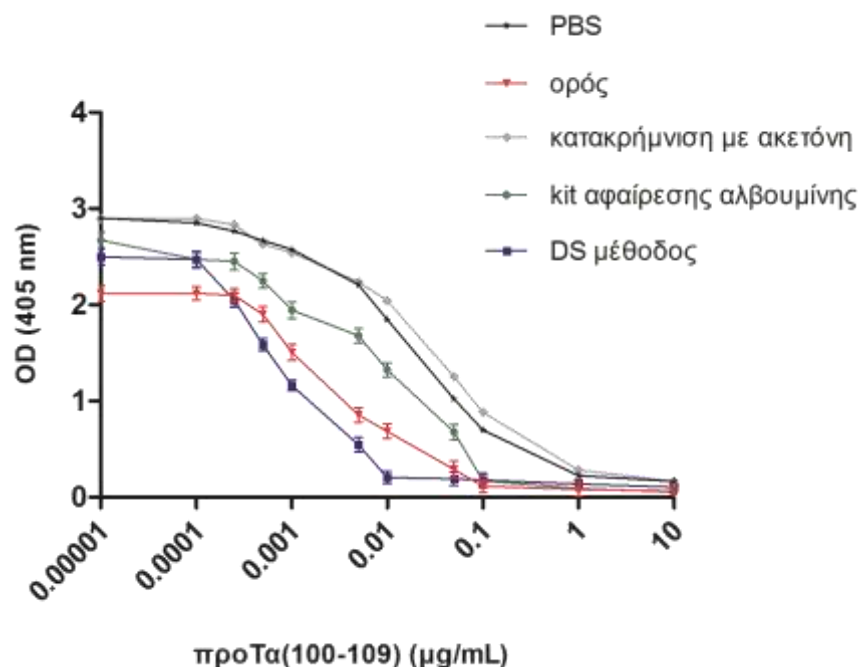
- 1 . ΤΚΚQKTDEDD
- 2 . ΚΚQKTDEDD
- 3 . ΚQKTDEDD
- 4 . QKTDEDD
- 5 . ΤΚΚQKTDED
- 6 . ΤΚΚQKTDE
- 7 . ΤΚΚQKTD
- 8 . ΚΚQKTDED
- 9 . ΚQKTDE
- 10 . ΚΕΤDKDKTDQ

Εικόνα 3.22. Ο ανοσοκυρίαρχος επίτοπος των αντι-προΤα(100-109) IgG εντοπίζεται μεταξύ των καταλοίπων 103-109. Συνθετικά πεπτίδια που στερούνταν αμινο- ή/και καρβο-ξυτελικών καταλοίπων (ευθυγραμμισμένες αλληλουχίες 2-9) επωάστηκαν με τις ειδικές για το προΤα(100-109) IgG. Το προΤα(100-109) (1) και το πεπτίδιο scrambled (10) χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας, αντίστοιχα. Οι απεικονιζόμενες τιμές είναι μέσοι όροι \pm SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

3.4.6. Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών υψηλού μοριακού βάρους από τον ορό του αίματος αυξάνει την ευαισθησία της αναπτυχθείσας ELISA για το προΤα(100-109)

Οι ειδικές για το προΤα(100-109) IgG επωάστηκαν με ελεύθερο και βιοτινυλιωμένο προΤα(100-109) σε διάφορα μέσα αραίωσης: DPBS, ανθρώπινο ορό και ανθρώπινο ορό κατακρημνισμένο με τρεις διαφορετικές μεθόδους [με χρήση κρύας ακετόνης, μετά από κατεργασία με kit αφαίρεσης αλβουμίνης και με διαφορετική διαλυτοποίηση (DS)]. Η καμπύλη που παρουσίασε παρόμοια ευαισθησία με την πρότυπη καμπύλη του DPBS ως μέσου αραίωσης, ήταν εκείνη του κατακρημνισμένου με ακετόνη ορού, με χρήσιμο εύρος μέτρησης

από 0,1 ng/mL-1 $\mu\text{g/mL}$ (Εικόνα 3.23). Ο μη κατακρημνισμένος ορός οδήγησε σε κατακόρυφη πτώση της ευαισθησίας, υποδεικνύοντας ότι οι πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους που περιέχονται σε αυτόν, παρεμποδίζουν την ικανότητα των ειδικών για το προΤα(100-109) IgG να συνδέονται ειδικά με το δεκαπεπτίδιο.



Εικόνα 3.23. Ο κατακρημνισμένος με ακετόνη ορός βελτιώνει την ευαισθησία της ELISA για το προΤα(100-109). Ελεύθερο προΤα(100-109) αραιώθηκε σειριακά σε DPBS, ανθρώπινο ορό ή ποικιλοτρόπως κατακρημνισμένο ανθρώπινο ορό [χρησιμοποιώντας κρύα ακετόνη, kit αφαίρεσης αλβουμίνης και τη μέθοδο διαφορικής διαλυτοποίησης (DS)] και συνεπωάστηκε με βιοτινυλιωμένο προΤα(100-109) και τις ειδικές για το προΤα(100-109) IgG. Οι απεικονιζόμενες τιμές αφορούν μέσες τιμές \pm SD από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

3.4.7. Ακρίβεια της αναπτυχθείσας ELISA για το προΤα(100-109)

Η ακρίβεια της δοκιμασίας προσδιορίστηκε με την εκτέλεση δοκιμών εξωτερικής (inter) και εσωτερικής (intra) διακύμανσης σε κάθε δοκιμασία. Ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) της εξωτερικής δοκιμασίας προσδιορίστηκε από 10 πρότυπες καμπύλες με κάθε αραιώση μετρημένη εις διπλούν, που προέκυψαν από μία περίοδο 5 εβδομάδων και ήταν 18%, ενώ ο CV εντός της δοκιμασίας, προσδιορίστηκε με ανάλυση 5 δειγμάτων ορού κατακρημνισμένου με ακετόνη, εντός της ίδιας πλάκας και ήταν 1,5%. Για να αποκλειστούν τυχόν παρεμβολές από το υπόστρωμα, πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες εμπλουτισμού-ανάκτησης (spike-recovery). Η ανάκτηση του προΤα(100-109) σε δείγματα ορού κατακρημνισμένου με ακετόνη, προσδιορίστηκε μετά από εμπλουτισμό (spiking) του

δείγματος ορού με γνωστές ποσότητες συνθετικού προΤα(100-109). Η % ανάκτηση υπολογίστηκε διαιρώντας τη συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου όπως προσδιορίστηκε με την ELISA, με τη θεωρητική συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου στο δείγμα. Η δοκιμασία που αναπτύξαμε πληροί τα καθορισμένα κριτήρια ανάλυσης (Lexmond et al., 2011), καθώς το ποσοστό ανάκτησης του δεκαπεπτιδίου ήταν σε όλες τις περιπτώσεις >70% (Πίνακας 3.5).

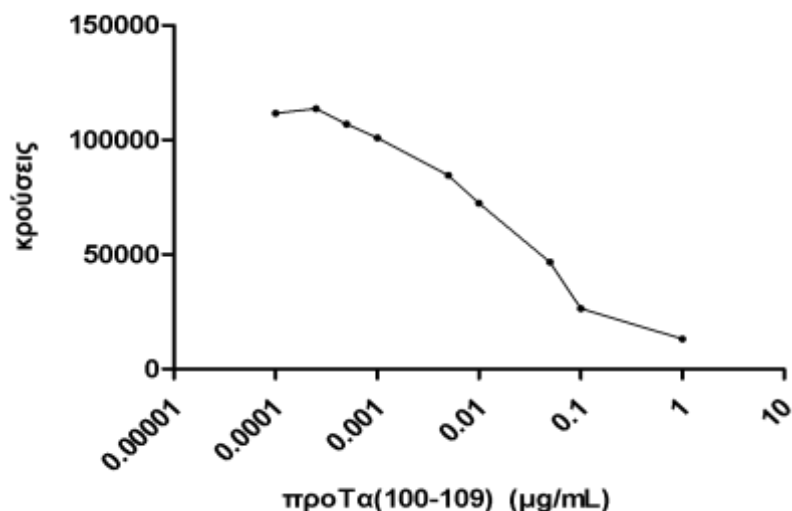
Πίνακας 3.5. Ακρίβεια της αναπτυχθείσας ELISA για το προΤα(100-109). Κατακρημνισμένος ορός ανθρώπου εμπλουτίστηκε με διαφορετικές συγκεντρώσεις προΤα(100-109) (θεωρητική συγκέντρωση), οι οποίες προσδιορίστηκαν με την αναπτυχθείσα ανοσοδοκιμασία (ανιχνευθείσα συγκέντρωση).

Συγκέντρωση προστιθέμενου προΤα(100-109)	Θεωρητική συγκέντρωση (ng/mL)	Ανιχνευθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	SD	Ανάκτηση ^a (%)
υψηλή	128	115,5	3,606	90,23
μέτρια	16	13,5	0,764	84,38
χαμηλή	2	1,7	0,416	85,00

^a Υπολογίστηκε διαιρώντας την ανιχνευθείσα με τη θεωρητική συγκέντρωση $\times 100$.

3.5. Ανάπτυξη φθορισμομετρικής μεθόδου DELFIA για το προΤα(100-109)

Παράλληλα με την ανταγωνιστικού τύπου ELISA που αναπτύξαμε, δοκιμάστηκε και η τρίτης γενιάς φθορισμομετρική μέθοδος DELFIA, η οποία βασίζεται στη χημεία των λανθανιδών, εμφανίζει υψηλή ευαισθησία με ευρεία δυναμική περιοχή μέτρησης και τείνει πλέον, διεθνώς, να υποκαταστήσει τις παραδοσιακές ELISA (Talha et al., 2013). Όμως, όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα, στη δική μας περίπτωση η DELFIA δεν παρουσίασε χαμηλότερο όριο ανίχνευσης για το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109), σε σύγκριση με την ELISA, γι αυτό και δεν προχώρησε περαιτέρω η βελτιστοποίησή της (Εικόνα 3.24).



Εικόνα 3.24. Πρότυπη καμπύλη DELFIA για το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109). Ελεύθερο και βιοτινυλιωμένο προΤα(100-109) επώαστηκαν με τις ειδικές για το προΤα(100-109) IgG. Η συγκέντρωση του ελεύθερου πεπτιδίου-ανταγωνιστή ήταν 0,01 ng/mL-10 μg/mL. Παρουσιάζονται οι κρούσεις από το ένα από τα δύο πειράματα που εκτελέστηκαν.

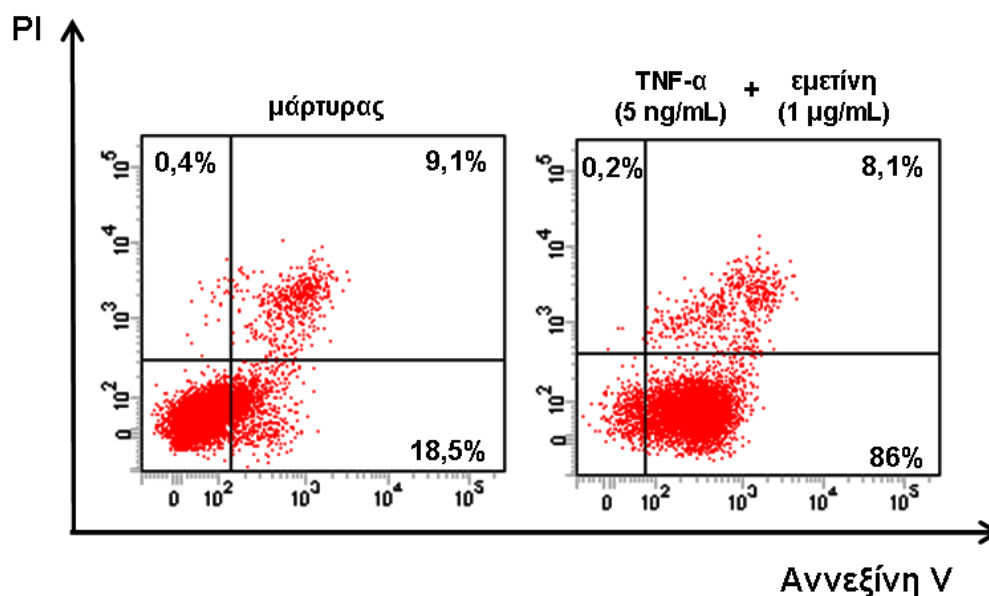
3.6. Ανίχνευση του προΤα(100-109) σε υπερκείμενα κυττάρων που οδηγήθηκαν *in vitro* σε κυτταρικό θάνατο

Έχοντας αναπτύξει την ειδική και ευαίσθητη ανταγωνιστική ELISA για το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109), θελήσαμε να προσδιορίσουμε ποσοτικά τη συγκέντρωση του προΤα(100-109): (1) *in vitro*, σε υπερκείμενα καλλιιεργειών κυττάρων που οδηγήθηκαν σε απόπτωση και νέκρωση, (2) *in vivo*, σε μοντέλα λοίμωξης ποντικών από βακτηριακά στελέχη που επάγουν μαζικό αποπτωτικό θάνατο κυρίως στα μονοκύτταρα/μακροφάγα και (3) *ex vivo*, σε ορούς ασθενών με βακτηριακές λοιμώξεις και με φλεγμονώδεις καταστάσεις μη λοιμώδους αιτιολογίας.

Αρχικά, εξετάστηκαν τα επίπεδα του δεκαπεπτιδίου σε υπερκείμενα κυττάρων που οδηγήθηκαν *in vitro* σε κυτταρικό θάνατο. Για την επαγωγή απόπτωσης και νέκρωσης, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa που είναι γνωστό ότι φυσιολογικά υπερεκφράζουν την προΤα (Evstafieva et al., 2003). Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις παραγόντων επαγωγής κυτταρικού θανάτου (TNF-α, εμετίνη, ακτινομυκίνη D και δοξορουβικίνη, μεμονωμένα ή σε συνδυασμούς) και διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης των κυττάρων, προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες. Τα ποσοστά των αποπτωτικών/νεκρωτικών κυττάρων ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας: (α) αννεξίνη V (annexin V), η οποία δεσμεύεται με τη φωσφατιδυλοσερίνη και επιτρέπει την

αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των αποπτωτικών κυττάρων και (β) ιωδιούχο προπίδιο (propidium iodide, PI) για τη διάκριση των νεκρωτικών κυττάρων.

Στην περίπτωση της απόπτωσης, ως ιδανικές συνθήκες επελέγησαν εκείνες κατά τις οποίες το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων HeLa βρισκόταν στο στάδιο της πρώιμης απόπτωσης (annexin+PI-), καθώς η θραυσματοποίηση της προΤα από τις ενεργοποιημένες κασπάσες είναι ένα ιδιαίτερα πρώιμο αποπτωτικό γεγονός (ανιχνεύεται εντός 2 ωρών από την έναρξη του κυτταρικού θανάτου) (Evstafieva et al., 2000). Όπως χαρακτηριστικά φαίνεται από τα ενδεικτικά στικτογράμματα που παρατίθενται, τα κύτταρα μετά τη χρώση με την αννεξίνη V και το PI διαχωρίζονται σε 4 υποπληθυσμούς (τεταρτημόρια), καθένας από τους οποίους περιέχει διαφορετικά ως προς τα χαρακτηριστικά τους κύτταρα (**Εικόνα 3.25**). Κάτω δεξιά εντοπίζονται τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (18,5% για το μάρτυρα και 86% για το συνδυασμό TNF-α και εμετίνης) και άνω δεξιά τα όψιμα αποπτωτικά/πρώιμα νεκρωτικά κύτταρα (9,1% για το μάρτυρα και 8,1% για το συνδυασμό TNF-α και εμετίνης). Τα ποσοστά 0,4% στο μάρτυρα και 0,2% στα HeLa που επώαστηκαν με TNF-α και εμετίνη αντιστοιχούν στα νεκρωτικά κύτταρα.



Εικόνα 3.25. Ενδεικτικά στικτογράμματα κυττάρων HeLa που επώαστηκαν για 4 ώρες με θρεπτικό υλικό (μάρτυρας) ή με το συνδυασμό 100 ng/mL TNF-α + 1 μg/mL εμετίνη, μετά από χρώση με αννεξίνη V και PI. Τα ποσοστά των κυττάρων με πρώιμα αποπτωτικά, όψιμα αποπτωτικά/πρώιμα νεκρωτικά και νεκρωτικά χαρακτηριστικά σημειώνονται στο κάτω δεξιά, άνω δεξιά και άνω αριστερά τεταρτημόριο, αντίστοιχα.

Με βάση τα αποτελέσματα, η επώαση των κυττάρων HeLa με το συνδυασμό 5 ng/mL TNF-α και 1 μg/mL του αναστολέα της πρωτεϊνσύνθεσης, εμετίνη, για 4 ώρες, αποτέλεσε την καλύτερη συνθήκη επαγωγής απόπτωσης στα κύτταρα, καθώς το 85,7% των κυττάρων HeLa χαρακτηρίστηκαν ως πρώιμα αποπτωτικά. Ο συνδυασμός TNF-α με τον αναστολέα της μεταγραφής, ακτινομυκίνη D, οδήγησε το 72,6% των κυττάρων στο στάδιο της πρώιμης απόπτωσης, ενώ ο TNF-α μόνος του, σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, περίπου το 60%. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις της ανθρακυκλίνης δοξορουβικίνης (0,1-10 μg/mL) έδωσαν ποσοστά πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων μεταξύ 35-40%. Αντίθετα, η ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση δοξορουβικίνης των 100 μg/mL και η εναλλαγή ψύξης-απόψυξης οδήγησαν τη συντριπτική πλειοψηφία των κυττάρων HeLa (>90%) προς νέκρωση (Πίνακας 3.6 και Παράρτημα I).

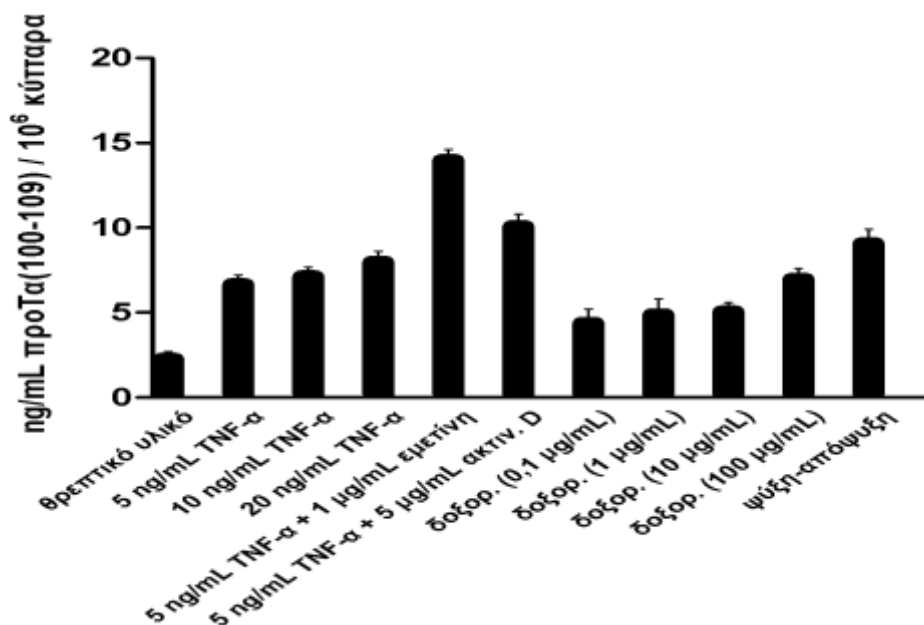
Πίνακας 3.6. Ποσοστά αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά από επώαση κυττάρων HeLa για 4 ώρες με διάφορους παράγοντες επαγωγής κυτταρικού θανάτου ή μετά από 3 διαδοχικούς κύκλους ψύξης-απόψυξης.

Παράγοντας επαγωγής κυτταρικού θανάτου (συγκέντρωση)	Πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (Annex+ PI-) %	Όψιμα αποπτωτικά/ πρώιμα νεκρωτικά κύτταρα (Annex+ PI+) %	Νεκρωτικά κύτταρα (Annex- PI+) %
Κύτταρα σε θρεπτικό υλικό/μάρτυρας (-)	19,0*	8,6	0,4
TNF-α (5 ng/mL)	53,7	11,4	0,4
TNF-α (10 ng/mL)	59,4	13,1	0,3
TNF-α (20 ng/mL)	61,0	11,8	0,1
TNF-α (5 ng/mL) + εμετίνη (1 μg/mL)	85,7	7,9	0,1
TNF-α (5 ng/mL) + ακτινομυκίνη D (5 μg/mL)	72,6	17,8	0,5
δοξορουβικίνη (0,1 μg/mL)	31,5	7,1	0
δοξορουβικίνη (1 μg/mL)	35,1	7,5	0
δοξορουβικίνη (10 μg/mL)	40,0	15,1	0
δοξορουβικίνη (100 μg/mL)	0	25,5	74,4
3 κύκλοι διαδοχικής ψύξης-απόψυξης	2,2	86,7	2,4

Η τυπική απόκλιση (SD) ήταν σε όλες τις περιπτώσεις <5% και δεν παρουσιάζεται.

* Μέσες τιμές από 3 πειράματα.

Από όλες τις παραπάνω καλλιέργειες, συλλέχθηκαν υπερκείμενα, τα οποία στη συνέχεια αναλύθηκαν με την αναπτυχθείσα ELISA, προκειμένου να προσδιοριστεί σε αυτά η συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109). Στο υπερκείμενο-μάρτυρα, δηλαδή στα κύτταρα HeLa που επωάστηκαν σε σκέτο θρεπτικό υλικό, ανιχνεύθηκαν 2,3 ng/mL προΤα(100-109). Σε όλα τα υπερκείμενα που οδηγήθηκαν σε κυτταρικό θάνατο, η αρχική αυτή συγκέντρωση βρέθηκε αυξημένη από 2 έως 6 φορές (4,4-14,0 ng/mL δεκαπεπτιδίου). Ο συνδυασμός TNF- α και εμετίνης παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση προΤα(100-109) (14,0 ng/mL), αποτέλεσμα που συμφωνεί με το ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό πρώιμα αποπτωτικών κυττάρων που καταγράφηκε για τη συνθήκη αυτή (85,7%). Ξεχωριστή αναφορά αξίζει να γίνει για τις δύο συνθήκες που οδηγούν σε νέκρωση: τα 100 μ g/mL δοξορουβικίνης και την εναλλαγή ψύξης-απόψυξης. Και στις δύο περιπτώσεις ανιχνεύθηκε σήμα με την ELISA και συγκεκριμένα καταγράφηκαν συγκεντρώσεις 7,0 και 9,1 ng/mL προΤα(100-109), αντίστοιχα (Εικόνα 3.26). Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι τα αντισώματά μας αναγνωρίζουν εξίσου καλά το ακέραιο μόριο της προΤα, το οποίο σε συνθήκες νέκρωσης, όπου η κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου υφίσταται ρήξη, απελευθερώνεται εξωκυτταρικά.



Εικόνα 3.26. Συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε υπερκείμενα καλλιιεργειών της κυτταρικής σειράς HeLa, μετά από *in vitro* επαγωγή κυτταρικού θανάτου με TNF- α (5, 10 ή 20 ng/mL), δοξορουβικίνη (0,1-100 μ g/mL), συνδυασμό TNF- α (5 ng/mL) με εμετίνη (1 μ g/mL) και ακτινομυκίνη D (5 μ g/mL), καθώς και εναλλαγή κύκλων ψύξης-απόψυξης. Παρουσιάζονται μέσες τιμές \pm SD από 2 πειράματα.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές ανθρώπου (MCF-7, K562, U937 και THP-1) και ποντικού (YAC), καθώς και υποπληθυσμοί λευκοκυττάρων (μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα και λεμφοκύτταρα), απομονωμένοι από το περιφερικό αίμα υγιών δοτών. Όλα τα κύτταρα οδηγήθηκαν σε απόπτωση με τη συνθήκη που προσδιορίσαμε ως βέλτιστη στην κυτταρική σειρά HeLa, δηλαδή το συνδυασμό TNF-α και εμετίνης, εκτός από τα ουδετερόφιλα. Τα ουδετερόφιλα οδηγήθηκαν αυθόρμητα σε απόπτωση μετά από 24ωρη καλλιέργεια απουσία ορού (Kobayashi et al., 2005). Παρατηρήσαμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις ανιχνεύθηκε υψηλό ποσοστό πρώιμα αποπτωτικών κυττάρων (61-87,3% για τις κυτταρικές σειρές και ~80% για τους απομονωμένους υποπληθυσμούς), με μικρές διακυμάνσεις ανάλογα με την ανθεκτικότητα του κάθε κυτταρικού τύπου στην απόπτωση και τα ενδογενή επίπεδα προΤα που εκφράζει (Πίνακας 3.7 και Παράρτημα Ι).

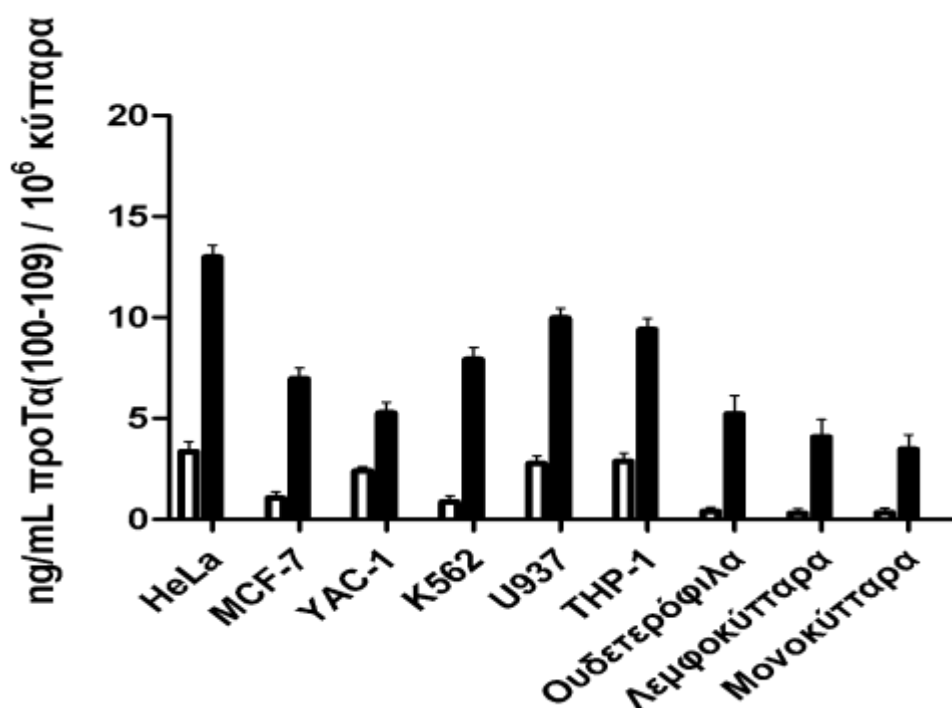
Πίνακας 3.7. Ποσοστά αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά από επώαση των κυττάρων για 4 ώρες με 5 ng/mL TNF-α και 1 μg/mL εμετίνη.

Κύτταρα (τύπος, είδος)	Πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (Annex+ PI-) %	Όψιμα αποπτωτικά/ πρώιμα νεκρωτικά κύτταρα (Annex+ PI+) %	Νεκρωτικά κύτταρα (Annex- PI+) %
Καρκινικές κυτταρικές σειρές			
HeLa (τραχήλου της μήτρας, ανθρώπου)	85,7 ^β	7,9	0,1
MCF-7 (μαστού, ανθρώπου)	87,3	6,9	0
YAC (λέμφωμα, ποντικού)	65,0	3,9	0,1
K562 (χρόνια μυελογενής λευχαιμία, ανθρώπου)	61,0	10,7	0,5
U937 (ιστιοκυτταρικό λέμφωμα, ανθρώπου)	73,3	15,6	0,4
THP-1 (οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία, ανθρώπου)	82,6	6,3	0,5
Λευκοκυτταρικοί υποπληθυσμοί			
Ουδετερόφιλα ^α	81,5	4,7	0,9
Λεμφοκύτταρα	76,9	15,3	0
Μονοκύτταρα	79,9	8,3	0

^α Τα ουδετερόφιλα οδηγήθηκαν σε απόπτωση καλλιεργώντας τα για 24 ώρες απουσία ορού.

^β Μέσες τιμές από 3 πειράματα. Η τυπική απόκλιση (SD) ήταν σε όλες τις περιπτώσεις <5% και δεν παρουσιάζεται.

Ομοίως, όλα τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με την ELISA για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε αυτά. Παράλληλα, συλλέχθηκαν και αντίστοιχα υπερκείμενα-μάρτυρες από καλλιέργειες των ίδιων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό. Παρατηρήσαμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις, στα υπερκείμενα-μάρτυρες η συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου ήταν χαμηλή (0,3-3,36 ng/mL) και αυξήθηκε σημαντικά σε όλα τα αποπτωτικά υπερκείμενα (3,47-12,99 ng/mL) (Εικόνα 3.27). Τα υπερκείμενα των αποπτωτικών κυττάρων HeLa παρουσίασαν τα υψηλότερα επίπεδα δεκαπεπτιδίου σε σχέση με τις υπόλοιπες σειρές. Αντίστοιχα, τα πιο υψηλά επίπεδα δεκαπεπτιδίου ανιχνεύθηκαν στα υπερκείμενα των αποπτωτικών ουδετερόφιλων σε σχέση με τους άλλους δύο λευκοκυτταρικούς υποπληθυσμούς (Εικόνα 3.27).



Εικόνα 3.27. Συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε υπερκείμενα καλλιιεργειών αποπτωτικών κυτταρικών σειρών και λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών. Με άσπρο χρώμα απεικονίζονται τα επίπεδα από τα υπερκείμενα-μάρτυρες, ενώ με μαύρο αυτά των υπερκειμένων από αποπτωτικά κύτταρα.

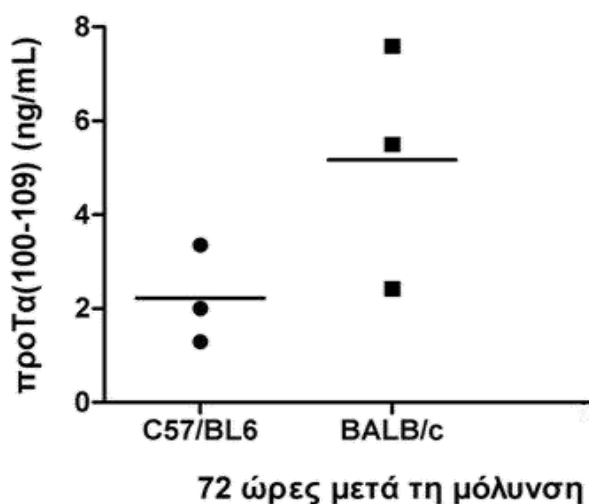
3.7. Ανίχνευση του προΤα(100-109) σε *in vivo* μοντέλα βακτηριακής λοίμωξης σε ποντίκια

Σε επόμενο βήμα θελήσαμε να πιστοποιήσουμε αν η ανοσοδοκιμασία μπορεί να μετρήσει τη συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου σε βιολογικά υγρά και συγκεκριμένα στον ορό του αίματος. Αναπτύξαμε γνωστά και καθιερωμένα *in vivo* μοντέλα λοίμωξης σε ποντίκια, που χρησιμοποιούνται ευρέως τα τελευταία 20 χρόνια, κυρίως λόγω των ανατομικών ομοιοτήτων των ποντικών με τον άνθρωπο. Επιλέχθηκε η πρόκληση λοίμωξης στα ζώα από συγκεκριμένα παθογόνα στελέχη βακτηρίων, που οδηγούν σε μαζική απόπτωση τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ώστε να αυξήσουμε τις πιθανότητες παραγωγής και εξωκυτταρικής απελευθέρωσης του δεκαπεπτιδίου στον ορό των ζώων. Για τη μόλυνση, χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια απομονωμένα από νοσούντες ασθενείς (clinical isolates), τα οποία προκαλούν ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων στον άνθρωπο (**Πίνακας 3.8**). Οι οροί των ποντικών απομονώθηκαν, κατακρημνίστηκαν με κρύα ακετόνη και αναλύθηκαν εις διπλούν με την αναπτυχθείσα για το προΤα(100-109) ELISA. Η συγκέντρωση του προΤα(100-109) στα δείγματα προσδιορίστηκε με βάση το γραμμικό τμήμα της πρότυπης καμπύλης.

Πίνακας 3.8. Χαρακτηριστικά των βακτηριακών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στα *in vivo* μοντέλα λοιμώξεων σε ποντίκια.

Βακτηριακά στελέχη	Ταξινόμηση κατά Gram	Συνήθης οδός μόλυνσης	Κλινικές εκδηλώσεις
<i>Salmonella typhimurium</i>	αρνητικό	γαστρεντερικό σύστημα	σύστημα μελέτης ανθρώπινου τυφοειδούς πυρετού
<i>Pasteurella multocida</i>	θετικό	δέρμα, αναπνευστικό σύστημα	φλεγμονή μαλακών μορίων
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	θετικό	ουροποιητικό σύστημα, δέρμα	χρόνια κυστίτιδα
<i>Streptococcus pyogenes</i>	θετικό	λάρυγγας, δέρμα	αιμόλυση, σύνδρομο τοξικού σοκ
<i>Klebsiella oxytoca</i>	αρνητικό	γαστρεντερικό σύστημα	σήψη

Ένα προκαταρκτικό πείραμα έγινε σε C57BL/6 (n=3) και BALB/c (n=3) ποντίκια, τα οποία μολύνθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με μία δόση βακτηριακού εναιωρήματος *Salmonella typhimurium* (10^3 CFU/ζώο) και οι αιμοληψίες έγιναν 72 ώρες μετά τη μόλυνση. Η νόσος που προκαλείται από το υψηλά λοιμογόνο αυτό στέλεχος στα ποντίκια ομοιάζει με την οξεία φάση του ανθρώπινου τυφοειδούς πυρετού που προκαλείται από τη *Salmonella typhi* (Πίνακας 3.8). Σκοπός μας ήταν να διαπιστωθεί αν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο φυλών ποντικών και αν είναι δυνατή η ανίχνευση του προΤα(100-109) στις περιορισμένες ποσότητες ορού που μπορούμε να έχουμε στη διάθεσή μας. Όπως παρατηρούμε στην **Εικόνα 3.28**, η ELISA για το προΤα(100-109) ποσοτικοποιεί το δεκαπεπτιδίο στον ορό και φαίνεται να υπάρχει διαφορά ως προς τη μέση ανιχνευόμενη συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου μεταξύ των δύο φυλών, με τα BALB/c ποντίκια να εμφανίζουν υψηλότερη μέση συγκέντρωση προΤα(100-109) στον ορό τους. Οι μεγάλες διακυμάνσεις που παρατηρήσαμε, προφανώς, οφείλονται στο μικρό αριθμό πειραματοζώων που χρησιμοποιήσαμε.



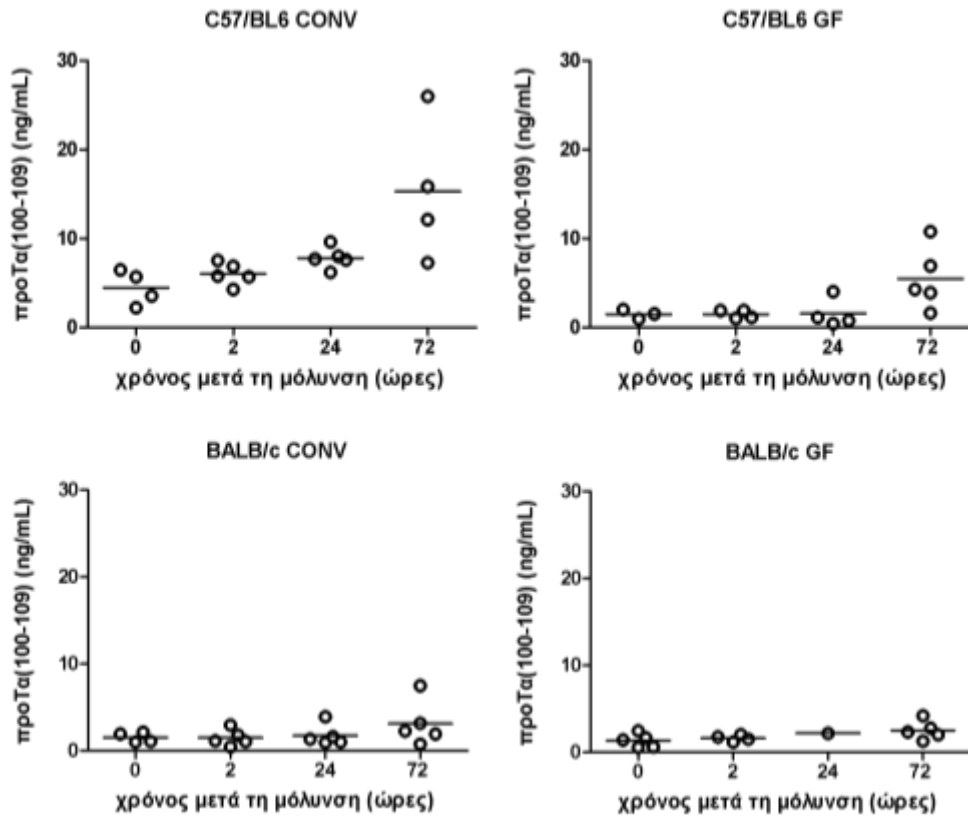
Εικόνα 3.28. Ποντίκια των φυλών C57BL/6 (n=3) και BALB/c (n=3) μολύνθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με μία δόση βακτηριακού εναιωρήματος *Salmonella typhimurium* (10^3 CFU/ζώο). Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν 72 ώρες μετά τη μόλυνση. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου ανά ζώο. Οι οριζόντιες γραμμές απεικονίζουν τις μέσες τιμές.

3.7.1. Ανίχνευση του προΤα(100-109) σε *in vivo* μοντέλα λοίμωξης με στελέχη των γενών *Pasteurella*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* και *Klebsiella*

Στη συνέχεια και με βάση την πρώτη ένδειξη που λάβαμε από το μοντέλο της *S. typhimurium* για ύπαρξη διαφορών μεταξύ των δύο φυλών, σχεδιάσαμε μοντέλα λοίμωξης από 4 διαφορετικά βακτηριακά στελέχη, τα: *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium*

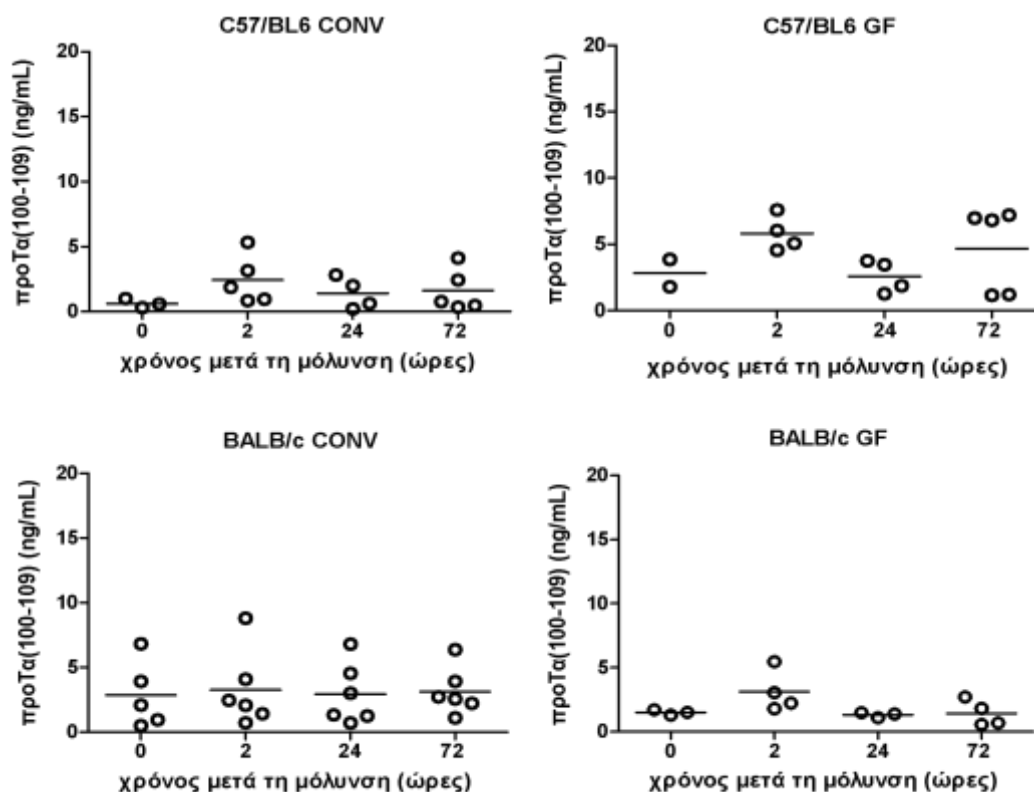
urealyticum, *Streptococcus pyogenes* και *Klebsiella oxytoca*. Επιλέξαμε, επίσης, να χρησιμοποιήσουμε ποντίκια τα οποία μεγάλωσαν σε διαφορετικές εργαστηριακές συνθήκες: ποντίκια που μεγάλωσαν σε συμβατικές συνθήκες (conventional, CONV) και ποντίκια τα οποία δεν είχαν έρθει σε επαφή με κανένα παθογόνο μικροοργανισμό από τη στιγμή της γέννησής τους (germ-free, GF). Με αυτόν τον τρόπο, θελήσαμε να ελέγξουμε τυχόν διαφορές στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου μετά τη λοίμωξη, σε σχέση με τα αντιγονικά ερεθίσματα που έχει δεχτεί ή όχι ένας οργανισμός και την επαγόμενη ανοσολογική απάντηση. Όλα τα ζώα μολύνθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με μία δόση από το κάθε βακτηριακό εναιώρημα (10^3 CFU/ζώο). Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν πριν από τη μόλυνση (0 ώρες), καθώς και σε χρονικά διαστήματα 2, 24 και 72 ωρών μετά τη μόλυνση. Απομονώθηκαν οι οροί και κατακρημνίστηκαν με κρύα ακετόνη, όπως και στην προηγούμενη περίπτωση.

Στο μοντέλο λοίμωξης με *Pasteurella multocida*, η οποία στον άνθρωπο, συνήθως, προκαλεί μολύνσεις σε σημεία λύσης της συνέχειας του δέρματος, καταγράφηκαν διαφορετικά πρότυπα μεταβολής της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) ανάλογα με τη φυλή και τη συνθήκη διαβίωσης. Σε όλα τα BALB/c ζώα, παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα δεκαπεπτιδίου καθ' όλη τη διάρκεια της λοίμωξης (1,34-3,12 ng/mL), παρά το γεγονός ότι η λοίμωξη είχε εδραιωθεί. Τα C57/BL6 ζώα των CONV συνθηκών παρουσίασαν σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου (4,47 ng/mL στις 0 ώρες, 6,02 ng/mL στις 2 ώρες, 7,82 ng/mL στις 24 ώρες και 15,29 ng/mL στις 72 ώρες). Αντίθετα, τα C57/BL6 ζώα των GF συνθηκών παρουσίασαν σταθερά επίπεδα, της τάξης του 1,5 ng/mL, μέχρι τις 24 ώρες και απότομη αύξηση στις 72 ώρες (5,48 ng/mL) (**Εικόνα 3.29**).



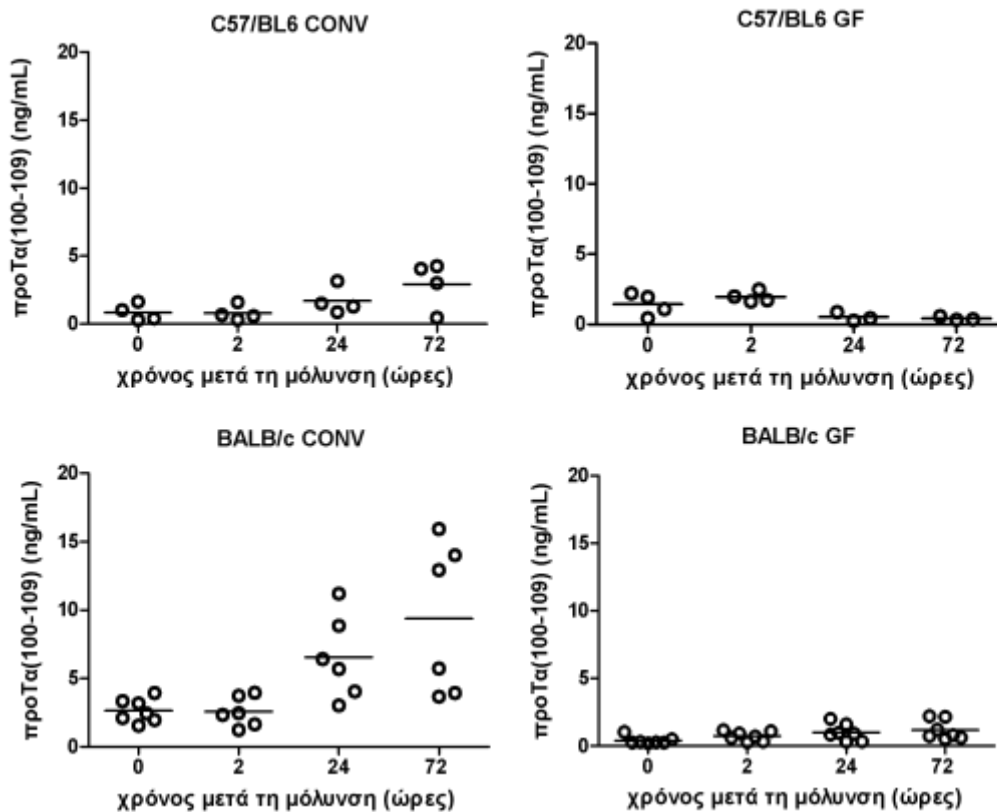
Εικόνα 3.29. Συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε ορούς ποντικών που μολύνθηκαν με *Pasteurella multocida*. Δείγματα ορού συλλέχθηκαν από C57/BL6 (n=5) και BALB/c (n=5) ποντίκια πριν από τη μόλυνση (0 ώρες), 2, 24, και 72 ώρες μετά τη μόλυνση. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου που προσδιορίστηκε ανά ζώο στο αντίστοιχο χρονικό σημείο. Στα σημεία που απεικονίζονται λιγότερα ζώα από τα αναφερόμενα, είτε δεν κατέστη δυνατή η αιμοληψία, είτε η ποσότητα του ορού δεν ήταν επαρκής. Οι οριζόντιες γραμμές απεικονίζουν τις μέσες τιμές. $p=0,0068$ για τα C57/BL6 CONV, $p=0,0428$ για τα C57/BL6 GF, $p=0,3554$ για τα BALB/c CONV και $p=0,1589$ για τα BALB/c GF (one-way ANOVA).

Τα C57/BL6 ποντίκια των CONV συνθηκών που μολύνθηκαν με *Corynebacterium urealyticum* παρουσίασαν αύξηση της συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου ήδη από τις 2 ώρες, ενώ στη συνέχεια τα επίπεδά του μειώθηκαν (0,63 ng/mL στις 0 ώρες, 2,44 ng/mL στις 2 ώρες, 1,42 ng/mL στις 24 ώρες και 1,63 ng/mL στις 72 ώρες). Τα αντίστοιχα ζώα των GF συνθηκών εμφάνισαν ένα πρότυπο αύξησης της συγκέντρωσης με δύο μέγιστα, ένα στις 2 ώρες (5,81 ng/mL) και ένα στις 72 ώρες (4,67 ng/mL). Τα BALB/c ποντίκια των CONV συνθηκών είχαν σταθερά χαμηλές τιμές δεκαπεπτιδίου (2,86-3,15 ng/mL) όλα τα χρονικά διαστήματα, ενώ εκείνα των GF συνθηκών εμφάνισαν μέγιστο στις 2 πρώτες ώρες της λοίμωξης (3,13 ng/mL) (**Εικόνα 3.30**).



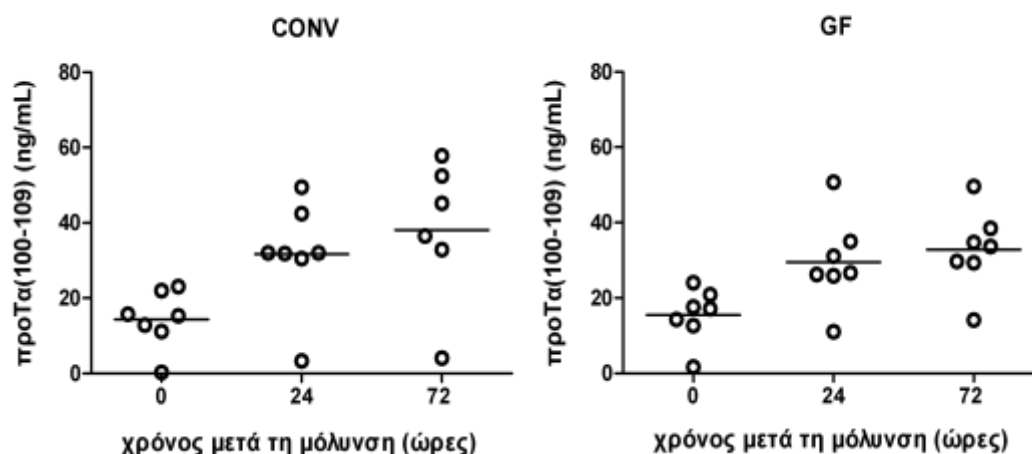
Εικόνα 3.30. Συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε ορούς ποντικών που μολύνθηκαν με *Corynebacterium urealyticum*. Δείγματα ορού συλλέχθηκαν από C57/BL6 (n=5) και BALB/c (n=6) ποντίκια τα ίδια χρονικά διαστήματα με αυτά που αναφέρονται στη λεζάντα της **Εικόνας 3.29** και η απεικόνιση είναι ανάλογη. $p=0,4405$ για τα C57/BL6 CONV, $p=0,2065$ για τα C57/BL6 GF, $p=0,9922$ για τα BALB/c CONV και $p=0,1194$ για τα BALB/c GF (one-way ANOVA).

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.31** που αφορά το μοντέλο λοίμωξης από *Streptococcus pyogenes*, όλα τα ζώα των CONV συνθηκών εμφάνισαν το ίδιο πρότυπο αύξησης της συγκέντρωσης του προΤα(100-109), με τα BALB/c να παρουσιάζουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, η μέση συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου πριν από τη μόλυνση ήταν χαμηλή (0,845 ng/mL στα C57BL/6 και 2,423 ng/mL στα BALB/c), αυξήθηκε σταδιακά μετά τη μόλυνση και έφθασε στο μέγιστό της στις 72 ώρες (0,801 ng/mL στις 2 ώρες, 1,704 ng/mL στις 24 ώρες και 2,943 ng/mL στις 72 ώρες για τα C57BL/6, $p=0,0532$, 2,552 ng/mL στις 2 ώρες, 6,525 ng/mL στις 24 ώρες και 9,358 ng/mL στις 72 ώρες για τα BALB/c, $p=0,0030$). Αντίθετα, τα ζώα των GF συνθηκών παρουσίασαν σταθερά χαμηλά επίπεδα δεκαπεπτιδίου καθ'όλη τη διάρκεια της λοίμωξης (0,26-2,49 ng/mL τα C57BL/6 και 0,21-2,21 ng/mL τα BALB/c, αντίστοιχα).



Εικόνα 3.31. Συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προTa(100-109) σε ορούς ποντικών που μολύνθηκαν με *Streptococcus pyogenes*. Δείγματα ορού συλλέχθηκαν από C57/BL6 (n=4) και BALB/c (n=6) ποντίκια τα ίδια χρονικά διαστήματα με αυτά που αναφέρονται στη λεζάντα της **Εικόνας 3.29** και η απεικόνιση είναι ανάλογη. $p=0,0532$ για τα C57/BL6 CONV, $p=0,0075$ για τα C57/BL6 GF, $p=0,0023$ για τα BALB/c CONV και $p=0,0564$ για τα BALB/c GF (one-way ANOVA).

Τέλος, μολύναμε τα ποντίκια με ένα στέλεχος *Klebsiella* που προκαλεί σοβαρή λοίμωξη οδηγώντας τον ξενιστή σε σήψη, τροποποιώντας το μοντέλο σε σχέση με τα προηγούμενα μοντέλα λοίμωξης. Πιο αναλυτικά μολύναμε αριθμητικά περισσότερα ποντίκια μόνο της φυλής BALB/c, και πραγματοποιήσαμε αιμοληψίες τα χρονικά διαστήματα των 0, 24 και 72 ωρών. Παρατηρήσαμε ότι με αυτό το πρωτόκολλο καταγράφηκαν τα υψηλότερα μέχρι στιγμής επίπεδα δεκαπεπτιδίου, με σταδιακή αύξηση και κορύφωση στις 72 ώρες μετά τη λοίμωξη στα ζώα και των δύο συνθηκών (14,37 ng/mL στις 0 ώρες, 31,7 ng/mL στις 24 ώρες και 38,2 ng/mL στις 72 ώρες για τα CONV, $p=0,0194$; 15,47 ng/mL στις 0 ώρες, 29,53 ng/mL στις 24 ώρες και 32,84 ng/mL στις 72 ώρες για τα GF, $p=0,0116$) (**Εικόνα 3.32**).

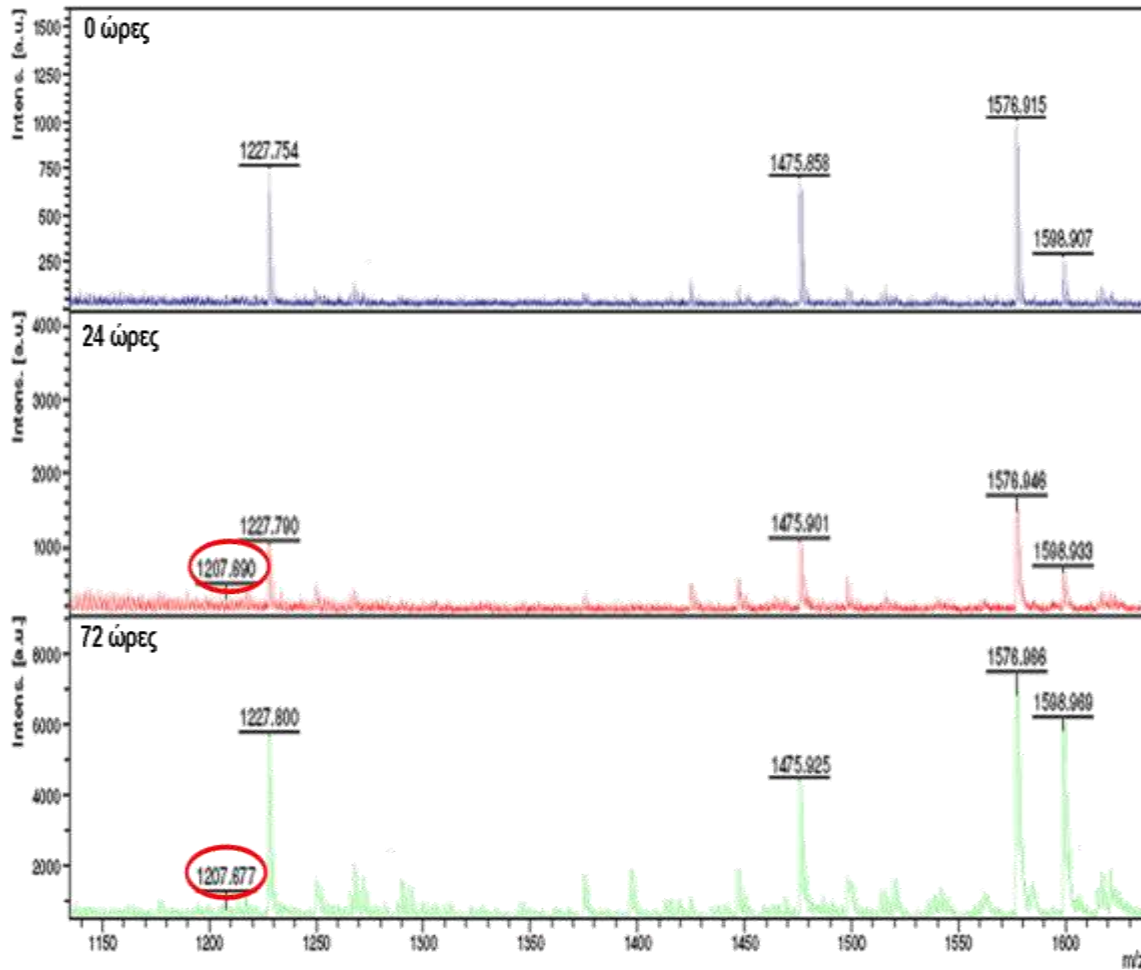


Εικόνα 3.32. Συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε ορούς ποντικών που μολύνθηκαν με *Klebsiella oxytoca*. Δείγματα ορού συλλέχθηκαν από BALB/c (n=7) ποντίκια πριν από τη μόλυνση (0 ώρες), 24, και 72 ώρες μετά τη μόλυνση. Η απεικόνιση είναι ανάλογη με αυτή που αναφέρεται στη λεζάντα της Εικόνας 3.29. $p=0,0194$ για τα CONV και $p=0,0116$ για τα GF (one-way ANOVA).

Παρόλο που μέχρι σήμερα τα φυσιολογικά επίπεδα του προΤα(100-109) ή της προΤα στον ορό ποντικού δεν έχουν μετρηθεί, οι διαφορετικές τιμές που καταγράφηκαν για τις δύο φυλές, πιθανόν να οφείλονται και στο διαφορετικό γενετικό τους υπόβαθρο. Επιπλέον, παρατηρήσαμε πολλά διαφορετικά πρότυπα αύξησης της συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου, που προφανώς επηρεάζονται από το είδος του παθογόνου και τις συνθήκες διαβίωσης των ζώων, χωρίς ωστόσο να μπορεί να γενικευτεί και να καταγραφεί μία συγκεκριμένη τάση.

3.7.2. Φασματομετρική ανίχνευση του προΤα(100-109) σε ορούς ποντικών

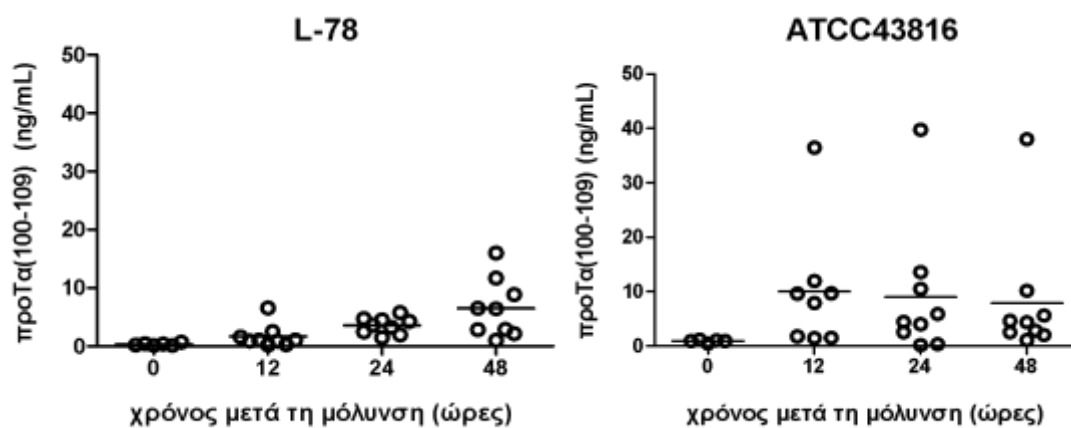
Επιλεγμένα δείγματα ορών από το μοντέλο της *Klebsiella oxytoca*, από τα οποία ήταν διαθέσιμος επαρκής όγκος, αναλύθηκαν και με φασματομετρία μάζας. Παρατηρήσαμε σταθερής μοριακής μάζας επαναλαμβανόμενες κορυφές (π.χ μοριακής μάζας ~1475) σε όλα τα φάσματα, οι οποίες πιθανόν προέρχονταν από βασικά συστατικά του ορού ή από το υπόστρωμα (**Εικόνα 3.33**). Στα δείγματα ορού των 24 και 72 ωρών, καταγράψαμε μία επιπλέον μικρή κορυφή στα όρια του θορύβου, που αντιστοιχεί στη μοριακή μάζα του δεκαπεπτιδίου (1207,58), ενώ αντίστοιχης μάζας κορυφή δεν ανιχνεύθηκε στο δείγμα του ορού πριν τη μόλυνση (0 ώρες). Η ταυτοποίηση της κορυφής αυτής αποτελεί μία πρώτη ένδειξη της παρουσίας του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) μόνο στον ορό των ζώων που είχαν μολυνθεί με τα βακτήρια.



Εικόνα 3.33. Πεπτιδικά φάσματα των κατακρημνισμένων με ακετόνη ορών ποντικών που μολύνθηκαν με *Klebsiella oxytoca* (δείγματα 0, 24, και 72 ωρών μετά τη λοίμωξη). Η ανάλυση έγινε σε φασματόμετρο μάζας MALDI-TOF. Με κόκκινο κύκλο επισημαίνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στη μοριακή μάζα του προΤα(100-109).

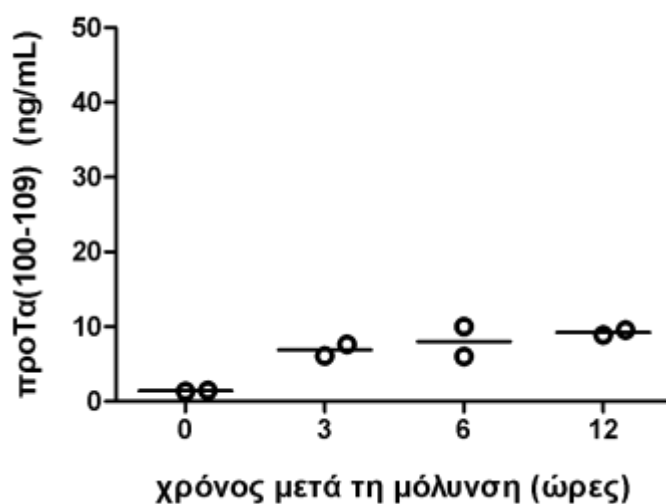
3.7.3 Ανίχνευση του προΤα(100-109) σε *in vivo* μοντέλο θανατηφόρου σηψαιμίας

Ως συνέχεια των *in vivo* μοντέλων, αναπτύξαμε ένα νέο, πιο επιθετικό, μοντέλο θανατηφόρου σηψαιμίας διάρκειας μόλις 48 ωρών, με τη χρήση δύο στελεχών *Klebsiella pneumoniae* διαφορετικής μολυσματικότητας, σε ποντίκια της φυλής ICR (CD-1). Το ένα στέλεχος είναι κλινικά απομονωμένο (L-78), χαμηλής μολυσματικότητας, ιδιαίτερα ανθεκτικό στα αντιβιοτικά και ενδοκυτταρώνεται από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, ενώ το δεύτερο είναι πρότυπο στέλεχος (ATCC43816), ευαίσθητο στα αντιβιοτικά, υψηλής μολυσματικότητας και δεν ενδοκυτταρώνεται (Tzouveleakis et al., 2013). Τα ποντίκια μολύνθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με τα LD₅₀ (10⁸ CFU για το L-78 και 5x10³ CFU για το ATCC43816) και οι αιμοληψίες έγιναν πριν τη μόλυνση (0 ώρες), 12, 24 και 48 ώρες μετά από αυτή. Στα ζώα που χορηγήθηκε το στέλεχος L-78, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου στον ορό τους, με τη μέγιστη ποσότητά του να ανιχνεύεται στις 48 ώρες μετά τη λοίμωξη (0,34 ng/mL στις 0 ώρες, 1,68 ng/mL στις 12 ώρες, 3,57 ng/mL στις 24 ώρες και 6,5 ng/mL στις 72 ώρες). Στα ζώα που μολύνθηκαν με το στέλεχος ATCC43816, παρατηρήθηκαν αυξομειώσεις στην ανιχνευθείσα συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου (0,92 ng/mL στις 0 ώρες, 10,0 ng/mL στις 12 ώρες, 9,03 ng/mL στις 24 ώρες και 7,91 ng/mL στις 48 ώρες) (Εικόνα 3.34).



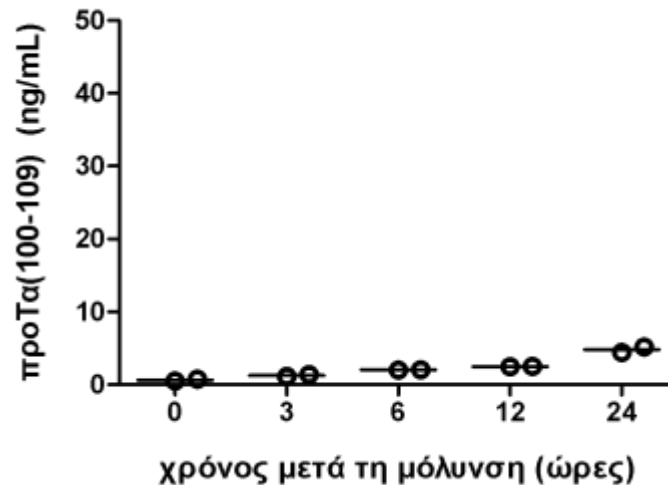
Εικόνα 3.34. Συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) στον ορό ποντικών με σηψαιμία μετά από ενδοπεριτοναϊκή μόλυνσή τους με δύο στελέχη *Klebsiella pneumoniae* (L-78 και ATCC43816). Δείγματα ορού συλλέχθηκαν από τα ποντίκια (n=9 ανά στέλεχος) πριν από τη μόλυνση (0 ώρες), 12, 24, και 72 ώρες μετά τη μόλυνση. Η απεικόνιση είναι ανάλογη με αυτή που αναφέρεται στη λεζάντα της Εικόνας 3.29. $p=0,0015$ (one-way ANOVA).

Υποθέτουμε ότι στην περίπτωση του πρότυπου στελέχους, λόγω της μη ενδοκυττάρωσης του βακτηρίου, πιθανόν ενεργοποιούνται πολλαπλά μονοπάτια θανάτου, τόσο αποπτωτικά όσο και νεκρωτικά (Yang et al., 2012). Προκειμένου να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση επαναλάβουμε τα δύο μοντέλα, χρησιμοποιώντας 2 ζώα σε κάθε χρονικό σημείο και ξεκινώντας τη συλλογή των ορών αρκετά νωρίς από την έναρξη της λοίμωξης (3 ώρες). Από το πρότυπο στέλεχος ATCC43816 χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά στα ζώα βακτηριακή δόση πολύ υψηλότερη από το LD₅₀ (10⁶ CFU), ενώ από το L-78 χορηγήθηκαν ξανά 10⁸ CFU. Παρατηρήσαμε ότι στα ζώα που έλαβαν το στέλεχος ATCC43816, η συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου αυξήθηκε από τις 3 πρώτες ώρες της λοίμωξης και παρέμεινε σχετικά σταθερή (1,42 ng/mL στις 0 ώρες, 6,89 ng/mL στις 3 ώρες, 8 ng/mL στις 6 ώρες και 9,2 ng/mL στις 12 ώρες) (Εικόνα 3.35). Στις 16 ώρες δεν κατέστη δυνατή η συλλογή αίματος από τα ζώα, καθώς κατέληξαν λόγω γενικευμένης σήψης (Tzouveleakis et al., 2013).



Εικόνα 3.35. Συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε ορούς ποντικών που έχουν μολυνθεί με 10⁶ CFU από το πρότυπο στέλεχος ATCC43816. Δείγματα ορού συλλέχθηκαν από τα ποντίκια (n=2) πριν από τη μόλυνση (0 ώρες), 3, 6, και 12 ώρες μετά τη μόλυνση. Η απεικόνιση είναι ανάλογη με αυτή που αναφέρεται στη λεζάντα της Εικόνας 3.29.

Στα ζώα που έλαβαν το στέλεχος L-78, η συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου παρουσίασε σταδιακή αύξηση και κορυφώθηκε στις 24 ώρες, με όλα τα ζώα να έχουν επιβιώσει μέχρι αυτό το χρονικό σημείο (0,635 ng/mL στις 0 ώρες, 1,263 ng/mL στις 3 ώρες, 2,043 ng/mL στις 6 ώρες, 2,483 ng/mL στις 12 ώρες και 4,815 ng/mL στις 24 ώρες) (Εικόνα 3.36).



Εικόνα 3.36. Συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε ορούς ποντικών που έχουν μολυνθεί με 10^8 CFU από το στέλεχος L-78. Δείγματα ορού συλλέχθηκαν από τα ποντίκια ($n=2$) πριν από τη μόλυνση (0 ώρες), 3, 6, 12 και 24 ώρες μετά τη μόλυνση. Η απεικόνιση είναι ανάλογη με αυτή που αναφέρεται στη λεζάντα της Εικόνας 3.29.

Εκτός από τη λήψη αίματος από τα ζώα σε κάθε χρονικό σημείο, ακολούθησε και αφαίρεση των σπληνών τους, απομονώθηκαν τα σπληνοκύτταρα όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2, § 2.13 και εκτιμήθηκαν ο τύπος και το ποσοστό κυτταρικού θανάτου με κυτταρομετρία ροής. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3.9** και στο **Παράρτημα II**, τα σπληνοκύτταρα των ζώων πριν τη μόλυνση εμφάνισαν χαμηλό ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων (~18%), το οποίο είναι δικαιολογημένο, αφού η διαδικασία απομόνωσης των σπληνοκυττάρων συνοδεύεται από περιορισμένης έκτασης κυτταρικό θάνατο. Στα ζώα που έλαβαν το στέλεχος ATCC43816, τα ποσοστά αυτά αυξήθηκαν με την πρόοδο της λοίμωξης (13,10% στις 3 ώρες, 12,35% στις 6 ώρες και 12,80% στις 12 ώρες τα Annex+PI-, 20,45% στις 3 ώρες, 21,70% στις 6 ώρες και 22,20% στις 12 ώρες τα Annex+PI+) και κορυφώθηκαν στις 16 ώρες (4,1% τα Annex+PI- και 86,00% τα Annex+PI+), όπου τα ζώα κατέληξαν λόγω γενικευμένης σήψης. Μάλιστα ο κυτταρικός θάνατος ήταν τόσο αποπτωτικός όσο και νεκρωτικός.

Πίνακας 3.9. Ποσοστά αποπτωτικών και νεκρωτικών σπληνοκυττάρων που απομονώθηκαν από το *in vivo* μοντέλο σηψαιμίας με το πρότυπο στέλεχος ATCC43816.

Χρονικά Διαστήματα (ώρες)	Πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (Annex+ PI-) %	Όψιμα αποπτωτικά/πρώιμα νεκρωτικά κύτταρα (Annex+ PI+) %	Νεκρωτικά κύτταρα (Annex- PI+) %
0	8,75	9,55	0,00
3	13,10	20,45	0,05
6	12,35	21,70	0,2
12	12,80	22,20	0,2
16	4,1	86,00	2,3

Η τυπική απόκλιση (SD) ήταν σε όλες τις περιπτώσεις <5% και δεν παρουσιάζεται.

Στα ζώα που έλαβαν το στέλεχος L-78, τα ποσοστά των αποπτωτικών σπληνοκυττάρων ήταν παρόμοια, αλλά τα ποσοστά των νεκρωτικών ήταν σαφώς χαμηλότερα σε σχέση με εκείνα του πρότυπου στελέχους. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά αποπτωτικών και νεκρωτικών σπληνοκυττάρων ήταν σχετικά σταθερά κατά τη διάρκεια της λοίμωξης (12,3% στις 3 ώρες, 10,1% στις 6 ώρες, 9,5% στις 12 ώρες και 11,2% στις 24 ώρες τα Annex+PI-, 15,3% στις 3 ώρες, 14,4% στις 6 ώρες, 16,1% στις 12 ώρες και 19,7% στις 24 ώρες τα Annex+PI+) (Πίνακας 4.0).

Πίνακας 4.0. Ποσοστά αποπτωτικών και νεκρωτικών σπληνοκυττάρων που απομονώθηκαν από το *in vivo* μοντέλο σηψαιμίας με το πρότυπο στέλεχος L-78.

Χρονικά Διαστήματα (ώρες)	Πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (Annex+ PI-) %	Όψιμα αποπτωτικά/πρώιμα νεκρωτικά κύτταρα (Annex+ PI+) %	Νεκρωτικά κύτταρα (Annex- PI+) %
0	8,25	6,7	0,00
3	12,3	15,3	0,55
6	10,1	14,4	0,65
12	9,5	16,1	0,4
24	11,2	19,7	0,25

Η τυπική απόκλιση (SD) ήταν σε όλες τις περιπτώσεις <5% και δεν παρουσιάζεται.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της ELISA και της κυτταρομετρίας ροής, φαίνεται να υπάρχει αντιστοιχία ανάμεσα στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου στον ορό και του ποσοστού των σπληνοκυττάρων που οδηγήθηκαν σε κυτταρικό θάνατο. Στις 0 ώρες, όπου το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων είναι χαμηλό, η συγκέντρωση του

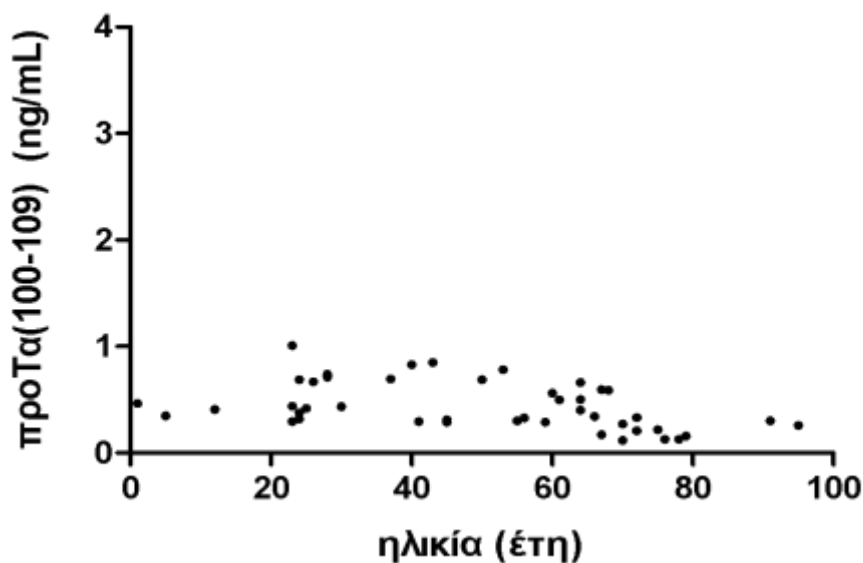
δεκαπεπτιδίου είναι ελάχιστη και τα επίπεδά του αυξάνονται σταδιακά, παράλληλα με την αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων.

3.8. Ανίχνευση του προΤα(100-109) σε ανθρώπινους ορούς

Μετά τις μετρήσεις του δεκαπεπτιδίου στα μοντέλα των λοιμώξεων στα ζώα, προχωρήσαμε στη μέτρηση των πρώτων ανθρώπινων δειγμάτων. Αρχικά, συλλέξαμε ορούς από υγιή άτομα για να προσδιορίσουμε τα επίπεδα του προΤα(100-109) στον υγιή πληθυσμό. Ακολούθως, συλλέχθηκαν δείγματα από παιδιατρικούς ασθενείς με λοιμώξεις και αυτοφλεγμονώδη νοσήματα, καθώς και δείγματα από ενήλικες που νοσηλεύονταν για διάφορες αιτιολογίες στη ΜΕΘ.

3.8.1. Επίπεδα του προΤα(100-109) στον ορό φυσιολογικών ατόμων

Προσδιορίσαμε τη συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε ορούς υγιών ατόμων από διάφορες ηλικιακές ομάδες (1-95 έτη). Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα, η μέση συγκέντρωση του προΤα(100-109) από 44 ορούς είναι $0,441 \pm 0,221$ ng/mL και είναι ανεξάρτητη από την ηλικία των ατόμων (Εικόνα 3.37).



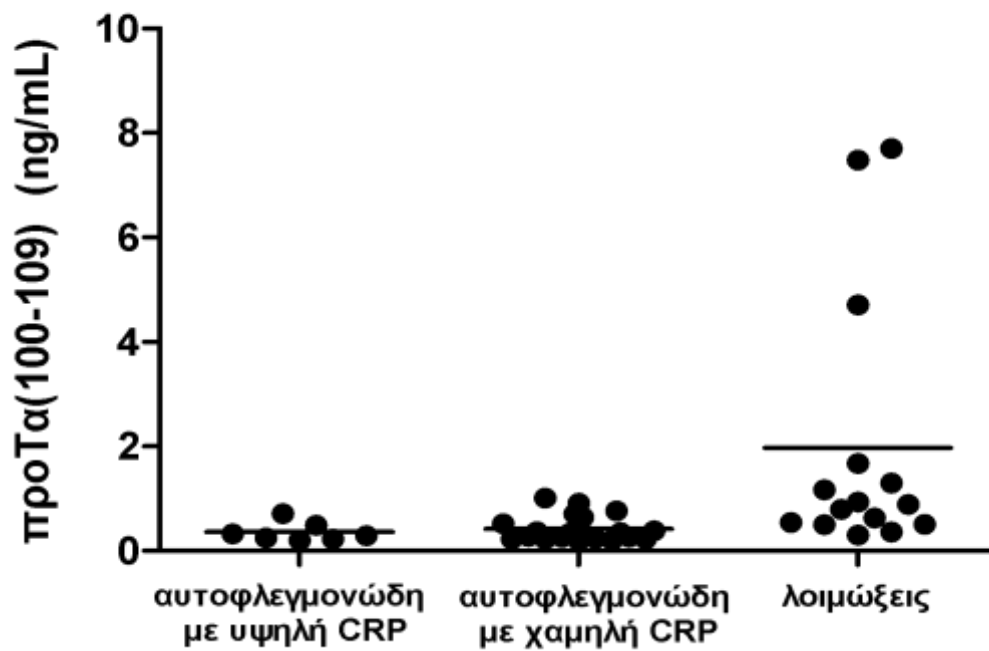
Εικόνα 3.37. Συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε ορούς υγιών ατόμων, ηλικίας 1-95 ετών (N=47). Κάθε σημείο αντιστοιχεί σε ένα δείγμα.

Με βάση λοιπόν το μέσο όρο που προέκυψε από τα 44 δείγματα, θέσαμε ως όριο (cut-off) της ανοσοδοκιμασίας τη μέση τιμή ± 2 SD. Δηλαδή, το εύρος συγκέντρωσης του προΤα(100-109) σε φυσιολογικούς δότες είναι από 0-0,883 ng/mL.

3.8.2 Ανίχνευση του προΤα(100-109) σε ορούς παιδιατρικών ασθενών

Συνεχίσαμε τη μελέτη με τον ιδιαίτερα ευπαθή πληθυσμό των παιδιατρικών ασθενών, όπου η διαφοροδιάγνωση ιδιαίτερα μεταξύ ενδομήτριων και ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων κατά την πρώιμη νεογνική περίοδο είναι αποφασιστικής σημασίας για τον τρόπο αντιμετώπισής τους και τη μετέπειτα πρόγνωση. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι τόσο οι καταστάσεις οξείας φάσεως (μη λοιμώδης φλεγμονή), όσο και οι λοιμώξεις είναι εξαιρετικά συνήθεις σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα, ιδιαίτερα όταν βρίσκονται υπό θεραπεία με ανοσοτροποποιητικούς παράγοντες. Για τους λόγους αυτούς, επιλέξαμε να συλλέξουμε παιδιατρικά δείγματα, τα οποία κατηγοριοποιήσαμε σε 3 ομάδες: (1) παιδιά με αυτοφλεγμονώδη νοσήματα και χαμηλή CRP ($\leq 2,0$ mg/L), (2) παιδιά με αυτοφλεγμονώδη νοσήματα και υψηλή CRP (2,0-121,0 mg/L) και (3) παιδιά με βακτηριακές λοιμώξεις με CRP (0,2-124,0 mg/L). Οι ομάδες αυτές επιλέχθηκαν προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η απελευθέρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) στον ορό είναι γεγονός ειδικό, μόνο σε συνθήκες μαζικής απόπτωσης κυττάρων στο περιφερικό αίμα, κυρίως μονοκυττάρων/μακροφάγων και δε σχετίζεται με οποιαδήποτε φλεγμονώδη νόσο. Μία τέτοια περίπτωση μαζικής κυτταρικής απόπτωσης αποτελεί και η μόλυνση από παθογόνα βακτήρια.

Πραγματικά, όπως φάνηκε από τα πρώτα αποτελέσματα, στους ορούς παιδιών με λοιμώξεις ανιχνεύθηκε υψηλότερη μέση συγκέντρωση δεκαπεπτιδίου (1,966 ng/mL) σε σχέση με τις ομάδες των αυτοφλεγμονωδών νοσημάτων, όπου η μέση συγκέντρωση του προΤα(100-109) ήταν σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα (0,358 ng/mL για τα παιδιά με αυτοφλεγμονώδη και υψηλή CRP και 0,42 ng/mL για τα παιδιά με αυτοφλεγμονώδη και χαμηλή CRP) (**Εικόνα 3.38**).

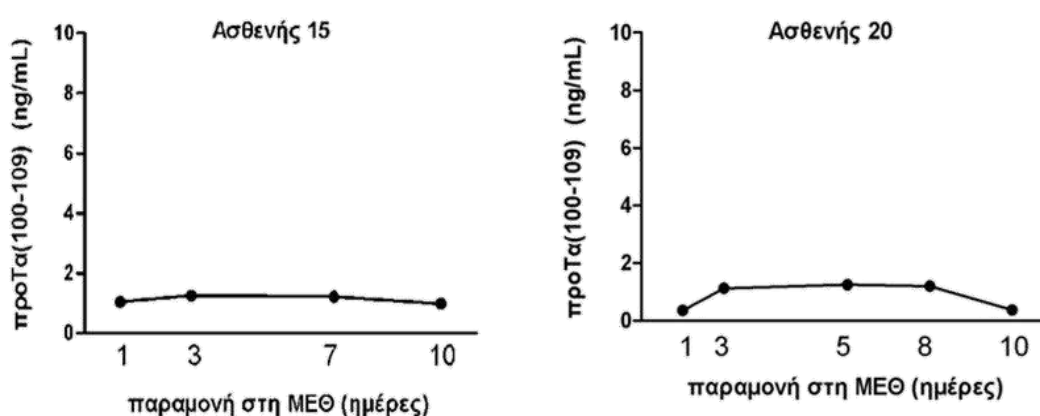


Εικόνα 3.38. Συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) στις τρεις ομάδες των παιδιατρικών ασθενών: αυτοφλεγμονώδη με υψηλή CRP (2,0-121,0 mg/L, N=7), αυτοφλεγμονώδη με χαμηλή CRP ($\leq 2,0$ mg/L, N=20) και λοιμώξεις, CRP (0,2-124,0 mg/L, N=15). Κάθε σημείο αντιστοιχεί σε ένα δείγμα και οι οριζόντιες γραμμές αφορούν τη μέση τιμή του συνόλου των δειγμάτων που μετρήθηκαν ($p=0,0110$, one-way ANOVA).

3.8.3. Ανίχνευση του προΤα(100-109) σε ορούς ασθενών που νοσηλεύονται στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ)

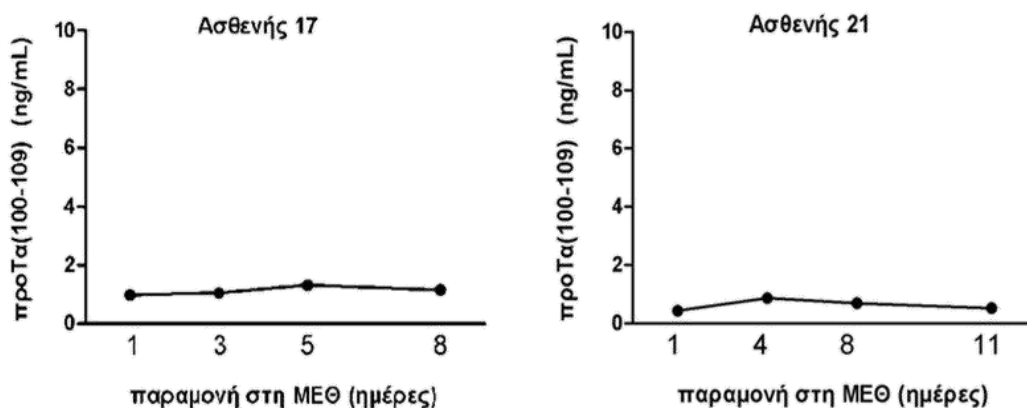
Για την περαιτέρω αξιολόγηση της ELISA για το προΤα(100-109) σε κλινικό επίπεδο, συλλέξαμε ορούς από ενήλικες (n=30) που νοσηλεύθηκαν στη ΜΕΘ σε βαρύτατη κατάσταση, οδηγούμενοι, συχνά, σε σήψη και σηπτικό shock (**Παράρτημα ΙΙΙ**). Επιλέξαμε να συλλέξουμε σειριακά δείγματα από όλους τους ασθενείς ανεξάρτητα από την αιτία εισαγωγής τους στη ΜΕΘ και να προσδιορίσουμε σε αυτά, τα επίπεδα του προΤα(100-109), καθ' όλη τη διάρκεια της νοσηλείας τους. Πρέπει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τα στοιχεία από το ιστορικό τους, κάποιοι ασθενείς εξήλθαν από τη ΜΕΘ βελτιωμένοι, ενώ ορισμένοι κατέληξαν από βαρύ, μη αναστρέψιμο, σηπτικό shock. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, οι οροί απομονώθηκαν, κατακρημνίστηκαν με κρύα ακετόνη και αναλύθηκαν με την αναπτυχθείσα ELISA.

Παρουσιάζονται 8 ενδεικτικές περιπτώσεις ασθενών: 4 που νοσηλεύθηκαν στη ΜΕΘ χωρίς να εμφανίσουν λοίμωξη (δείγματα-μάρτυρες) και 4 που εμφάνισαν σοβαρή λοίμωξη. Ο ασθενής 15 ήταν ηλικιωμένο άτομο με άνοια, το οποίο εισήχθη στη ΜΕΘ λόγω διαταραχών στην κατάποση και σοβαρής υποξυγοναιμίας. Εμφάνισε σταθερά χαμηλές συγκεντρώσεις προΤα(100-109) (0,98-1,25 ng/mL) και εξήλθε την ημέρα 11. Ο ασθενής 20 έπασχε από νόσο του Wilson και νοσηλεύθηκε στη ΜΕΘ λόγω εμφάνισης επιπλοκών της νόσου στον εγκέφαλο. Τα επίπεδα του δεκαπεπτιδίου παρέμειναν σταθερά χαμηλά κατά τη νοσηλεία του (0,36-1,25 ng/mL) (**Εικόνα 3.39**).



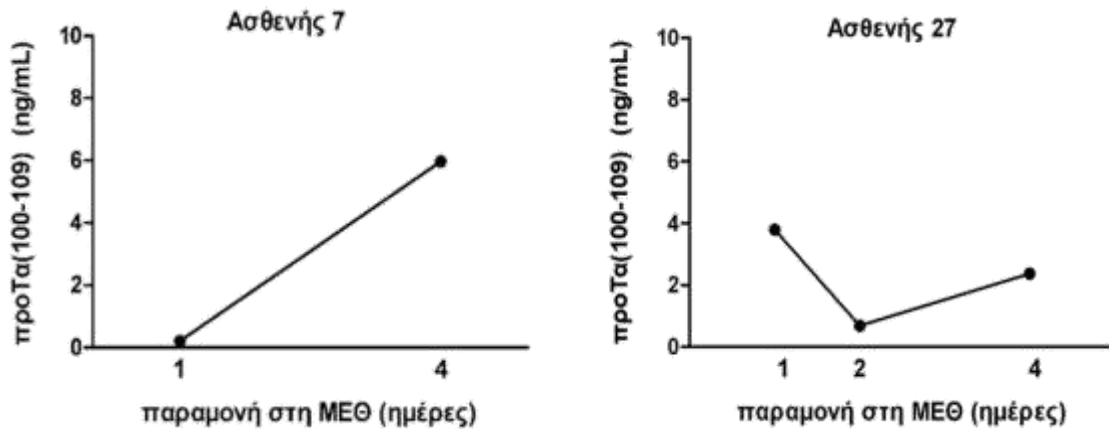
Εικόνα 3.39. Συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε 2 ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στη ΜΕΘ χωρίς να εμφανίσουν λοίμωξη.

Οι δύο επόμενοι ασθενείς έπασχαν από αυτοάνοσες παθήσεις, οι οποίες προσβάλλουν τα αιμοφόρα αγγεία. Συγκεκριμένα, ο ασθενής 17 έπασχε από αγγειίτιδα, η οποία του προκάλεσε αναπνευστική και νεφρική ανεπάρκεια, οδηγώντας τον στη ΜΕΘ. Καταγράφηκαν σταθερά χαμηλά επίπεδα προΤα(100-109) (<1,5 ng/mL) κατά τη νοσηλεία του και τελικά εξήλθε βελτιωμένος. Ο ασθενής 21 έπασχε από οξώδη πολυαρθρίτιδα και γι' αυτό το λόγο εισήχθη στη ΜΕΘ. Τα επίπεδα του προΤα(100-109) παρέμειναν χαμηλά και ο ασθενής εξήλθε για περαιτέρω νοσηλεία στην παθολογική κλινική την ημέρα 12 (Εικόνα 3.40). Και οι δύο νοσηλεύθηκαν χωρίς εμφανή σημεία βακτηριακής λοίμωξης.



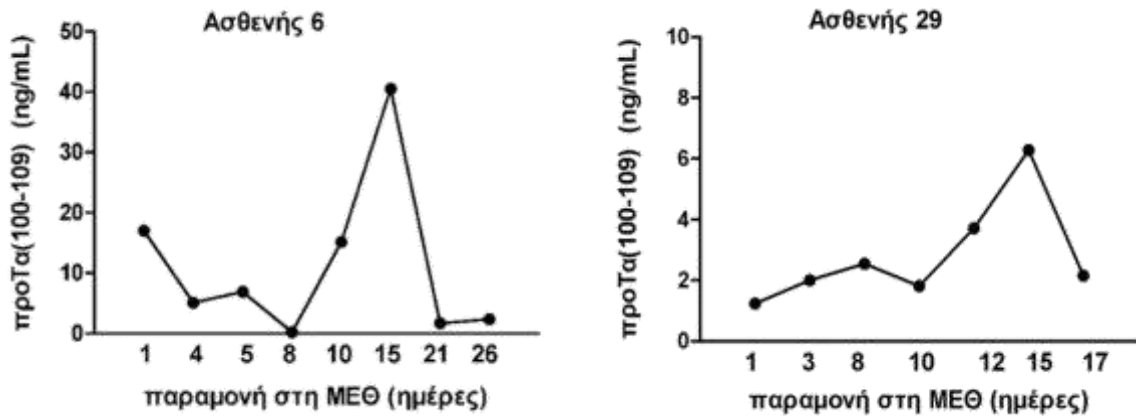
Εικόνα 3.40. Συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε 2 ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στη ΜΕΘ χωρίς να εμφανίσουν λοίμωξη.

Οι επόμενοι ασθενείς εμφάνισαν σοβαρή λοίμωξη που εξελίχθηκε σε σήψη. Ο ασθενής 7 ήταν παχύσαρκο άτομο με καρδιαγγειακά προβλήματα, το οποίο εισήχθη στη ΜΕΘ για συστηματικότερη παρακολούθηση [αρχικά επίπεδα προΤα(100-109) 0,21 ng/mL] και εμφάνισε λοίμωξη από πολυανθεκτικά βακτηριακά στελέχη (*Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) [επίπεδα προΤα(100-109) 5,97 ng/mL την ημέρα 4], καταλήγοντας μετά από μία ημέρα (ημέρα 5) από βαρύ σηπτικό shock. Ο ασθενής 27 εισήχθη στη ΜΕΘ λόγω μικροβαιμίας από *E. coli* [αρχικά επίπεδα προΤα(100-109) 3,8 ng/mL] που προκλήθηκε από ηπατικό απόστημα. Αντιμετωπίστηκε άμεσα με αντιβιοτικά που οδήγησαν σε μείωση και των επιπέδων του προΤα(100-109) [επίπεδα προΤα(100-109) 0,69 ng/mL την ημέρα 2], αλλά εμφάνισε νέα λοίμωξη από *Klebsiella pneumoniae* και μύκητες την ημέρα 4 [επίπεδα προΤα(100-109) 2,37 ng/mL], με αποτέλεσμα να καταλήξει από βαρύ σηπτικό shock την επόμενη ημέρα (Εικόνα 3.41).



Εικόνα 3.41. Συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε 2 ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στη ΜΕΘ με σοβαρή λοίμωξη. Και οι δύο ασθενείς κατέληξαν από βαρύ σηπτικό shock.

Οι δύο επόμενοι ασθενείς νοσηλεύθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα στη ΜΕΘ. Ο ασθενής 6 νοσηλεύθηκε για 26 ημέρες λόγω σοβαρού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου και κατά την παραμονή του στη ΜΕΘ εμφάνισε λοίμωξη από στέλεχος *Klebsiella* που παράγει καρβαπενεμάση (KPC). Η ιδιαίτερα υψηλή τιμή των 40,5 ng/mL δεκαπεπτιδίου αντιστοιχεί στην ημέρα εκδήλωσης της λοίμωξης, που συνοδεύτηκε κλινικά από υψηλό πυρετό και άνοδο των λευκών αιμοσφαιρίων. Ο ασθενής ανταποκρίθηκε στη χορήγηση ισχυρού αντιβιοτικού σχήματος [επίπεδα προΤα(100-109) 1,69 ng/mL την ημέρα 21] και εξήλθε την ημέρα 27 [επίπεδα προΤα(100-109) 2,35 ng/mL την ημέρα 26]. Ο ασθενής 29 εισήχθη στη ΜΕΘ με πνευμονία από *Streptococcus pneumoniae* και βαριά αναπνευστική ανεπάρκεια. Έλαβε αντιβιοτικά [μείωση επιπέδων προΤα(100-109) σε 1,81 ng/mL την ημέρα 10], ωστόσο την ημέρα 12 εμφάνισε πνευμονία του αναπνευστήρα (VAP) [επίπεδα προΤα(100-109) 3,71 και 6,28 ng/mL τις ημέρες 12 και 15, αντίστοιχα]. Έλαβε εκ νέου φαρμακευτική αγωγή και τελικά την ημέρα 17 παρουσίασε βελτίωση της κλινικής και εργαστηριακής του εικόνας [επίπεδα προΤα(100-109) 2,15 ng/mL] (**Εικόνα 3.42**).



Εικόνα 3.42. Συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε 2 ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στη ΜΕΘ με σοβαρή λοίμωξη. Και οι δύο ασθενείς παρουσίασαν βελτίωση μετά την αγωγή.

Επομένως, το δεκαπεπτίδιο, από τα μέχρι τώρα δεδομένα, φαίνεται ότι μπορεί να χρησιμεύσει, σε συνδυασμό με καθιερωμένους εργαστηριακούς δείκτες, ως βιοδείκτης παρακολούθησης της πορείας της λοίμωξης των βαρέως πασχόντων ασθενών που νοσηλεύονται σε ΜΕΘ. Επιπλέον, με βάση τα επίπεδα του προΤα(100-109) στον ορό μπορούν να διαφοροδιαγνωστούν περιστατικά ασθενών με φλεγμονές μη λοιμώδους αιτιολογίας από τις αντίστοιχες λοιμώδους αιτιολογίας.

4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η προΤα είναι ένα όξινο πολυπεπτίδιο, υψηλά συντηρημένο, που βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων των θηλαστικών. Παρόλο που μέχρι σήμερα ο ακριβής ρόλος της δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, η υπάρχουσα βιβλιογραφία υποδεικνύει διπλό ρόλο για το πολυπεπτίδιο: έναν ενδοκυτταρικό που σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, και έναν εξωκυτταρικό που σχετίζεται με φαινόμενα κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας. Συγκεκριμένα, κατά την απόπτωση η προΤα υπόκειται σε πέψη από τις κασπάσες στο D⁹⁹, απελευθερώνοντας με άγνωστο μηχανισμό το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) (Evstafieva et al., 2003), το οποίο αποτελεί και το ανοσοδραστικό τμήμα της πρωτεΐνης (Skopeliti et al., 2009). Παράλληλα, διαθέτει σημαντικές ανοσοενισχυτικές δράσεις, οι οποίες άρχισαν να καταγράφονται πολύ σύντομα μετά την απομόνωσή της (Haritos et al., 1984) και αφορούν τη διέγερση των λειτουργιών διαφόρων λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών (Ioannou et al., 2012). Οι πιο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την ικανότητα τόσο της ακέραιης πρωτεΐνης όσο και του δεκαπεπτιδίου της να δρουν μέσω του TLR-4, ωριμάζοντας φαινοτυπικά ώριμα και λειτουργικά ανοσοϊκανά δενδριτικά κύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται από μονοκύτταρα περιφερικού αίματος ανθρώπου (Ioannou et al., 2013).

Βασιζόμενοι στην πλούσια βιβλιογραφία γύρω από τον εξωκυτταρικό ρόλο της προΤα και κυρίως στα τελευταία δεδομένα της ομάδας μας, θέσαμε ως στόχους της παρούσας διατριβής να μελετήσουμε το ακέραιο πολυπεπτίδιο και το ανοσοδραστικό της δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) σε δύο επίπεδα. Αρχικά, θελήσαμε να διερευνήσουμε την επίδραση των δύο πεπτιδίων σε λιγότερο μελετημένους, ως προς τη δράση της προΤα, υποπληθυσμούς της φυσικής ανοσίας που εκφράζουν TLR-4, όπως τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα. Επιλέξαμε να απομονώσουμε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα από δύο διακριτές ομάδες, υγιή άτομα και ασθενείς με καρκίνο του μαστού, που είναι γνωστό ότι εμφανίζουν διαταραχές στις λειτουργίες των κυττάρων του ανοσοποιητικού τους συστήματος (Finn, 2012). Παράλληλα, προκειμένου να εξεταστεί ο τρόπος δράσης του δεκαπεπτιδίου και να κατανοηθεί ο ρόλος του σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, αναπτύξαμε ειδική και ευαίσθητη ανοσοδοκιμασία ELISA, η οποία επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό του προΤα(100-109) εξωκυτταρικά.

Ως προς τη διερεύνηση της ανοσοενισχυτικής δράσης των δύο πεπτιδίων, είναι γνωστό ότι τα φαγοκύτταρα, ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα, συνιστούν την πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον των περισσότερων παθογόνων, που εκδηλώνεται πριν από τις πολύπλοκες κυτταρικές διεργασίες της επίκτητης ανοσίας. Τα φαγοκύτταρα είναι ζωτικής σημασίας στην καταπολέμηση των λοιμώξεων, αλλά και του καρκίνου, και συμβάλλουν στη διατήρηση της ομοιόστασης των φυσιολογικών ιστών με την απομάκρυνση νεκρών κυττάρων και κυττάρων

που πρόκειται να πεθάνουν (Dale et al., 2008). Παρά το γεγονός ότι ειδικά τα ουδετερόφιλα ήταν μέχρι πρόσφατα παραμελημένα λόγω του ιδιαίτερα σύντομου χρόνου ημιζωής τους, η σημασία της σωστής λειτουργικότητάς τους φαίνεται σε ασθενείς με καρκίνο, οι οποίοι συχνά εμφανίζουν ουδετεροπενία, μία σοβαρή ανοσολογική ανεπάρκεια που σχετίζεται με σημαντική νοσηρότητα (Rolston et al., 2007). Σε γενικές γραμμές, τα ουδετερόφιλα από ασθενείς με καρκίνο εμφανίζουν κατασταλμένες αντιμικροβιακές ιδιότητες και, ειδικότερα, σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, τα ουδετερόφιλα παρουσιάζουν μειωμένη μεταναστευτική ικανότητα μετά από χημειοθεραπεία, η οποία συνοδεύεται από ευπάθεια σε βακτηριακές λοιμώξεις (Mendonça et al., 2006). Ως εκ τούτου, η προσπάθεια ενίσχυσης ή και αποκατάστασης της λειτουργικότητας των ουδετερόφιλων, ιδιαίτερα σε ασθενείς με καρκίνο, οι οποίοι είναι επιρρεπείς σε ευκαιριακές λοιμώξεις, αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας.

Έχει ήδη αναφερθεί ότι η προΤα βελτιώνει *in vitro* τις λειτουργίες ουδετερόφιλων που προέρχονται από ασθενείς με καρκίνο του εντέρου, του μαστού και με μελάνωμα (Heidecke et al., 1997). Ωστόσο, στη δημοσιευμένη αυτή μελέτη, οι μισοί από τους δότες δεν ανταποκρίθηκαν στην επαγόμενη από την προΤα ενεργοποίηση των ουδετερόφιλών τους. Τα δικά μας αποτελέσματα δείχνουν ότι και το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) μπορεί να ενισχύσει τις βασικές αντιμικροβιακές και κυτταροτοξικές δραστηριότητες των ουδετερόφιλων στην πλειονότητα των υγιών δοτών και των ασθενών με καρκίνο. Μάλιστα, τα επίπεδα διέγερσης που επάχθηκαν είναι αντίστοιχα με αυτά που καταγράφηκαν για την ακέραιη προΤα (Samara et al., 2013a). Συγκεκριμένα, τα ουδετερόφιλα από τους ασθενείς με καρκίνο έδειξαν μειωμένη βασική φαγοκυττάρωση σε σύγκριση με τα ουδετερόφιλα που προέρχονταν από τους υγιείς δότες. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με πρόσφατη μελέτη, η οποία έδειξε ότι τα αυξημένα ποσοστά φαινοτυπικώς ανώριμων ουδετερόφιλων στο περιφερικό αίμα των ασθενών με καρκίνο οδηγούν στη μειωμένη λειτουργικότητα αυτού του λευκοκυτταρικού υποπληθυσμού (Trellakis et al., 2011). Η ενεργοποίηση με προΤα(100-109) ή προΤα διπλασίασε τη φαγοκυτταρική ικανότητα των ουδετερόφιλων των υγιών δοτών και των ασθενών με καρκίνο. Συγκεκριμένα, αποκατέστησε τη φαγοκυτταρική ικανότητα των ουδετερόφιλων των καρκινοπαθών στα επίπεδα που καταγράφηκαν για τους υγιείς δότες. Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί που ευθύνονται για την ενίσχυση αυτή δεν εξετάστηκαν περαιτέρω, πιθανολογούμε ότι τα ουδετερόφιλα ενεργοποιούνται μετά την πρόσδεση του προΤα (100-109) ή της προΤα με τον TLR-4 (Hayashi et al., 2003; Mosoian et al., 2010), σηματοδοτώντας καταρροϊκά αυτού, όπως έχει ήδη δειχθεί για τα δενδριτικά κύτταρα (Ioannou et al., 2013).

Είναι γνωστό ότι τα φαγοκύτταρα, όταν διεγείρονται, αυξάνουν το ρυθμό κατανάλωσης του οξυγόνου (O_2) 15-20 φορές (αναπνευστική έκρηξη). Αυτό οφείλεται στην ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης, η οποία ανάγει το O_2 σε $\cdot O_2^-$, το οποίο μετατρέπεται σε H_2O_2 και το H_2O_2 χρησιμοποιείται για να οξειδώσει το $\cdot Cl^-$ προς υποχλωριώδες. Τα παραπάνω προϊόντα των αντιδράσεων ονομάζονται συνολικά ROS (Fridovich et al., 1998). Με τις δοκιμασίες, λοιπόν, που εφαρμόσαμε καταγράψαμε την παραγωγή και απελευθέρωση του $\cdot O_2^-$, του πρώτου προϊόντος της παραπάνω αντίδρασης, καθώς και τη συνολική αναπνευστική έκρηξη των φαγοκυττάρων. Η ενδοκυτταρική παραγωγή $\cdot O_2^-$ από τα ουδετερόφιλα ήταν οριακά υψηλότερη στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού σε σχέση με τους υγιείς δότες και ενισχύθηκε σημαντικά μετά από ενεργοποίηση με το ανοσοεπαγωγικό τριπεπτίδιο fMLP. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες σε ασθενείς με καρκίνο του λάρυγγα (Szuster-Ciesielska et al., 2004), των ωοθηκών (Klink et al., 2008) και οξεία ή χρόνια μυελογενή λευχαιμία (Tsai et al., 2008), των οποίων τόσο τα ουδετερόφιλα σε ηρεμία όσο και τα ενεργοποιημένα, παράγουν προεγχειρητικά ή πριν τη χορήγηση θεραπείας, υψηλότερα επίπεδα ROS από εκείνα των υγιών ατόμων. Η παραγωγή ROS από τα ουδετερόφιλα έχει χαρακτηριστεί ως «δίκικοπο μαχαίρι» (El-Benna et al., 2008). Στον καρκίνο, το οξειδωτικό stress που ακολουθεί την υπερβολική παραγωγή ROS έχει συσχετιστεί με την εξέλιξη του όγκου και τη μετάσταση (Sesti et al., 2012). Συγχρόνως, όμως, οι ROS μπορούν να διαμεσολαβούν τη λύση των καρκινικών κυττάρων (Hicks et al., 2006). Ως εκ τούτου, η παρατηρούμενη *in vitro* αύξηση της παραγωγής $\cdot O_2^-$ από τα ουδετερόφιλα, υπό την επίδραση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) ή της προΤα, δεν μπορεί να θεωρηθεί ούτε ευεγερτική, ούτε επιζήμια. Ωστόσο, όταν τα ουδετερόφιλα αυτά ελέγχθηκαν για την εξωκυτταρική απελευθέρωση $\cdot O_2^-$, δεν εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των υγιών δοτών και των ασθενών με καρκίνο του μαστού. Μάλιστα, τα επίπεδα απελευθέρωσης $\cdot O_2^-$ μετά από διέγερση με τα πεπτίδια ήταν ελαφρώς αυξημένα σε σύγκριση με εκείνα των μη διεγερμένων ουδετερόφιλων. Αυτό επιβεβαιώθηκε περαιτέρω από το βαθμό της αναπνευστικής έκρηξης, όπως αξιολογήθηκε με κυτταρομετρία ροής, όπου η επαγόμενη ενδοκυτταρική παραγωγή και εξωκυτταρική απελευθέρωση ROS από τα ουδετερόφιλα τόσο των υγιών δοτών όσο και των ασθενών με καρκίνο του μαστού ήταν, επίσης, οριακή.

Μία πιθανή εξήγηση αυτής της αμφισημίας και σε συμφωνία με τη μελέτη των Pillay και συνεργατών, είναι ότι τα μελετούμενα ουδετερόφιλα περιλαμβάνουν διακριτά υποσύνολα με διαφορετικές λειτουργίες: τα ώριμα διαφοροποιημένα ουδετερόφιλα που παράγουν και στη συνέχεια απελευθερώνουν ROS και τα ανώριμα ουδετερόφιλα τα οποία δεν είναι σε θέση, ακόμα, να απελευθερώσουν εξωκυτταρικά τις ενδοκυτταρικά παραγόμενες ROS (Pillay et al.,

2010b). Το ποσοστό των ουδετερόφιλων που βρίσκεται σε κάθε στάδιο μεταξύ των διαφόρων δοτών, προφανώς, είναι διαφορετικό. Επίσης, μετά από διέγερση με προΤα(100-109) ή προΤα, τα ουδετερόφιλα, ίσως, παραμένουν σε μία ενδιάμεση κατάσταση ενεργοποίησης (primed state), όπου απαιτείται περαιτέρω επαφή με ένα παθογόνο ή ένα καρκινικό κύτταρο προκειμένου να ενεργοποιηθούν πλήρως, ώστε να απελευθερώσουν αυξημένες ποσότητες ROS (El-Benna et al., 2008).

Προς επαλήθευση της παραπάνω υπόθεσης, διαπιστώσαμε ότι η ενεργοποίηση με προΤα(100-109) ή προΤα αύξησε την κυτταροτοξικότητα των ουδετερόφιλων από υγιείς δότες και ασθενείς με καρκίνο του μαστού, μετά από επαφή με καρκινικά κύτταρα-στόχους. Σε γενικές γραμμές, η λυτική ικανότητα των ενεργοποιημένων με προΤα(100-109) ή προΤα ουδετερόφιλων ήταν πολύ χαμηλότερη από αυτή που έχει καταγραφεί για τα CTLs και τα NK κύτταρα (Skopeliti et al., 2009; Baxevanis et al., 2002). Ωστόσο, αυξήθηκε κατά 2 περίπου φορές παρουσία προΤα(100-109) ή προΤα εναντίον και των τεσσάρων καρκινικών κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν ως στόχοι (K562, HCT-116, MCF-7 και SKBR3). Παρά το γεγονός ότι τα ουδετερόφιλα προέρχονταν από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, δεν παρατηρήθηκε λύση μόνο των δύο σειρών μαστού (MCF-7 και SKBR3). Αντίθετα, η παρατηρηθείσα κυτταροτοξικότητα έναντι και των τεσσάρων κυττάρων-στόχων ήταν σε παρόμοια επίπεδα και σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη που, επίσης, είχε καταγράψει μη ειδική κυτταροτοξική ικανότητα των ουδετερόφιλων (Heidecke et al., 1997).

Τα ουδετερόφιλα σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιώντας κλασικά κυτταροτοξικά συστήματα, όπως την εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (ADCC), τη μεσολαβούμενη από το Fas απόπτωση, τις ROS, την πρωτεΐνη καλπροτεκτίνη και τον TRAIL (Koga et al., 2004). Επίσης, έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία και άλλοι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην κυτταρική λύση, όπως ο σχηματισμός NETs ή η προκαλούμενη από τον όγκο παραγωγή αυξημένου αριθμού TENs, όπως έχει καταγραφεί σε μοντέλο όγκου σε ποντίκια, αλλά και σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού (Granot et al., 2011). Στην παρούσα δοκιμασία, λόγω της σύντομης επώασης (10 λεπτά) των ουδετερόφιλων με τα πεπτίδια, υποθέτουμε ότι η απελευθέρωση ROS είναι ο κύριος μηχανισμός λύσης των καρκινικών κυττάρων. Πράγματι, ουδετερόφιλα από ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών απαντούν, ιδιαίτερα σύντομα, με παραγωγή υψηλών επιπέδων ROS μετά από κυτταρική επαφή με καρκινικά κύτταρα ωοθηκών (Klink et al., 2008).

Στη συνέχεια, στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού, θελήσαμε να εξετάσουμε αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της απόκρισης των ουδετερόφιλων τους στο προΤα(100-109) ή την προΤα και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των όγκων τους. Αναλυτικά, εξετάσαμε την

απάντηση των ουδετερόφιλων στις δοκιμασίες της φαγοκυττάρωσης, της ενδοκυτταρικής παραγωγής και εξωκυτταρικής απελευθέρωσης $\cdot\text{O}_2^-$ σε σχέση με την ηλικία των ασθενών, καθώς και με καθιερωμένους προγνωστικούς παράγοντες, όπως ο βαθμός κακοήθειας, ο ιστολογικός υπότυπος, το μέγεθος του όγκου, η διήθηση των σύστοιχων λεμφαδένων και η κατάσταση των ορμονικών υποδοχέων. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με οποιοδήποτε από αυτά τα χαρακτηριστικά, με εξαίρεση την έκφραση της HER-2/neu και την ηλικία των ασθενών, η πιθανή επίδραση των οποίων στη λειτουργικότητα των ουδετερόφιλων δεν μπορεί να εξηγηθεί αυτή τη στιγμή. Επιπλέον, και εν όψει της πιθανής μελλοντικής χρήσης του προΤα(100-109) ή της προΤα ως ανοσοενισχυτικά (adjuvants) σε ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα, φαίνεται ότι τα πεπτίδια θα μπορούσαν να χορηγηθούν σε όλες τις γυναίκες με καρκίνο του μαστού, ανεξάρτητα από τα χαρακτηριστικά των όγκων τους και να επάγουν εξίσου ευεργετικό ανοσοενισχυτικό αποτέλεσμα.

Ως συνέχεια της μελέτης στα ουδετερόφιλα και χρησιμοποιώντας αντίστοιχες ομάδες ελέγχου, εφαρμόστηκαν οι τέσσερις βασικές λειτουργικές δοκιμασίες (φαγοκυττάρωση, ενδοκυτταρική παραγωγή-εξωκυτταρική απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$ και αναπνευστική έκρηξη) σε έναν ακόμα υποπληθυσμό του φυσικού σκέλους της ανοσίας που εκφράζει TLR-4, στα μονοκύτταρα. Τα μονοκύτταρα ανήκουν στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, ενώ μπορούν να διασχίζουν το επιθηλιακό φράγμα των αιμοφόρων αγγείων, να διεισδύουν στους ιστούς και να διαφοροποιούνται σε μακροφάγα που καταστρέφουν τα παθογόνα ή σε δενδριτικά κύτταρα που ενεργοποιούν την ανοσοαπόκριση (Yona and Jung, 2010).

Τα μονοκύτταρα των υγιών δοτών εμφάνισαν εντονότερη βασική φαγοκυτταρική ικανότητα και υψηλότερη βασική παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$ σε σχέση με τα μονοκύτταρα των καρκινοπαθών. Αντίθετα, η εξωκυτταρική απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$, αλλά και συνολικά η αναπνευστική έκρηξη των μονοκυττάρων ήταν σε παρόμοια επίπεδα και στις δύο αυτές ομάδες. Η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων με προΤα(100-109) ή προΤα διπλασίασε τη φαγοκυτταρική τους ικανότητα, αύξησε κατά 2,5 φορές την ενδοκυτταρική παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$ και κατά 2 φορές την εξωκυτταρική απελευθέρωσή του, τόσο στους υγιείς δότες όσο και στους καρκινοπαθείς. Παράλληλα, τα δύο πεπτίδια ενίσχυσαν σημαντικά και την αναπνευστική έκρηξη των μονοκυττάρων των υγιών δοτών και των ασθενών με καρκίνο. Παρόλο που ο μεγαλύτερος όγκος της βιβλιογραφίας γύρω από τα μονοκύτταρα αφορά κυρίως τις διαφοροποιημένες τους μορφές (προς μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα), στους ασθενείς με καρκίνο έχει περιγραφεί δυσλειτουργία των μονοκυττάρων, συνοδευόμενη από μειωμένη μεταναστευτική ικανότητα, σε σύγκριση με τους υγιείς δότες. Η δυσλειτουργία αυτή των μονοκυττάρων σε συνδυασμό με αντίστοιχα ελλείμματα στη λειτουργικότητα των

ουδετερόφιλων πιστεύεται ότι συμβάλλει στη γενικότερη ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος που παρατηρείται στον καρκίνο (Lang et al., 2003).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που λάβαμε από ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα, παρατηρούμε ότι η φαγοκυτταρική ικανότητα των δύο λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα, αφού είναι γνωστό ότι διαθέτουν εξίσου σημαντική ικανότητα φαγοκυττάρωσης (Dale et al., 2008). Επίσης, τα μονοκύτταρα εμφάνισαν χαμηλή βασική εξωκυτταρική απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$ αντίστοιχη με εκείνη των ουδετερόφιλων, με τα ουδετερόφιλα, όμως, των καρκινοπαθών να απελευθερώνουν περισσότερο $\cdot\text{O}_2^-$ σε σύγκριση με τα μονοκύτταρα των καρκινοπαθών, μετά από διέγερση με τα πεπτιδία. Τα μονοκύτταρα παρουσίασαν μειωμένη ενδοκυτταρική παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$ σε σύγκριση με τα ουδετερόφιλα, γεγονός αναμενόμενο, αφού τα ουδετερόφιλα αναπτύσσουν εντονότερες αναπνευστικές εκρήξεις (Dale et al., 2008). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η ανοσοενισχυτική δράση του προΤα(100-109) και της προΤα παρατηρήθηκε μόνο όταν εφαρμόσαμε τη δοκιμασία της αναπνευστικής έκρηξης (Bursttest) σε απομονωμένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα. Όταν χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία ολικό αίμα, η δράση των πεπτιδίων στους δύο πληθυσμούς δεν ήταν διακριτή, πιθανόν λόγω της σύγχρονης παρουσίας και άλλων κυτταρικών υποπληθυσμών.

Γνωρίζοντας ήδη ότι: (1) το προΤα(100-109) και η προΤα ενισχύουν *in vitro* τη δραστηριότητα ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων περιφερικού αίματος, (2) τα συγκεκριμένα κύτταρα έχουν σύντομο χρόνο ζωής σε καλλιέργειες και (3) έχουν ανομοιογενή χαρακτηριστικά αφού προέρχονται από διαφορετικούς δότες, δοκιμάσαμε να διαφοροποιήσουμε κύτταρα της ανθρώπινης προμυελοκυτταρικής σειράς HL-60 προς ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα, με σκοπό να εξασφαλίσουμε ικανοποιητικό αριθμό κυττάρων με όσο το δυνατόν πιο ομοιογενή χαρακτηριστικά. Κύτταρα HL-60 διαφοροποιήθηκαν με δύο καθιερωμένους επαγωγικούς παράγοντες: με DMSO προς ουδετερόφιλα και με TNF- α προς μονοκύτταρα (Collins, 1987). Παράλληλα, μελετήθηκε η ικανότητα του προΤα(100-109) και της προΤα να δρουν ως πιθανοί παράγοντες διαφοροποίησης των κυττάρων HL-60, αλλά και η ικανότητα των πεπτιδίων να ενισχύουν τις λειτουργίες των ήδη διαφοροποιημένων κυττάρων HL-60 προς ουδετερόφιλα ή μονοκύτταρα. Όπως προέκυψε, τα δύο πεπτιδία δε διαθέτουν ικανότητα διαφοροποίησης της σειράς HL-60, γεγονός που συμφωνεί και με την αδυναμία τους να διαφοροποιούν μονοκύτταρα προς δενδριτικά κύτταρα (Skopeliti et al., 2009). Επίσης, δεν ενίσχυσαν την παραγωγή ριζών, ούτε των διαφοροποιημένων με τους καθιερωμένους επαγωγικούς παράγοντες κυττάρων HL-60. Γενικότερα, τα ποσοστά διαφοροποίησης των κυττάρων HL-60 προς ουδετερόφιλα ή

μονοκύτταρα που λάβαμε ήταν χαμηλά (<50%) σε σχέση με εκείνα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (>70%) (Le Cabec et al., 1997)

Προκειμένου να διαλευκάνουμε τον τρόπο δράσης του δεκαπεπτιδίου και να επιβεβαιώσουμε την ικανότητά του να λειτουργεί ως DAMP (Ioannou et al., 2013), αναπτύξαμε σύστημα ανταγωνιστικής ELISA με υψηλή ευαισθησία, για τον ποσοτικό προσδιορισμό του προΤα(100-109) εξωκυτταρικά. Η επιλογή του δεκαπεπτιδίου έγινε με βάση τα παρακάτω σημαντικά στοιχεία: (1) το προΤα(100-109) είναι το ανοσοδραστικό τμήμα της προΤα και, όταν χορηγηθεί εξωκυτταρικά, μπορεί να ενισχύει αποτελεσματικά τις ανοσοαπαντήσεις (Ioannou et al., 2012), (2) υπάρχει τουλάχιστον ένας γνωστός μηχανισμός *in vivo* παραγωγής του, καθώς η προΤα θραυσματοποιείται από την κασπάση 3 στο D⁹⁹ κατά τη διάρκεια της απόπτωσης (Enkemann et al., 2000; Evstafieva et al., 2003) και (3) η πέψη της προΤα και η απομάκρυνσή της από τον πυρήνα του κυττάρου είναι ένα ιδιαίτερα πρώιμο αποπτωτικό γεγονός, το οποίο αναστέλλει πλήρως την ικανότητα πολλαπλασιασμού και επιβίωσης των κυττάρων και οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (Enkemann et al., 2000).

Για την ανάπτυξη της ELISA, προσπαθήσαμε να παράγουμε μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του προΤα(100-109). Είναι γνωστό ότι η ακέραιη προΤα εμφανίζει χαμηλή ανοσογονικότητα, λόγω της ιδιόμορφης αμινοξικής της σύστασης, της έλλειψης δευτεροταγούς/τριτοταγούς δομής και του ιδιαίτερα όξινου και υδρόφιλου χαρακτήρα της (Klimentzou et al., 2006). Για αυτό το λόγο, στις ανοσοποιήσεις των πειραματόζωων χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο το δεκαπεπτίδιο Cys-προΤα(100-109) συνδεδεμένο με KLH, προκειμένου να καταστεί περισσότερο ανοσογονικό. Παρόλα αυτά, η προσπάθεια παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων απέτυχε, καθώς κανένα από τα υβριδώματα που προέκυψαν δεν παρήγαγε σταθερά μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του προΤα(100-109), όπως επιβεβαιώθηκε τόσο με ELISA όσο και με Western blot. Στο παρελθόν, έχουν αναπτυχθεί διάφορες ανοσοδοκιμασίες που βασίζονται σε αντισώματα (ELISAs και RIAs) για την ανίχνευση της προΤα ή θραύσματος της, ως επί το πλείστον της Τα1. Αν και μονοκλωνικά αντισώματα για την προΤα έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Sukhacheva et al., 2002), στην πλειοψηφία των δοκιμασιών χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα, τα οποία είχαν παραχθεί σε κουνέλια ή όρνιθες. Οπότε, και στη περίπτωση της ανάπτυξης της δικής μας ELISA, προχωρήσαμε χρησιμοποιώντας τα υψηλής συγγένειας παραχθέντα πολυκλωνικά αντισώματα, από τα οποία, με χρωματογραφία συγγένειας, απομονώθηκαν οι ειδικές για το προΤα(100-109) IgG, με βάση τις οποίες αναπτύχθηκε η ανοσοδοκιμασία.

Η ανοσοδοκιμασία μας είναι μία ανταγωνιστικού τύπου ELISA, η οποία βελτιστοποιήθηκε εξετάζοντας τη διάταξή της, τα διαλύματα, τους χρόνους και τις θερμοκρασίες επώασης, καθώς και τις συγκεντρώσεις όλων των χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων. Στο τελικό πρωτόκολλο της ανταγωνιστικής ELISA για το προΤα(100-109), γίνεται επίστρωση μικροπλάκας με πρωτεΐνη A, η οποία προέρχεται από το βακτήριο *S. aureus* και έχει την ιδιότητα να προσδένει την Fc περιοχή των IgG. Παράλληλα, επωάζονται για 18 ώρες στους 4°C οι ειδικές για το δεκαπεπτιδίο IgG με βιοτινυλιωμένο και ελεύθερο προΤα(100-109) προς ανταγωνισμό. Σε επόμενο βήμα, οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης της μικροπλάκας καλύπτονται με διάλυμα κορεσμού και το προεπωασμένο μείγμα μοιράζεται στην ήδη επιστρωμένη μικροπλάκα και επωάζεται. Προστίθεται συζευγμένη με υπεροξειδάση στρεπταβιδίνη, στη συνέχεια διάλυμα ενζυμικού υποστρώματος ABTS και, εντός ολίγων λεπτών, στα φρεάτια της μικροπλάκας εμφανίζεται χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα. Η οπτική πυκνότητα μετρείται σε μετρητή ELISA στα 405 nm (**Εικόνα 2.13**).

Η ευαισθησία της αναπτυχθείσας ELISA είναι από 10 μg/mL έως 0,1 ng/mL προΤα(100-109) και δε φάνηκε να παρουσιάζει χιαστά διασταυρούμενη αντίδραση με άλλες θυμοσίνες ή την BSA. Τα αντισώματα αναγνωρίζουν εξίσου καλά με το δεκαπεπτιδίο και την ακέραιη προΤα, ενώ ο κύριος αντιγονικός τους επίτοπος εντοπίστηκε μεταξύ των αμινοξέων 103-109. Πράγματι, έχει αναφερθεί και στο παρελθόν παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων, των οποίων ο ανοσοκυρίαρχος επίτοπος εντοπιζόταν στο καρβοξυτελικό άκρο και συγκεκριμένα μεταξύ των αμινοξέων 95-107 (Tsitsiloni et al., 1994) και 88-108 (Costopoulou et al., 1998), γιατί η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλή υδροφιλικότητα και ευελιξία. Η ELISA που τελικά αναπτύξαμε είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και ειδική, με χαμηλό σήμα υποβάθρου. Επιπλέον, *in silico* ανάλυση αποκάλυψε ότι η πρωτοταγής αλληλουχία του προΤα(100-109) είναι μοναδική και δεν υπάρχει καμία ομολογία του δεκαπεπτιδίου με περιοχές άλλων πρωτεϊνών του ορού (Samara et al., 2013b). Για να εξαιρεθεί κάθε πιθανότητα διασταυρούμενης αντίδρασης με πρωτεΐνες του ορού, κατακρημνίσαμε τα δείγματα πριν την ανάλυση με ψυχρή ακετόνη. Με την κατεργασία αυτή εξασφαλίσαμε επιπλέον ότι οι πρωτεΐνες υψηλής αφθονίας δε θα παρεμποδίζουν την ανίχνευση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109), το οποίο βρίσκεται σε ιδιαίτερα χαμηλή συγκέντρωση (Kawashima et al., 2010). Σύμφωνα με μία πρόσφατη μελέτη, τα επίπεδα της προΤα σε ανθρώπινο πλάσμα από φυσιολογικά άτομα είναι ιδιαίτερα χαμηλά, μικρότερα από 1 ng/mL (Jou et al., 2013).

Η συγκεκριμένη ELISA διαθέτει τρία ιδιαίτερα στοιχεία που συμβάλλουν στην αυξημένη ειδικότητα και ευαισθησία της: (1) η χρήση της πρωτεΐνης A, ως πρωτεΐνης επίστρωσης, προσανατολίζει ομοιόμορφα τα συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος, δεσμεύοντας τη

σταθερή περιοχή των αντισωμάτων (Ngai et al., 1993), (2) η προεπώαση αντισωμάτων-πεπτιδίων σε διάλυμα επιτρέπει την ειδική αναγνώριση του αντιγόνου και τη δημιουργία συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος και (3) η κατακρήμνιση των δειγμάτων με ακετόνη απομακρύνει τις μεγαλομοριακές και σε μεγάλη αφθονία πρωτεΐνες του ορού, μειώνοντας τις παρεμποδίσεις, χωρίς να μεταβάλλει τη συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου, όπως φάνηκε από τα πειράματα ανάκτησης (Πίνακας 3.5). Οι ανοσοδοκιμασίες που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα για την ανίχνευση της προΤα σε ορό/πλάσμα ήταν αντίστοιχης ευαισθησίας και ειδικότητας με τη δική μας ELISA για το προΤα(100-109). Ενδεικτικά, οι RIAs είχαν κατώτερο όριο ανίχνευσης του ακέραιου πολυπεπτιδίου τα 0,08 ng/mL (Dominquez et al., 1993), ενώ οι ELISAs τα 10 ng/mL στον ορό (Costopoulou et al., 1998) και τα 0,036 ng/mL στο πλάσμα (Jou et al., 2013).

Με την αναπτυχθείσα ELISA, προσδιορίσαμε τη συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109): (1) *in vitro* σε υπερκείμενα κυττάρων που οδηγήθηκαν σε κυτταρικό θάνατο, (2) *in vivo* στον ορό ποντικών μολυσμένων με παθογόνα βακτήρια και (3) *ex vivo* σε ανθρώπινους ορούς υγιών ατόμων και ατόμων με διάφορα νοσήματα, λοιμώδους και μη λοιμώδους αιτιολογίας.

Για τα *in vitro* πειράματά μας, και παρόλο που έχουν πλέον περιγραφεί και άλλοι τύποι κυτταρικού θανάτου (Kaczmarek et al., 2013), επιλέξαμε να εξετάσουμε τους δύο καλύτερα μελετημένους: τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, δηλαδή την απόπτωση, και το βίαιο κυτταρικό θάνατο, τη νέκρωση. Για τα προκαταρκτικά πειράματα, χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη καρκινική σειρά HeLa, η οποία φυσιολογικά υπερεκφράζει την προΤα (Evstafieva et al., 2003). Για την επαγωγή απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις των κυτταροτοξικών παραγόντων TNF- α , εμετίνης, ακτινομυκίνης D, δοξορουβικίνης, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, και για διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης, προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες. Για την επαγωγή νέκρωσης, χρησιμοποιήθηκε υψηλή συγκέντρωση δοξορουβικίνης (100 $\mu\text{g/mL}$) ή εφαρμόστηκαν διαδοχικοί κύκλοι ψύξης-απόψυξης στα κύτταρα. Τα ποσοστά των αποπτωτικών/νεκρωτικών κυττάρων ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας αννεξίνη V, η οποία δεσμεύεται με τη φωσφατιδυλοσερίνη και επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των αποπτωτικών κυττάρων, και PI για τη διάκριση των νεκρωτικών κυττάρων (Lay et al., 2014).

Στην περίπτωση της απόπτωσης, ως βέλτιστες συνθήκες ορίστηκαν εκείνες κατά τις οποίες το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων HeLa βρισκόταν στο στάδιο της πρώιμης απόπτωσης (annexin+PI-). Φάνηκε ότι ο συνδυασμός 5 ng/mL TNF- α και 1 $\mu\text{g/mL}$ εμετίνη για 4 ώρες ήταν η καλύτερη συνθήκη επαγωγής απόπτωσης, καθώς το 85,7% των κυττάρων

HeLa χαρακτηρίστηκαν ως πρώιμα αποπτωτικά (**Εικόνα.3.25**). Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε η ίδια ακριβώς συνθήκη σε τέσσερις ακόμα ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές (MCF-7, K562, U937 και THP-1), σε μία καρκινική σειρά ποντικού (YAC), καθώς και σε λευκοκυτταρικούς υποπληθυσμούς (μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα και λεμφοκύτταρα), απομονωμένους από το περιφερικό αίμα υγιών δοτών.

Όλα τα υπερκείμενα, τόσο των αποπτωτικών όσο και των νεκρωτικών καλλιιεργειών, συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με την αναπτυχθείσα ELISA. Στα υπερκείμενα-μάρτυρες, δηλαδή στα κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό, η συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) ήταν ελάχιστη, ενώ αντίθετα βρέθηκε αυξημένη σε όλα τα αποπτωτικά υπερκείμενα (3-13 ng/mL). Η κυτταρική σειρά HeLa και τα ουδετερόφιλα του περιφερικού αίματος ήταν οι δύο τύποι κυττάρων που παρουσίασαν τα υψηλότερα επίπεδα προΤα(100-109). Τα επίπεδα αυτά, προφανώς, εξαρτώνται και συσχετίζονται τόσο με το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονταν στο στάδιο της πρώιμης απόπτωσης, όσο και με τα ενδογενή επίπεδα προΤα που εκφράζει η κάθε κυτταρική σειρά ή ο κάθε λευκοκυτταρικός τύπος (Panneerselvam et al., 1987). Αξίζει να συζητηθεί χωριστά ότι και στα υπερκείμενα των νεκρωτικών κυττάρων ανιχνεύθηκε ανοσοδραστικό υλικό με τη συγκεκριμένη ELISA, σε επίπεδα περίπου 9 ng/mL. Πιθανόν, το υλικό αυτό αφορά την ακέραιη προΤα που απελευθερώνεται λόγω της ρήξης των κυτταρικών μεμβρανών και την οποία τα παραχθέντα πολυκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν και προσδένουν εξίσου καλά με το προΤα(100-109) (Samara et al, 2013b). Συνεπώς από τα *in vitro* πειράματα, φαίνεται ότι η ενεργοποίηση των κασπασών κατά την απόπτωση οδηγεί σε παραγωγή του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) (Evstafieva et al., 2003), το οποίο απελευθερώνεται και ανιχνεύεται εξωκυτταρικά, όπως έχουν ήδη δείξει προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου μας (Ιωάννου 2013, Διδακτορική Διατριβή).

Για τη συνέχεια των πειραμάτων, λάβαμε υπόψη μας δύο ακόμα σημαντικά στοιχεία: (1) ότι συγκεκριμένα παθογόνα βακτήρια κατά κύριο λόγο μολύνουν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, οδηγώντας σε μαζική απόπτωση κύτταρα του φυσικού σκέλους της ανοσίας, όπως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα (Timmer et al., 2009) και (2) στην κλινική πράξη, υπάρχει μία αναδυόμενη ανάγκη για νέους βιοδείκτες για τη διάκριση της σήψης που συχνά ακολουθεί τις βακτηριακές λοιμώξεις, από άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις, και την ταχύτερη δυνατή διάγνωση και πρόγνωση της (Singer, 2013). Ως εκ τούτου, θεωρήσαμε ότι ο προσδιορισμός των επιπέδων του προΤα(100-109) που απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος μετά από βακτηριακή μόλυνση και μαζική

απόπτωση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως δείκτης διάκρισης της λοιμώδους φλεγμονής από τη φλεγμονή μη λοιμώδους αιτιολογίας.

Στα *in vivo* πειράματα, επιλέξαμε να δημιουργήσουμε μοντέλα λοίμωξης σε ποντίκια. Αρχικά, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του προΤα(100-109) στον ορό BALB/c και C57BL/6 ποντικών, τα οποία μολύνθηκαν με πέντε διαφορετικά είδη κλινικά απομονωμένων βακτηρίων (*Salmonella typhimurium*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium urealyticum*, *Streptococcus pyogenes* και *Klebsiella oxytoca*). Τα βακτήρια αυτά έχει βρεθεί ότι προκαλούν απόπτωση στα μακροφάγα του ξενιστή (Hilbi et al., 1997; Timmer et al., 2009). Επιπλέον, καλύπτουν όλες τις συνθήκες, για έναν άνθρωπο, οδούς μόλυνσης, καθώς και ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων. Τα ποντίκια που χρησιμοποιήσαμε προέρχονταν από τις φυλές BALB/c και C57BL/6 που είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν διαφορές ως προς την ευαισθησία τους στις λοιμώξεις, με τα C57BL/6 ποντίκια να θεωρούνται γενικά πιο ανθεκτικά στις βακτηριακές λοιμώξεις (Ulett et al., 2000). Επίσης, είχαν μεγαλώσει κάτω από διαφορετικές εργαστηριακές συνθήκες: τις συμβατικές και συνθήκες κατά τις οποίες δεν επιτρεπόταν η επαφή τους με παθογόνα από τη στιγμή της γέννησής τους (germ-free ζώα) (Arvidsson et al., 2012). Ο διαχωρισμός αυτός έγινε προκειμένου να εξετάσουμε αν υπήρχε διαφορά στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου με βάση τα αντιγονικά ερεθίσματα που έχει δεχθεί ένας οργανισμός και την επαγόμενη ανοσολογική απάντηση.

Τα ποντίκια ενοφθαλμίστηκαν ενδοπεριτοναϊκά με μία δόση βακτηριακού εναιωρήματος (10^3 CFU/0,5 mL/ποντίκι) και συλλέχθηκε αίμα πριν τη μόλυνση, 2, 24 και 72 ώρες μετά από αυτή, προκειμένου να καλύψουμε όλο το χρονικό φάσμα της λοίμωξης. Παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την ποσότητα του προΤα(100-109) που προσδιορίστηκε στον ορό των ζώων, ανάλογα με τη φυλή, τις εργαστηριακές συνθήκες διαβίωσης και το είδος του παθογόνου που τα μόλυνε. Γενικά, τα πρότυπα αύξησης που καταγράφηκαν ήταν διαφορετικά και ετερογενή, χωρίς να μπορούμε να καταλήξουμε σε ένα ασφαλές καθολικό πρότυπο. Φάνηκε ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, τα επίπεδα του προΤα(100-109) πριν τη μόλυνση ήταν χαμηλά έως ελάχιστα, αυξήθηκαν σταδιακά με την πρόοδο της λοίμωξης και, για τα περισσότερα παθογόνα, κορυφώθηκαν στις 72 ώρες. Γνωρίζοντας ότι τα βακτηριακά αυτά στελέχη προκαλούν μαζική απόπτωση μακροφάγων στα ζώα (Hilbi et al., 1997), θεωρούμε ότι μετά τον ενδοκυτταρικό κατακερματισμό της προΤα, το δεκαπεπτίδιο εξωκυτταρώνεται στον ορό, λειτουργώντας ως «σήμα κινδύνου» (DAMP) (Ioannou et al., 2013).

Τα αποτελέσματα της ELISA επιβεβαιώθηκαν και με MALDI-TOF φασματομετρία μάζας. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν οροί από τα ζώα που μολύνθηκαν με *Klebsiella oxytoca*,

από τους οποίους ήταν διαθέσιμη επαρκής ποσότητα και είχε ανιχνευθεί η υψηλότερη μέχρι στιγμής συγκέντρωση δεκαπεπτιδίου. Μόνο στους ορούς των 24 και 72 ωρών, ανιχνεύθηκε μία μικρή κορυφή στα όρια του θορύβου, η οποία, όμως, αντιστοιχούσε με μεγάλη ακρίβεια στη μοριακή μάζα του δεκαπεπτιδίου (1207,58) (Εικόνα 3.33) και αποτελεί μία πρώτη ένδειξη *in vivo* εξωκυτταρικής παρουσίας του μετά από την επαγωγή απόπτωσης λόγω βακτηριακής λοίμωξης.

Με βάση τα αποτελέσματα από τα πρώτα μοντέλα, προχωρήσαμε σε ένα πιο επιθετικό μοντέλο, θανατηφόρου σηψαιμίας, με τη χρήση δύο στελεχών *Klebsiella pneumoniae* σε ποντίκια της φυλής ICR. Το ένα στέλεχος είναι κλινικά απομονωμένο (L-78), ευαίσθητο στα αντιβιοτικά, παρουσιάζει χαμηλή μολυσματικότητα και ενδοκυτταρώνεται από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα του περιφερικού αίματος, ενώ το δεύτερο είναι πρότυπο στέλεχος (ATCC43816), ανθεκτικό στα αντιβιοτικά, υψηλής μολυσματικότητας και δεν ενδοκυτταρώνεται (Tzouvelekis et al., 2013). Τα ποντίκια μολύνθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με τα LD₅₀ (10⁸ και 5 x 10³ CFU, αντίστοιχα) και οι αιμοληψίες έγιναν πριν τη λοίμωξη, 12, 24 και 48 ώρες μετά από αυτή. Τα δύο αυτά στελέχη έχουν μελετηθεί διεξοδικά τόσο σε ανοσοεπαρκή όσο και σε ουδετεροπενικά ζώα, σε διαφορετικές δοσολογίες και για χρονικά διαστήματα έως και 96 ώρες. Βρέθηκε ότι όταν χορηγούνται στα ζώα συγκεντρώσεις βακτηρίων που πλησιάζουν τα LD₅₀, η επιβίωση των ζώων μπορεί να διαρκέσει περίπου 48 ώρες, όταν όμως η δόση ξεπεράσει κατά πολύ το LD₅₀, η χρονική διάρκεια επιβίωσής τους μειώνεται στη μία ημέρα, λόγω του θανάτου των πειραματόζωων από θανατηφόρα σηψαιμία (Tzouvelekis et al., 2013). Στα δικά μας πειράματα, στα ζώα που χορηγήθηκε το L-78 στέλεχος, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του προΤα(100-109), με τη μέγιστη ποσότητά του να ανιχνεύεται 48 ώρες μετά τη λοίμωξη (Εικόνα 3.34). Στα ζώα που μολύνθηκαν με το στέλεχος ATCC43816, παρατηρήθηκαν αυξομειώσεις στην ανιχνευθείσα συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου.

Για να εξακριβώσουμε την αιτία αυτών των διαφορών, επαναλήφθηκαν τα δύο μοντέλα χρησιμοποιώντας την ίδια δόση βακτηρίων για το στέλεχος L-78, καθώς είναι η μέγιστη δυνατή δόση που μπορεί να χορηγηθεί ενδοπεριτοναϊκά σε ποντίκια και τη δόση των 10⁶ CFU για το στέλεχος ATCC43816, η οποία είναι πολύ υψηλότερη του LD₅₀, οδηγώντας τα ποντίκια σε θανατηφόρα σηψαιμία εντός 16 ωρών. Ξεκινήσαμε τη συλλογή αίματος νωρίς από την έναρξη της λοίμωξης, πραγματοποιώντας αιμοληψίες και στις 3 και 6 ώρες. Τα ζώα που έλαβαν το στέλεχος L-78 εμφάνισαν σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου ήδη από τις πρώτες ώρες της λοίμωξης. Τα ζώα που έλαβαν το στέλεχος ATCC43816 εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα τις τρεις πρώτες ώρες και τα επίπεδα αυτά

παρέμειναν σταθερά υψηλά όλη τη διάρκεια της λοίμωξης. Από επιλεγμένα ζώα αφαιρέθηκαν οι σπλήνες και τα σπληνοκύτταρά τους ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής, μετά από χρώση με αννεξίνη V και PI. Στην περίπτωση του στελέχους L-78 που ενδοκυτταρώνεται, ο θάνατος των μακροφάγων του σπλήνα ήταν κυρίως αποπτωτικός, ενώ στο στέλεχος ATCC43816 ενεργοποιήθηκαν αποπτωτικά αλλά και νεκρωτικά μονοπάτια θανάτου, λόγω της μη ενδοκυττάρωσης του βακτηρίου (**Παράρτημα II**). Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με σχετικά πρόσφατη μελέτη, η οποία έδειξε ότι η *in vitro* μόλυνση ηπατικών κυττάρων με στελέχη *Klebsiella pneumoniae* υψηλής μολυσματικότητας προκαλεί αρχικά απόπτωση, η οποία με την πρόοδο της λοίμωξης εξελίσσεται σε πρωτογενή και δευτερογενή νέκρωση. Κατά την πρόοδο της λοίμωξης, καταγράφηκε και θραυσματοποίηση του DNA, προτείνοντας την ταυτόχρονη επαγωγή πολλαπλών μονοπατιών θανάτου (Yang et al., 2012). Ο θάνατος του κυττάρου μέσω διάφορων μηχανισμών μπορεί να προκληθεί και από άλλα βακτηριακά παθογόνα, εκτός από την *Klebsiella*. Για παράδειγμα, το *Vibrio parahaemolyticus* προκαλεί προφλεγμονώδη θάνατο επάγοντας αυτοφαγία και λύση των κυττάρων (Burdette et al., 2008). Η *Salmonella* σκοτώνει τα κύτταρα μέσω εξαρτώμενης από τις κασπάσες νέκρωσης (Brennan and Cookson, 2000), ενώ η *Shigella* προκαλεί κυτταρική νέκρωση μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III (François et al., 2000).

Τέλος, μετρήσαμε τα επίπεδα του προΤα(100-109) σε ανθρώπινα δείγματα. Συγκεκριμένα, συλλέξαμε ορούς από τις παρακάτω κατηγορίες: υγιείς δότες, παιδιά με βακτηριακές λοιμώξεις και αυτοφλεγμονώδη νοσήματα και ασθενείς που νοσηλεύονταν στη ΜΕΘ, όπου πολλοί από αυτούς εμφανίζουν σήψη μετά από μόλυνση με ανθεκτικά νοσοκομειακά στελέχη βακτηρίων (Michalopoulos et al., 2011). Αρχικά, προσδιορίσαμε για πρώτη φορά τα επίπεδα του δεκαπεπτιδίου στον ορό υγιών ατόμων. Όπως αναμενόταν, τα επίπεδα ήταν ιδιαίτερα χαμηλά, με μέση τιμή <1 ng/mL και ανεξάρτητα από την ηλικία των ατόμων, όπως αντίστοιχα χαμηλές τιμές έχουν αναφερθεί στο πλάσμα και για την ακέραιη προΤα (Jou et al., 2013). Όσον αφορά, τους παιδιατρικούς ασθενείς, χωρίστηκαν σε παιδιά με αυτοφλεγμονώδη νοσήματα και χαμηλή CRP, αυτοφλεγμονώδη νοσήματα και υψηλή CRP και παιδιά με λοιμώξεις. Τα παιδιά που έπασχαν από λοιμώξεις εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις δεκαπεπτιδίου σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα παιδιών με αυτοφλεγμονώδη νοσήματα. Συγκεκριμένα, παιδιά τα οποία είχαν μολυνθεί με *Streptococcus hominis*, *Streptococcus spp.* και *E. coli* εμφάνισαν από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις δεκαπεπτιδίου εντός της ομάδας των παιδιών με λοιμώξεις. Η απελευθέρωση του προΤα(100-109) στον ορό φάνηκε να είναι ειδική μόνο σε μολύνσεις από βακτήρια, και δε σχετίζεται με οποιαδήποτε φλεγμονώδη νόσο. Τα δείγματα από τη ΜΕΘ ελήφθησαν σειριακά από τη

στιγμή της εισαγωγής του ασθενούς μέχρι την έξοδό του, ώστε να είναι αντιπροσωπευτικά της πορείας νοσηλείας του. Παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις στη συγκέντρωση του προΤα(100-109) κατά την πορεία νοσηλείας ασθενών που εμφάνισαν βακτηριακές λοιμώξεις, οι οποίες στην πλειοψηφία των περιπτώσεων συσχετιζόνταν με την αντίστοιχη κλινική εικόνα και τους εργαστηριακούς δείκτες. Συγκεκριμένα, η αύξηση της συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου σε 3 ασθενείς που είχαν εμφανίσει λοίμωξη από στελέχη *Klebsiella pneumoniae* ταυτίστηκε με την ημέρα έναρξής της, όπως επιβεβαιώθηκε, στη συνέχεια, από τις εργαστηριακές εξετάσεις και τα κλινικά συμπτώματα. Αντίθετα, ελάχιστη ήταν η συγκέντρωση του προΤα(100-109) (<2 ng/mL) σε περιστατικά που νοσηλεύθηκαν στη ΜΕΘ για διάφορες αιτίες, όπως καρδιοαναπνευστική δυσχέρεια, φαρμακευτική δηλητηρίαση, καρδιαγγειακά προβλήματα, επιπλοκές χειρουργικών επεμβάσεων, χωρίς ωστόσο να εμφανίσουν λοίμωξη.

Ο προσδιορισμός του προΤα(100-109) *in vitro* σε κυτταρικές σειρές, *in vivo* σε μοντέλα βακτηριακών λοιμώξεων σε ποντίκια και *ex vivo* σε ορό υγιών και ασθενών αποτελεί μία ολοκληρωμένη προσπάθεια μελέτης και κατανόησης του τρόπου δράσης του δεκαπεπτιδίου υπό φυσιολογικές και μη συνθήκες. Συλλέξαμε σημαντικά δεδομένα γύρω από το μηχανισμό δράσης του πεπτιδίου αυτού: η *in vitro* μελέτη έδειξε την ικανότητα του προΤα(100-109) να απελευθερώνεται στο υπερκείμενο κυτταρικών σειρών που οδηγούνται σε απόπτωση, ενώ η *in vivo* μελέτη στα ποντίκια επιβεβαίωσε ότι κάτι αντίστοιχο μπορεί να συμβεί και στο εσωτερικό ενός οργανισμού που μολύνεται από βακτήρια και τα κύτταρά του πεθαίνουν μαζί. Τέλος, η *ex vivo* ανάλυση ανθρώπινων δειγμάτων από διάφορες παθολογικές καταστάσεις επιβεβαίωσε ότι το προΤα(100-109) δρα αντίστοιχα και στον άνθρωπο.

Τα αποτελέσματα από τα ανθρώπινα δείγματα θα μπορούσαν, μελλοντικά, να οδηγήσουν στην ανάπτυξη μίας διαγνωστικής δοκιμασίας, που θα μπορούσε να αποβεί χρήσιμη στην αντιμετώπιση βασικών κλινικών προβλημάτων, όπως η όσο το δυνατόν πιο έγκαιρη διάγνωση των βακτηριακών λοιμώξεων. Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα, η μέτρηση του προΤα(100-109) μπορεί να διακρίνει μεταξύ βακτηριακών λοιμώξεων και φλεγμονών μη λοιμώδους αιτιολογίας. Η ανάγκη εύρεσης νέων μορίων-δεικτών που να διαφοροποιούν τις βακτηριακές από άλλου τύπου λοιμώξεις είναι έντονη, καθώς οι περισσότεροι από τους ήδη υπάρχοντες δείκτες στερούνται ειδικότητας και ευαισθησίας, ενώ γίνονται ανιχνεύσιμοι στο αίμα όταν η λοίμωξη έχει ήδη εγκατασταθεί και προκαλέσει γενικευμένη σήψη. Η σήψη αποτελεί βαριά νοσολογική οντότητα, που συνοδεύεται από συστηματική και μη ελεγχόμενη φλεγμονώδη απάντηση. Η ανίχνευση της σήψης και του σηπτικού shock που συχνά ακολουθεί, πρέπει να γίνεται έγκαιρα, καθώς η οποιαδήποτε καθυστέρηση στην έναρξη

χορήγησης της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής συσχετίζεται με φτωχή πρόγνωση (Inády et al., 2011).

Για τη διάγνωση της σήψης, χρησιμοποιούνται πολυπαραμετρικά μοντέλα που συμπεριλαμβάνουν τον προσδιορισμό των επιπέδων της προκαλσιτονίνης και της CRP, τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων, καθώς επίσης τα APACHE και SOFA scores των ασθενών ανά ημέρα νοσηλείας τους. Πρόσφατα, έχει προταθεί και η χρήση του TREM-1 ως βιοδείκτη σήψης, καθώς η μόλυνση από *Streptococcus pyogenes* προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη αύξησή του *in vitro* σε κύτταρα, αλλά και *in vivo* στα όργανα των μολυσμένων ποντικών. Επιπλέον, αναφέρθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του διαλυτού TREM-1 στον ορό και της βαρύτητας της σήψης σε ασθενείς και ποντίκια (Horst et al., 2013). Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω αξιολόγηση της κλινικής σημασίας του μορίου αυτού, σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, με διαφορετικά είδη παθογόνων. Η προκαλσιτονίνη, η οποία θεωρείται ο πιο αξιόπιστος μέχρι στιγμής δείκτης, υπολογίζεται κυρίως με ημιποσοτικές μεθόδους (Kenzaka et al., 2012). Οι βιοδείκτες που θα φέρουν επανάσταση στον τρόπο με τον οποίο γίνεται η διαχείριση του σηπτικού ασθενή, είναι εκείνοι οι οποίοι θα αναγνωρίζουν έγκαιρα τη σήψη, προσφέροντας παράλληλα τη δυνατότητα πρόγνωσης και άρα, χορήγησης της κατάλληλης θεραπείας. Το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) φαίνεται να ανήκει σε αυτή την κατηγορία, αφού λόγω της ανοσοδοκιμασίας που αναπτύξαμε, υπερτερεί των ημιποσοτικών μεθόδων, ως προς την ιδιαίτερα ακριβή και ευαίσθητη ποσοτικοποίησή του στον ορό.

Συνδυάζοντας, λοιπόν, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής ως προς την ανοσοενισχυτική δράση του προΤα(100-109) σε φαγοκύτταρα και την εξωκυτταρική του αντίχνευση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, μπορεί να προταθεί το παρακάτω μοντέλο.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η προΤα βρίσκεται εντός του κυττάρου και συγκεκριμένα στον πυρήνα, ελέγχοντας σημαντικές κυτταρικές διεργασίες που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Υπό μη φυσιολογικές συνθήκες, τα κύτταρα οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης ή απόπτωσης. Κατά τη νέκρωση, το κύτταρο καταστρέφεται και διάφορα συστατικά του, ανάμεσα στα οποία και η προΤα, απελευθερώνονται εξωκυτταρικά. Εναλλακτικά, η προΤα εξωκυτταρώνεται και μέσω ενός μη κλασικού μονοπατιού έκκρισης, όπως έχει αναφερθεί για νευρώνες και αστροκύτταρα που υπόκεινται σε ισχαιμικό stress (Matsunaga and Ueda, 2010). Κατά την απόπτωση, η προΤα μετατοπίζεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και πέπτει από τις ενεργοποιημένες κασπάσες, παράγοντας το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) (Evstafieva et al., 2003), το οποίο εξωκυτταρώνεται και πολυμερίζεται σε β-πτυχωτά φύλλα (Skopeliti et al., 2009). Εκτός από τους χημικούς ή βιολογικούς παράγοντες, απόπτωση ή νέκρωση μπορεί να προκληθεί και από

τη μόλυνση κυττάρων με διάφορα βακτηριακά στελέχη, οδηγώντας σε εξωκυτταρική απελευθέρωση του προΤα(100-109) ή της προΤα. Εξωκυτταρικά, τόσο το προΤα(100-109) όσο και η ακέραιη προΤα, όταν η συγκέντρωσή τους αυξηθεί πέραν του φυσιολογικού (πιθανόν >1 ng/mL) (Jou et al., 2013 και αποτελέσματα της παρούσας διατριβής), διεγείρουν τον TLR-4 στην επιφάνεια κυττάρων της φυσικής ανοσίας (πχ. ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα/μακροφάγα) και οδηγούν στην ενεργοποίησή τους. Συγκεκριμένα, ενισχύουν τη φαγοκυτταρική ικανότητα και την παραγωγή ROS από τα ουδετερόφιλα (Samara et al., 2013a) και τα μονοκύτταρα. Παράλληλα, μέσω μονοπατιών που εξαρτώνται από τις πρωτεΐνες MyD88 και TRIF, ενισχύουν την αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα μονοκυττάρων, μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων και την παραγωγή TNF-α από αυτά (Skopeliti et al., 2007; Mosoian et al., 2010; Ioannou et al., 2013; Papanastasiou et al., 1992). Συνολικά, δηλαδή, το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) και η ακέραιη προΤα εξωκυτταρικά, λειτουργούν πλειοτροπικά ως ανοσορυθμιστές, με τρόπο ανάλογο με το μηχανισμό δράσης των ανοσοενισχυτικών μορίων (adjuvants).

Συμπερασματικά, από την παρούσα διδακτορική διατριβή προέκυψαν τα παρακάτω νέα στοιχεία:

- 1) το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) ασκεί σημαντική ανοσοενισχυτική δράση στα φαγοκύτταρα υγιών δοτών και ασθενών με καρκίνο του μαστού, αντίστοιχη με εκείνη του ακέραιου πολυπεπτιδίου, προΤα και
- 2) μέσω ειδικής και ευαίσθητης ELISA που αναπτύξαμε, το προΤα(100-109) ανιχνεύεται εξωκυτταρικά *in vitro* σε κυτταρικές σειρές που οδηγούνται σε απόπτωση, *in vivo* σε μοντέλα βακτηριακών λοιμώξεων σε ποντίκια και *ex vivo* σε ανθρώπινους ορούς από ασθενείς με σήψη.

Άμεσοι μελλοντικοί στόχοι:

Ως συνέχεια των αποτελεσμάτων αυτής της διατριβής, θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο να αποσαφηνιστούν τα εξής σημεία:

- να ταυτοποιηθεί το ανοσοδραστικό υλικό που προσδιορίσαμε με την ELISA στα υπερκείμενα καλλιέργειών κυττάρων που οδηγήθηκαν σε νέκρωση, αλλά και στον ορό ποντικών μολυσμένων με παθογόνα (πχ *K. pneumoniae* στέλεχος ATCC43816)

που προκαλούν νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, και πιθανόν είναι η ακέραιη προΤα. Η ταυτοποίηση μπορεί να γίνει εύκολα με ανοσοστύπωμα κατά Western, χρησιμοποιώντας ως πρωτογενές αντίσωμα πολυκλωνικές IgG έναντι του αμινοτελικού άκρου της προΤα.

- να διερευνηθεί αν θα υπάρξουν διαφορές στα επίπεδα του παραγόμενου προΤα(100-109), αλλά και στον επαγόμενο τύπο κυτταρικού θανάτου μετά από *in vitro* μόλυνση ανθρώπινων μονοκυττάρων/μακροφάγων από τα δύο στελέχη της *K. pneumoniae* (L-78 και ATCC43816). Η ικανότητα φαγοκυττάρωσης των βακτηρίων από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, η ενεργοποίηση του εξαρτώμενου ή μη από τις κασπάσες μονοπατιού και το είδος κυτταρικού θανάτου που επάγεται μπορούν εύκολα να μελετηθούν με κυτταρομετρία ροής και ανοσοστύπωμα κατά Western.
- να συλλεγεί μεγαλύτερος αριθμός ορών από υγιείς δότες, ώστε μετά τη μέτρηση των επιπέδων του προΤα(100-109) και την κατάλληλη στατιστική επεξεργασία να καθοριστούν τα φυσιολογικά όρια του δεκαπεπτιδίου στο αίμα. Παράλληλα, να προχωρήσουμε σε κλινική αξιολόγηση (validation) της ELISA, χρησιμοποιώντας περισσότερα δείγματα από ασθενείς με βακτηριακές λοιμώξεις. Σε αυτά θα πρέπει να προσδιοριστούν συγχρόνως τα επίπεδα του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) και γνωστών και καθιερωμένων δεικτών φλεγμονής (πχ CRP, προκαλσιτονίνη), έτσι ώστε με την κατάλληλη στατιστική επεξεργασία να αξιολογηθεί η κλινική χρησιμότητα της ELISA.

5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alalamian-Matheis M, Chatta GS, Shurin MR, Huland E, Huland H, Shurin GV. Inhibition of dendritic cell generation and function by serum from prostate cancer patients: correlation with serum-free PSA. *Adv Exp Med Biol* 2007, 601:173-82
- Abi Abdallah DS, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. Mouse neutrophils are professional antigen presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol* 2011, 23:317-26
- Aguilera R, Saffie C, Tittarelli A, González FE, Ramírez M, Reyes D et al. Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2011, 17:2474-83
- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 2012, 30:459-89
- Arvidsson C, Hallén A, Bäckhed F. Generating and Analyzing Germ-Free Mice. *Current Protocols in Mouse Biology* 2012, 2: 307-16
- Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 1993, 341:515-18
- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009, 27:669-92
- Basu S, Hodgson G, Katz M, Dunn AR. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood* 2002, 100:854-61
- Baxevanis CN, Frillingos S, Seferiadis K, Reclos GJ, Arsenis P, Katsiyiannis A et al. Enhancement of human T lymphocyte function by prothymosin alpha: increased production of interleukin-2 and expression of interleukin-2 receptors in normal human peripheral blood T lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1990, 12:595-617
- Baxevanis CN, Thanos D, Reclos GJ, Anastasopoulos E, Tsokos GC, Papamatheakis J et al. Prothymosin alpha enhances human and murine MHC class II surface antigen expression and messenger RNA accumulation. *J Immunol* 1992, 148:1979-84
- Baxevanis CN, Reclos GJ, Papamichail M. Prothymosin alpha restores depressed allogeneic cell-mediated lympholysis and natural-killer-cell activity in patients with cancer. *Int J Cancer* 1993, 53:264-68
- Baxevanis CN, Gritzapis AD, Dedoussis GV, Papadopoulos NG, Tsolas O, Papamichail M. Induction of lymphokine-activated killer activity in mice by prothymosin alpha. *Cancer Immunol Immunother* 1994, 38:281-86
- Baxevanis CN, Gritzapis AD, Spanakos G, Tsitsilonis OE, Papamichail M. Induction of tumor-specific T lymphocyte responses in vivo by prothymosin alpha. *Cancer Immunol Immunother* 1995, 40:410-18
- Baxevanis CN, Spanakos G, Voutsas IF, Gritzapis AD, Tsitsilonis OE, Mamalaki A et al. Increased generation of autologous tumor-reactive lymphocytes by anti-CD3 monoclonal antibody and prothymosin alpha. *Cancer Immunol Immunother* 1999, 48:71-84
- Baxevanis CN, Gritzapis AD, Tsitsilonis OE, Katsoulas HL, Papamichail M. HER-2/neu-derived peptide

epitopes are also recognized by cytotoxic CD3(+) CD56(+) (natural killer T) lymphocytes. *Int J Cancer* 2002, 98:864-72

Beauvillain C, Cunin P, Doni A, Scotet M, Jaillon S, Loiry ML et al. CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood* 2011, 117:1196-204

Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 2006, 16:401-07

Bertos NR, Park M. Breast cancer-one term, many entities? *J Clin Invest* 2011, 121:3789-96

Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007, 81:1-5

Bloos F, Reinhart K. Rapid diagnosis of sepsis. *Virulence* 2014, 5:154-60

Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010, 33:657-70

Boudaly S. Activation of dendritic cells by polymorphonuclear neutrophils. *Front Biosci* 2009, 14:1589-95

Brennan MA, Cookson BT. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* 2000, 38:31-40

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004, 303:1532-35

Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 2012, 119:5640-49

Bugl S, Wirths S, Müller MR, Radsak MP, Kopp HG. Current insights into neutrophil homeostasis. *Ann N Y Acad Sci* 2012, 1266:171-78

Bunce CM, Fisher AG, Toksoz D, Brown G. Isolation and characterisation of dimethylsulphoxide resistant variants from the human promyeloid cell line HL-60. *Exp Hematol* 1983, 11:828-33

Burdette DL, Yarbrough ML, Orvedahl A, Gilpin CJ, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and then cell lysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:12497-502

Butler GS, Overall CM. Proteomic identification of multitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting. *Nat Rev Drug Discov* 2009, 8:935-48

Cannavo A, Rengo G, Liccardo D, Pironti G, Scimia MC, Scudiero L et al. Prothymosin alpha protects cardiomyocytes against ischemia-induced apoptosis via preservation of Akt activation. *Apoptosis* 2013, 18:1252-61

Carey KA, Segal D, Klein R, Sanigorski A, Walder K, Collier GR et al. Identification of novel genes expressed during rhabdomyosarcoma differentiation using cDNA microarrays. *Pathol Int* 2006, 56:246-55

Chang HH, Oh PY, Ingber DE, Huang S. Multistable and multistep dynamics in neutrophil differentiation. *BMC Cell Biol* 2006, 7:11

Changelian PS, Jack RM, Collins LA, Fearon DT. PMA induces the ligand-independent internalization of CR1 on human neutrophils. *J Immunol* 1985, 134:1851-58

- Choi KY, Chow LN, Mookherjee N. Cationic host defence peptides: multifaceted role in immune modulation and inflammation. *J Innate Immun* 2012, 4:361-70
- Christ-Crain M, Schuetz P, Huber AR, Müller B. Procalcitonin-importance for the diagnosis of bacterial infections. *Ther Umsch* 2008, 65:559-68
- Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM et al. Platelet TLR-4 activates neutrophils extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007, 13:463-69
- Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture. *Nature* 1977, 270:347-49
- Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978, 75:2458-62
- Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 1987, 70:1233-44
- Cordero OJ, Sarandeses CS, López JL, Nogueira M. Prothymosin alpha enhances human natural killer cell cytotoxicity: role in mediating signals for NK activity. *Lymphokine Cytokine Res* 1992, 11:277-85
- Costopoulou D, Leondiadis L, Czarnecki J, Ferderigos N, Ithakissios DS, Livaniou E et al. Direct ELISA method for the specific determination of prothymosin alpha in human specimens. *J Immunoassay* 1998, 19:295-316
- Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 2008, 112:935-45
- Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 2005, 307:1630-34
- Dinarelli CA. Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis* 1999, 179:S294-S304
- Dominguez F, Magdalena C, Cancio E, Roson E, Paredes J, Loidi L et al. Tissue concentrations of prothymosin alpha: a novel proliferation index of primary breast cancer. *Eur J Cancer* 1993, 29A:893-97
- Eckert K, Garbin F, Maurer HR, Büttner P, Garbe C, Czarnecki J. Prothymosin alpha 1 modulates lymphokine-activated killer cell activity and IL-2 production by peripheral blood lymphocytes from melanoma patients in vitro. *Int J Immunopharmacol* 1995, 17:555-61
- Eckert K, Grünberg E, Immenschuh P, Garbin F, Kreuser ED, Maurer HR. Interleukin-2-activated killer cell activity in colorectal tumor patients: evaluation of in vitro effects by prothymosin alpha1. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997a, 123:420-28
- Eckert K, Grünberg E, Garbin F, Maurer HR. Preclinical studies with prothymosin alpha1 on mononuclear cells from tumor patients. *Int J Immunopharmacol* 1997b, 19:493-500
- Eilers M, Schirm S, Bishop JM. The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J* 1991, 10:133-41
- El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol* 2008, 30:279-89

- Eljaszewicz A, Wiese M, Helmin-Basa A, Jankowski M, Gackowska L, Kubiszewska I et al. Collaborating with the enemy: function of macrophages in the development of neoplastic disease. *Mediators Inflamm* 2013, 2013:831387
- Elkord E, Williams PE, Kynaston H, Rowbottom AW. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology* 2005, 114:204-12
- Emmanouilidou A, Karetsoy Z, Tzima E, Kobayashi T, Papamarcaki T. Knockdown of prothymosin α leads to apoptosis and developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem Cell Biol* 2013, 91:325-32
- Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971, 8:871-74
- Enkemann SA, Ward RD, Berger SL. Mobility within the nucleus and neighboring cytosol is a key feature of prothymosin- α . *J Histochem Cytochem* 2000a, 48:1341-55
- Enkemann SA, Wang RH, Trumbore MW, Berger SL. Functional discontinuities in prothymosin α caused by caspase cleavage in apoptotic cells. *J Cell Physiol* 2000b, 182:256-68
- Eschenfeldt WH, Berger SL. The human prothymosin alpha gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: evidence using a cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83:9403-07
- Evstafieva AG, Belov GA, Kalkum M, Chichkova NV, Bogdanov AA, Agol VI et al. Prothymosin alpha fragmentation in apoptosis. *FEBS Lett* 2000, 467:150-54
- Evstafieva AG, Belov GA, Rubstov YP, Kalkum M, Joseph B, Chichkova NV et al. Apoptosis-related fragmentation, translocation, and properties of human prothymosin alpha. *Exp Cell Res* 2003, 284:211-23
- Ferrara D, Pariante P, Di Matteo L, Serino I, Oko R, Minucci S. First evidence of prothymosin α localization in the acrosome of mammalian male gametes. *J Cell Physiol* 2013, 228:1629-37
- Filardy AA, Pires DR, Nunes MP, Takiya CM, Freire-de-Lima CG, Ribeiro-Gomes FL et al. Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12^{low}IL-10^{high} regulatory phenotype in macrophages. *J Immunol* 2010, 185:2044-50
- Fingerle-Rowson G, Auers J, Kreuzer E, Fraunberger P, Blumenstein M, Ziegler-Heitbrock LH. Expansion of CD14⁺CD16⁺ monocytes in critically ill cardiac surgery patients. *Inflammation* 1998, 22:367-79
- Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol* 2012, 8:viii6-9
- Fleck RA, Romero-Steiner S, Nahm MH. Use of HL-60 cell line to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005, 12:19-27
- Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 2006, 311:83-87
- Fraga M, García-Caballero T, Domínguez F, Pérez-Becerra E, Beiras A, Forteza J. Immunohistochemical location of prothymosin alpha in regenerating human hepatocytes and hepatocellular carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993, 423:449-52
- François M, Le Cabec V, Dupont MA, Sansonetti PJ, Maridonneau-Parini I. Induction of necrosis in human

- neutrophils by *Shigella flexneri* requires type III secretion, IpaB and IpaC invasins, and actin polymerization. *Infect Immun* 2000, 68:1289-96
- Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 2012, 33:949-55
- Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 1998, 201:1203-09
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007, 176:231-41
- Garbin F, Eckert K, Büttner P, Garbe C, Maurer HR. Prothymosin alpha augments deficient antitumor activity of monocytes from melanoma patients in vitro. *Anticancer Res* 1994, 14:2405-11
- Garbin F, Eckert K, Immenschuh P, Kreuser ED, Maurer HR. Prothymosin alpha 1 effects, in vitro, on the antitumor activity and cytokine production of blood monocytes from colorectal tumor patients. *Int J Immunopharmacol* 1997, 19:323-32
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003, 19:71-82
- Goldstein AL, Slater FD, White A. Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966, 56:1010-17
- Goldstein AL. History of the discovery of the thymosins. *Ann N Y Acad Sci* 2007, 1112:1-13
- Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 2001a, 69:11-20
- Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H, Ernst M. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64+/CD16+ blood monocytes. *Eur J Immunol* 2001b, 31:48-56
- Granot Z, Henke E, Comen EA, King TA, Norton L, Benezra R. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell* 2011, 20:300-14
- Halder SK, Ueda H. Regional distribution and cell type-specific subcellular localization of Prothymosin alpha in brain. *Cell Mol Neurobiol* 2012, 32:59-66
- Halder SK, Matsunaga H, Ueda H. Neuron-specific non-classical release of prothymosin alpha: a novel neuroprotective damage-associated molecular patterns. *J Neurochem* 2012, 123:262-75
- Halder SK, Matsunaga H, Yamaguchi H, Ueda H. Novel neuroprotective action of prothymosin α -derived peptide against retinal and brain ischemic damages. *J Neurochem* 2013a, 125:713-23
- Halder SK, Sugimoto J, Matsunaga H, Ueda H. Therapeutic benefits of 9-amino acid peptide derived from prothymosin alpha against ischemic damages. *Peptides* 2013b, 43:68-75
- Haritos AA, Goodall GJ, Horecker BL. Prothymosin alpha: isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin alpha 1 in rat thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, 81:1008-11
- Haritos AA, Horecker BL. A radioimmunoassay for thymosin alpha 1 that detects the native polypeptide, prothymosin alpha. *J Immunol Methods* 1985, 81:199-205
- Haritos AA. Alpha-thymosins: relationships in structure, distribution, and function. *Isozymes Curr Top Biol*

Med Res 1987, 14:123-52

Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003, 102:2660-69

Heidecke H, Eckert K, Schulze-Foster K, Maurer HR. Prothymosin alpha effects in vitro on chemotaxis, cytotoxicity and oxidative response of neutrophils from melanoma, colorectal and breast tumor patients. *Int J Immunopharmacol* 1997, 19:413-20

Hicks AM, Willingham MC, Du W, Pang CS, Old LJ, Cui Z. Effector mechanisms of the anti-cancer immune responses of macrophages in SR/CR mice. *Cancer Immun* 2006, 6:11

Hilbi H, Zychlinsky A, Sansonetti PJ. Macrophage apoptosis in microbial infections. *Parasitology* 1997, 115 Suppl:S79-87

Hooper JA, McDaniel MC, Thurman GB, Cohen GH, Schulof RS, Goldstein AL. Purification and properties of bovine thymosin. *Ann N Y Acad Sci* 1975, 249:125-44

Horelt A, Belge KU, Steppich B, Prinz J, Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺CD16⁺ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *Eur J Immunol* 2002, 32:1319-27

Horst SA, Linnér A, Beineke A, Lehne S, Höltje C, Hecht A et al. Prognostic value and therapeutic potential of TREM-1 in *Streptococcus pyogenes*- induced sepsis. *J Innate Immun* 2013, 5:581-90

Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE et al. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med* 2010, 16:219-23

Ioannou K, Samara P, Livaniou E, Derhovanessian E, Tsitsilonis OE. Prothymosin alpha: a ubiquitous polypeptide with potential use in cancer diagnosis and therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2012, 61:599-614

Ioannou K, Derhovanessian E, Tsakiri E, Samara P, Kalbacher H, Voelter W et al. Prothymosin α and a prothymosin α -derived peptide enhance T(H)1-type immune responses against defined HER-2/neu epitopes. *BMC Immunol* 2013, 14:43

Iványi B, Béres BJ, Szabó D. Recent advances in sepsis research: novel biomarkers and therapeutic targets. *Curr Med Chem* 2011, 18:3211-25

Jaeger BN, Donadieu J, Cognet C, Bernat C, Ordonez-Rueda D, Barlogis V et al. Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med* 2012, 209:565-80

Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordmark M, Lundbeck F, von der Maase H. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2009, 27:4709-17

Ji H, Houghton AM, Mariani TJ, Perera S, Kim CB, Padera R et al. K-ras activation generates an inflammatory response in lung tumors. *Oncogene* 2006, 25:2105-12

Jiang X, Kim HE, Shu H, Zhao Y, Zhang H, Kofron J et al. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science* 2003, 299:223-26

Joly AL, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun* 2010, 2:238-47

Jou YC, Tung CL, Tsai YS, Shen CH, Syue-Yi C, Shiao AL et al. Prognostic relevance of prothymosin-alpha

- expression in human upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology* 2009, 74:951-57
- Jou YC, Tsai YS, Hsieh HY, Chen SY, Tsai HT, Chen KJ et al. Plasma thymosin- α 1 level as a potential biomarker in urothelial and renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2013, 31:1806-11
- Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 2013, 38:209-23
- Karapetian RN, Evstafieva AG, Abaeva IS, Chichkova NV, Filonov GS, Rubtsov YP et al. Nuclear oncoprotein prothymosin alpha is a partner of Keap1: implications for expression of oxidative stress-protecting genes. *Mol Cell Biol* 2005, 25:1089-99
- Karetsou Z, Kretsovali A, Murphy C, Tsolas O, Papamarcaki T. Prothymosin alpha interacts with the CREB-binding protein and potentiates transcription. *EMBO Rep* 2002, 3:361-66
- Karlsson S, Pettilä V, Tenhunen J, Laru-Sompa R, Hynninen M, Ruokonen E. HMGB1 as a predictor of organ dysfunction and outcome in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 2008, 34:1046-53
- Karzai W, Oberhoffer M, Meier-Hellmann A, Reinhart K. Procalcitonin-a new indicator of the systemic response to severe infections. *Infection* 1997, 25:329-34
- Kashat L, So AK, Masui O, Wang XS, Cao J, Meng X et al. Secretome-based identification and characterization of potential biomarkers in thyroid cancer. *J Proteome Res* 2010, 9:5757-69
- Kaur J, Matta A, Kak I, Srivastava G, Assi J, Leong I et al. S100A7 overexpression is a predictive marker for high risk of malignant transformation in oral dysplasia. *Int J Cancer* 2014, 134:1379-88
- Kawashima Y, Fukutomi T, Tomonaga T, Takahashi H, Nomura F, Maeda T et al. High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples. *J Proteome Res* 2010, 9:1694-705
- Kenzaka T, Okayama M, Kuroki S, Fukui M, Yahata S, Hayashi H et al. Use of a semiquantitative procalcitonin kit for evaluating severity and predicting mortality in patients with sepsis. *Int J Gen Med* 2012, 5:483-88
- Kim D, Haynes CL. Neutrophil chemotaxis within a competing gradient of chemoattractants. *Anal Chem* 2012, 84:6070-78
- Klein JJ, Goldstein AL, White A. Enhancement of in vivo incorporation of labeled precursors into DNA and total protein of mouse lymph nodes after administration of thymic extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1965, 53:812-17
- Klimentzou P, Paravatou-Petsotas M, Zikos C, Beck A, Skopeliti M, Czarnecki J et al. Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha. *Peptides* 2006, 27:183-93
- Klimentzou P, Drougou A, Fehrenbacher B, Schaller M, Voelter W, Barbatis C et al. Immunocytological and preliminary immunohistochemical studies of prothymosin alpha, a human cancer-associated polypeptide, with a well-characterized polyclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 2008, 56:1023-31
- Klink M, Jastrzemska K, Nowak M, Bednarska K, Szpakowski M, Szylo K et al. Ovarian cancer cells modulate human blood neutrophils response to activation in vitro. *Scand J Immunol* 2008, 68:328-36
- Kobayashi SD, Voyich JM, Whitney AR, DeLeo FR. Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell

survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *J Leukoc Biol* 2005, 78:1408-18

Koga Y, Matsuzaki A, Suminoe A, Hattori H, Hara T. Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils. *Cancer Res* 2004, 64:1037-43

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975, 256:495-97

Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013, 13:159-75

Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004, 4:181-89

Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007, 449:564-69

Lang S, Lauffer L, Clausen C, Löhr I, Schmitt B, Hölzel D et al. Impaired monocyte function in cancer patients: restoration with a cyclooxygenase-2 inhibitor. *FASEB J* 2003, 17:286-88

Lay MM, Karsani SA, Abd Malek SN. Induction of Apoptosis of 2,4',6-Trihydroxybenzophenone in HT-29 Colon Carcinoma Cell Line. *Biomed Res Int* 2014, 2014:468157

Le Cabec V, Calafat J, Borregaard N. Sorting of the specific granule protein, NGAL, during granulocytic maturation of HL-60 cells. *Blood* 1997, 89:2113-21

Lee CY, Herant M, Heinrich V. Target-specific mechanics of phagocytosis: protrusive neutrophil response to zymosan differs from the uptake of antibody-tagged pathogens. *J Cell Sci* 2011, 124:1106-14

Letsas KP, Vartholomatos G, Tsepi C, Tsatsoulis A, Frangou-Lazaridis M. Fine-needle aspiration biopsy-RT-PCR expression analysis of prothymosin alpha and parathymosin in thyroid: novel proliferation markers? *Neoplasma* 2007, 54:57-62

Lexmond W, der Mee Jv, Ruiter F, Platzer B, Stary G, Yen EH et al. Development and validation of a standardized ELISA for the detection of soluble Fc-epsilon-RI in human serum. *J Immunol Methods* 2011, 373:192-99

Leys CM, Nomura S, LaFleur BJ, Ferrone S, Kaminishi M, Montgomery E et al. Expression and prognostic significance of prothymosin-alpha and ERp57 in human gastric cancer. *Surgery* 2007, 141:41-50

Li KJ, Shiao AL, Chiou YY, Yo YT, Wu CL. Transgenic overexpression of prothymosin alpha induces development of polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2005, 67:1710-22

Liang Y, Li X, Zhang X, Li Z, Wang L, Sun Y et al. Elevated levels of plasma TNF- α are associated with microvascular endothelial dysfunction in patients with sepsis through activating the NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase in endothelial cells. *Shock* 2014, in press

Loidi L, Vidal A, Zalvide JB, Puente JL, Reyes F, Domínguez F. Development of ELISA to estimate thymosin alpha1, the N terminus of prothymosin alpha, in human tumors. *Clin Chem* 1997, 43:59-63

López-Rodríguez JL, Cordero OJ, Sarandeses C, Viñuela J, Nogueira M. Interleukin-2 killer cells: in vitro evaluation of combination with prothymosin alpha. *Lymphokine Cytokine Res* 1994, 13:175-82

Lu J, Marjon KD, Mold C, Du Clos TW, Sun PD. Pentraxins and Fc receptors. *Immunol Rev* 2012, 250:230-38

- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997, 15:323-50
- Magdalena C, Dominguez F, Loidi L, Puente JL. Tumour prothymosin alpha content, a potential prognostic marker for primary breast cancer. *Br J Cancer* 2000, 82:584-90
- Manrow RE, Sburlati AR, Hanover JA, Berger SL. Nuclear targeting of prothymosin alpha. *J Biol Chem* 1991, 266:3916-24
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011, 11:519-31
- Mathis D, Benoist C. Back to central tolerance. *Immunity* 2004, 20:509-16
- Matsunaga H, Ueda H. Stress-induced non-vesicular release of prothymosin- α initiated by an interaction with S100A13, and its blockade by caspase-3 cleavage. *Cell Death Differ* 2010, 17:1760-72
- Mayadas TN, Rosetti F, Hernandez T, Sethi S. Neutrophils: game changers in glomerulonephritis? *Trends Mol Med* 2010, 16:368-78
- Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* 2014, 9:181-218
- Mendonça MA, Cunha FQ, Murta EF, Tavares-Murta BM. Failure of neutrophil chemotactic function in breast cancer patients treated with chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006, 57:663-70
- Michalopoulos A, Falagas ME, Karatza DC, Alexandropoulou P, Papadakis E, Gregorakos L et al. Epidemiologic, clinical characteristics, and risk factors for adverse outcome in multiresistant gram-negative primary bacteremia of critically ill patients. *Am J Infect Control* 2011, 39:396-400
- Miller JF. Role of the thymus in immunity. *Br Med J* 1963, 2:459-64
- Mizuno K, Toma T, Tsukiji H, Okamoto H, Yamazaki H, Ohta K et al. Selective expansion of CD16^{high}CCR2⁻ subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin Exp Immunol* 2005, 142:461-70
- Moody TW, Leyton J, Zia F, Tuthill C, Badamchian M, Goldstein AL. Thymosinalpha1 is chemopreventive for lung adenoma formation in A/J mice. *Cancer Lett* 2000, 155:121-27
- Moreira D, Díaz-Jullien C, Sarandeses CS, Covelo G, Barbeito P, Freire M. The influence of phosphorylation of prothymosin α on its nuclear import and antiapoptotic activity. *Biochem Cell Biol* 2013, 91:265-69
- Mori M, Barnard GF, Staniunas RJ, Jessup JM, Steele GD Jr, Chen LB. Prothymosin-alpha mRNA expression correlates with that of c-myc in human colon cancer. *Oncogene* 1993, 8:2821-26
- Mosoian A, Teixeira A, Burns CS, Sander LE, Gusella GL, He C et al. Prothymosin-alpha inhibits HIV-1 via Toll-like receptor 4-mediated type I interferon induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107:10178-83
- Müller B, Becker KL. Procalcitonin: how a hormone became a marker and mediator of sepsis. *Swiss Med Wkly* 2001, 131:595-602
- Muller WA. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol* 2013, 50:7-22

- Ngai PK, Ackermann F, Wendt H, Savoca R, Bosshard HR. Protein A antibody-capture ELISA (PACE): an ELISA format to avoid denaturation of surface-adsorbed antigens. *J Immunol Methods* 1993, 158: 267-76
- Nijsten MW, Olinga P, The TH, de Vries EG, Koops HS, Groothuis GM et al. Procalcitonin behaves as a fast responding acute phase protein in vivo and in vitro. *Crit Care Med* 2000, 28:458-61
- Niture SK, Jaiswal AK. Prothymosin-alpha mediates nuclear import of the INrf2/Cul3 Rbx1 complex to degrade nuclear Nrf2. *J Biol Chem* 2009, 284:13856-68
- Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol* 2011, 90:271-84
- Ojima E, Inoue Y, Miki C, Mori M, Kusunoki M. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal cancer to preoperative radiotherapy. *J Gastroenterol* 2007, 42:730-36
- Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 1998, 160:4587-95
- Pan LX, Haritos AA, Wideman J, Komiyama T, Chang M, Stein S et al. Human prothymosin alpha: amino acid sequence and immunologic properties. *Arch Biochem Biophys* 1986, 250:197-201
- Panneerselvam C, Haritos AA, Caldarella J, Horecker BL. Prothymosin alpha in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, 84:4465-69
- Papamarcaki T, Tsolas O. Prothymosin alpha binds to histone H1 in vitro. *FEBS Lett* 1994, 345:71-75
- Papanastasiou M, Baxevanis CN, Papamichail M. Promotion of murine antitumor activity by prothymosin alpha treatment: I. Induction of tumoricidal peritoneal cells producing high levels of tumour necrosis factor alpha. *Cancer Immunol Immunother* 1992, 35:145-50
- Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 2009, 30:513-21
- Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2010, 191:677-91
- Parker LC, Whyte MK, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol* 2005, 77:886-92
- Pavlov NA, Cherny DI, Heim G, Jovin TM, Subramaniam V. Amyloid fibrils from the mammalian protein prothymosin alpha. *FEBS Lett* 2002, 517:37-40
- Pawlikowski M, Winczyk K. Immunohistochemical detection of prothymosin alpha in pituitary adenomas-a new marker of tumor recurrence? *Folia Histochem Cytobiol* 2009, 47:559-62
- Pérez-Estévez A, Díaz-Jullien C, Covelo G, Salgueiro MT, Freire M. A 180-kDa protein kinase seems to be responsible for the phosphorylation of prothymosin alpha observed in proliferating cells. *J Biol Chem* 1997, 272:10506-13
- Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA et al. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 2010a, 116:625-27
- Pillay J, Ramakers BP, Kamp VM, Loi AL, Lam SW, Hietbrink F et al. Functional heterogeneity and differential

- priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J Leukoc Biol* 2010b, 88:211-20
- Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Investig* 2012, 122:327-36
- Piñeiro A, Cordero OJ, Nogueira M. Fifteen years of prothymosin alpha: contradictory past and new horizons. *Peptides* 2000, 21:1433-46
- Qi X, Wang L, Du F. Novel small molecules relieve prothymosin alpha-mediated inhibition of apoptosome formation by blocking its interaction with Apaf-1. *Biochemistry* 2010, 49:1923-30
- Rabiet MJ, Huet E, Boulay F. The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: an overview. *Biochimie* 2007, 89:1089-106
- Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol* 2004, 5:617-25
- Ribeiro C, Brehelin M. Insect haemocytes: What type of cell is that? *J Insect Physiol* 2006, 52:417-29
- Rødgaard-Hansen S, Rafique A, Christensen PA, Maniecki MB, Sandahl TD, Nexø E et al. A soluble form of the macrophage-related mannose receptor (MR/CD206) is present in human serum and elevated in critical illness. *Clin Chem Lab Med* 2014, 52:453-61
- Rolston KV, Bodey GP, Safdar A. Polymicrobial infection in patients with cancer: an underappreciated and underreported entity. *Clin Infect Dis* 2007, 45:228-33
- Rubtsov YP, Zolotukhin AS, Vorobjev IA, Chichkova NV, Pavlov NA, Karger EM et al. Mutational analysis of human prothymosin alpha reveals a bipartite nuclear localization signal. *FEBS Lett* 1997, 413:135-41
- Salgado FJ, Piñeiro A, Canda-Sánchez A, Lojo J, Nogueira M. Prothymosin alpha-receptor associates with lipid rafts in PHA-stimulated lymphocytes. *Mol Membr Biol* 2005, 22:163-76
- Samara P, Ioannou K, Neagu M, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Voelter W et al. The C-terminal decapeptide of prothymosin α is responsible for its stimulatory effect on the functions of human neutrophils in vitro. *Int Immunopharmacol* 2013a, 15:50-57
- Samara P, Kalbacher H, Ioannou K, Radu DL, Livaniou E, Promponas VJ et al. Development of an ELISA for the quantification of the C-terminal decapeptide prothymosin α (100-109) in sera of mice infected with bacteria. *J Immunol Methods* 2013b, 395:54-62
- Sasaki H, Sato Y, Kondo S, Fukai I, Kiriya M, Yamakawa Y et al. Expression of the prothymosin alpha mRNA correlated with that of N-myc in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2001, 168:191-95
- Sasaki H, Nonaka M, Fujii Y, Yamakawa Y, Fukai I, Kiriya M et al. Expression of the prothymosin-a gene as a prognostic factor in lung cancer. *Surg Today* 2001, 31:936-38
- Scapini P, Bazzoni F, Cassatella MA. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunol Lett* 2008, 116:1-6
- Schulof RS. Thymic peptide hormones: basic properties and clinical applications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 1985, 3:309-76

Διδακτορική Διατριβή Π. Σαμαρά

Schymeinsky J, Mocsai A, Walzog B. Neutrophil activation via $\beta 2$ integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb Haemost* 2007, 98:262-73

Segal AW, Dorling J, Coade S. Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical and morphological studies. J Cell Biol* 1980, 85:42-59

Sesti F, Tsitsilonis OE, Kotsinas A, Trougakos IP. Oxidative stress-mediated biomolecular damage and inflammation in tumorigenesis. *In Vivo* 2012, 26:395-402

Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* 2005, 78:1025-42

Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2011, 11:762-74

Singer M. Biomarkers in sepsis. *Curr Opin Pulm Med* 2013, 19:305-09

Skopeliti M, Voutsas IF, Klimentzou P, Tsiatas ML, Beck A, Bamias A et al. The immunologically active site of prothymosin alpha is located at the carboxy-terminus of the polypeptide. Evaluation of its in vitro effects in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2006, 55:1247-57

Skopeliti M, Kratzer U, Altenberend F, Panayotou G, Kalbacher H, Stevanovic et al. Proteomic exploitation on prothymosin alpha-induced mononuclear cell activation. *Proteomics* 2007, 7:1814-24

Skopeliti M, Iconomidou VA, Derhovanessian E, Pawelec G, Voelter W, Kalbacher H et al. Prothymosin alpha immunoactive carboxyl-terminal peptide TKKQKTDEDD stimulates lymphocyte reactions, induces dendritic cell maturation and adopts a beta-sheet conformation in a sequence-specific manner. *Mol Immunol* 2009, 46:784-92

Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 2008, 67:152-59

Soehnlein O, Weber C, Lindbom L. Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol* 2009, 30:538-46

Sporri R, Joller N, Hilbi H, Oxenius A. A novel role for neutrophils as critical activators of NK cells. *J Immunol* 2008, 181:7121-30

Stika J, Vondráček J, Hofmanová J, Simek V, Kozubík A. MK-886 enhances tumour necrosis factor-alpha-induced differentiation and apoptosis. *Cancer Lett* 2006, 237:263-71

Stossel TP, Babior BM. Structure function and functional disorders of the phagocyte system. In: Handin RI, Lux SE, Stossel TP, eds. *Blood: Principle and Practice of Hematology*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Lippincott; 2003:531-68

Su BH, Tseng YL, Shieh GS, Chen YC, Shiang YC, Wu P et al. Prothymosin α overexpression contributes to the development of pulmonary emphysema. *Nat Commun* 2013, 4:1906

Subramanian C, Hasan S, Rowe M, Hottiger M, Orre R, Robertson ES. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. *J Virol* 2002, 76:4699-08

Sukhacheva EA, Evstafieva AG, Fateeva TV, Shakulov VR, Efimova NA, Karapetian RN et al. Sensing

- prothymosin alpha origin, mutations and conformation with monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 2002, 266: 185-96
- Suzuki S, Takahashi S, Takahashi S, Takeshita K, Hikosaka A, Wakita T et al. Expression of prothymosin alpha is correlated with development and progression in human prostate cancers. *Prostate* 2006, 66:463-69
- Swain SD, Rohn TT, Quinn MT. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid Redox Signal* 2002, 4:69-83
- Szabo P, Panneerselvam C, Clinton M, Frangou-Lazaridis M, Weksler D, Whittington E et al. Prothymosin alpha gene in humans: organization of its promoter region and localization to chromosome 2. *Hum Genet* 1993, 90:629-34
- Szuster-Ciesielska A, Hryciuk-Umer E, Stepulak A, Kupisz K, Kandefier-Szerszeń M. Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. *Acta Oncol* 2004, 43:252-58
- Tacke F, Ginhoux F, Jakubzick C, van Rooijen N, Merad M, Randolph GJ. Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J Exp Med* 2006, 203:583-97
- Talha SM, Hytönen J, Westhorpe A, Kumar S, Khanna N, Pettersson K. Europium nanoparticle-based high performing immunoassay for the screening of treponemal antibodies. *PLoS One* 2013, 8:e84050
- Tian Y, Tao T, Zhu J, Zou Y, Wang J, Li J et al. Soluble tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand level as a predictor of severity of sepsis and the risk of mortality in septic patients. *PLoS One* 2013, 8:e82204
- Timmer AM, Timmer JC, Pence MA, Hsu LC, Ghochani M, Frey TG et al. Streptolysin O promotes group A Streptococcus immune evasion by accelerated macrophage apoptosis. *J Biol Chem* 2009, 284:862-71
- Trellakis S, Farjah H, Bruderek K, Dumitru CA, Hoffmann TK, Lang S et al. Peripheral blood neutrophil granulocytes from patients with head and neck squamous cell carcinoma functionally differ from their counterparts in healthy donors. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011, 24:683-93
- Tripathi SC, Matta A, Kaur J, Grigull J, Chauhan SS, Thakar A et al. Overexpression of prothymosin alpha predicts poor disease outcome in head and neck cancer. *PLoS One* 2011, 6:e19213
- Tsai LY, Tung JN, Liu TZ. Distinct differences in the induction of stimulus-mediated superoxide generation by polymorphonuclear neutrophils isolated from patients with different types of leukemia. *J Formos Med Assoc* 2008, 107:513-18
- Tsai YS, Jou YC, Lee GF, Chen YC, Shiao AL, Tsai HT et al. Aberrant prothymosin-alpha expression in human bladder cancer. *Urology* 2009, 73:188-92
- Tsitsiloni OE, Stiakakis J, Koutselinis A, Gogas J, Markopoulos C, Yialouris P et al. Expression of alpha-thymosins in human tissues in normal and abnormal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90:9504-07
- Tsitsiloni OE, Heimer E, Felix A, Yialouris PP, Vamvoukakis J, Voelter W et al. Radioimmunoassays for the C-terminus of prothymosin alpha and the N-terminus of parathymosin alpha for the measurement of the levels of alpha-thymosins in human cancer. *J Immunol Methods* 1994, 169:163-71
- Tsitsilonis OE, Bekris E, Voutsas IF, Baxevanis CN, Markopoulos C, Papadopoulou SA et al. The prognostic value of alpha-thymosins in breast cancer. *Anticancer Res* 1998, 18:1501-08

- Tzai TS, Tsai YS, Shiau AL, Wu CL, Shieh GS, Tsai HT. Urine prothymosin-alpha as novel tumor marker for detection and follow-up of bladder cancer. *Urology* 2006, 67:294-99
- Tzouvelekis LS, Miriagou V, Kotsakis SD, Spyridopoulou K, Athanasiou E, Karagouni E et al. KPC-producing, multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 as a typical opportunistic pathogen. *Antimicrob Agents Chemother* 2013, 57:5144-46
- Ueda H, Matsunaga H, Uchida H, Ueda M. Prothymosin alpha as robustness molecule against ischemic stress to brain and retina. *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1194:20-26
- Ueha S, Shand FH, Matsushima K. Myeloid cell population dynamics in healthy and tumor-bearing mice. *Int Immunopharmacol* 2011, 11:783-88
- Ulett GC, Ketheesan N, Hirst RG. Cytokine gene expression in innately susceptible BALB/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during infection with virulent *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun* 2000, 68:2034-42
- Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* 2002, 366:689-704
- Voutsas IF, Baxevanis CN, Gritzapis AD, Missitzis I, Stathopoulos GP, Archodakis G et al. Synergy between interleukin-2 and prothymosin alpha for the increased generation of cytotoxic T lymphocytes against autologous human carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 2000, 49:449-58
- Voutsas IF, Pistamaltzian N, Tsiatas ML, Skopeliti M, Katsila T, Mavrothalassiti I et al. Ovarian malignant ascites-derived lymphocytes stimulated with prothymosin α or its immunoreactive decapeptide lyse autologous tumor cells in vitro and retard tumor growth in SCID mice. *Eur J Cancer* 2013, 49:1706-14
- Vuk-Pavlović S, Bulur PA, Lin Y, Qin R, Szumlanski CL, Zhao X et al. Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/- monocytes in prostate cancer. *Prostate* 2010, 70:443-55
- Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S et al. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol* 2007, 9:1162-71
- Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol* 2000, 67:699-704
- Williams R. Killing controversy. *J Exp Med* 2006, 203:2404
- Wilson CL, Monteith WB, Danell AS, Burns CS. Purification and characterization of the central segment of prothymosin-alpha: methodology for handling highly acidic peptides. *J Pept Sci* 2006, 12:721-25
- Wheeler MA, Smith SD, García -Cardeña G, Nathan CF, WeissRM, SessaWC. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J Clin Investig* 1997, 99:110-16
- Wu C, Habib N, Mitry R, Reitsma P, Vandeventer S, Chamuleau R. Increased hepatic ferritin-H messenger RNA levels correlate with those of c-myc in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 1997, 11:187-92
- Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 1960, 39:1157-75
- Yang D, de la Rosa G, Tewary P, Oppenheim JJ. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol* 2009, 30:531-37

Yang PY, Chen WX, Chang FY, Chen HW, Lin CH, Hsu YC et al. HepG2 cells infected with *Klebsiella pneumoniae* show DNA laddering at apoptotic and necrotic stages. *Apoptosis* 2012, 17:154-63

Yialouris PP, Evangelatos GP, Soteriadis-Vlahos C, Heimer EP, Felix AM, Tsitsiloni OE et al. The identification of prothymosin alpha-like material in vertebrate lymphoid organs by a radioimmunoassay for the N-terminal decapeptide. *J Immunol Methods* 1988, 106:267-75

Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* 2010, 17:53-59

Ziegler-Heitbrock HW. Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol* 2000, 67:603-06

Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010, 464:104-07

Ιωάννου Κ. Διερεύνηση του τρόπου παραγωγής και δράσης πεπτιδικών θραυσμάτων της προθυμοσίνης α: νέα ανοσοενισχυτικά μόρια των λεμφοκυτταρικών αποκρίσεων. Διδακτορική Διατριβή 2013

Καπά Ν, Williams E, Ιωάννου Κ, Σαμαρά Π, Τσιτσιλώνη Ο. Η προθυμοσίνη α ως καρκινικός βιοδείκτης και ανοσοθεραπευτικό μόριο. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2013, 30:406-19

6

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προΤα είναι πυρηνική πρωτεΐνη που εμπλέκεται σε κυτταρικές διεργασίες άρρηκτα συνδεδεμένες με την ανάπτυξη, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση. Συγκεκριμένα, κατά την απόπτωση, η προΤα υπόκειται σε θραύση από τις ενεργοποιημένες κασπάσες στο D⁹⁹ και παραμένει στο κυτταρόπλασμα. Συγχρόνως, παρουσιάζει πλειοτροπική εξωκυτταρική δράση, ενισχύοντας τις δραστηριότητες κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) αποτελεί το ανοσοδραστικό κέντρο της πρωτεΐνης και ο μηχανισμός ανοσολογικής δράσης τόσο της προΤα όσο και του προΤα(100-109) μεσολαβείται από τον TLR-4.

Οι στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής, οι οποίοι τέθηκαν με βάση τις παραπάνω πληροφορίες, είναι οι εξής:

- Η διερεύνηση της δράσης του προΤα(100-109) και της αέρας προΤα σε βασικές λειτουργίες κυττάρων του φυσικού σκέλους της ανοσίας που εκφράζουν TLR-4 και
- Η ανάπτυξη και αξιολόγηση ανοσοδοκιμασίας (ELISA) με τη χρήση αντισωμάτων υψηλής ειδικότητας, η οποία να επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό του προΤα(100-109) εξωκυτταρικά, προκειμένου να διαλευκανθεί ο τρόπος δράσης του.

Γνωρίζοντας ότι η προΤα σηματοδοτεί μέσω TLRs και συγκεκριμένα ότι προσδένεται στον TLR-4 σε μακροφάγα ποντικού και ωριμάζει τόσο η ίδια όσο και το προΤα(100-109) φαινοτυπικά ώριμα και λειτουργικά ανοσοϊκανά ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα, μελετήσαμε την *in vitro* επίδραση των δύο πεπτιδίων σε κύτταρα της φυσικής ανοσίας που εκφράζουν TLR-4. Επιλέξαμε να μελετήσουμε φαγοκύτταρα, δηλαδή ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα, από δείγματα περιφερικού αίματος υγιών δοτών και ασθενών με καρκίνο του μαστού. Μετά από ενεργοποίηση με το προΤα(100-109) ή την προΤα, προσδιορίστηκε η φαγοκυτταρική τους ικανότητα (ενσωμάτωση σωματιδίων zymosan), η ενδοκυτταρική παραγωγή υπεροξειδικού ανιόντος ($\cdot\text{O}_2^-$) (αναγωγή του NBT), η εξωκυτταρική απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$ (αναγωγή του κυτοχρώματος c) και η οξειδωτική έκρηξη (Bursttest). Παράλληλα, εκτιμήθηκε η κυτταροτοξική δράση των ουδετερόφιλων έναντι καρκινικών κυττάρων-στόχων με τη δοκιμασία απελευθέρωσης ^{51}Cr .

Η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων με προΤα(100-109) ή προΤα διπλασίασε τη φαγοκυτταρική τους ικανότητα, τετραπλασίασε την ενδοκυτταρική παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$ και αύξησε 1,5-2 φορές την εξωκυτταρική απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$, τόσο στους υγιείς δότες όσο και στους ασθενείς με καρκίνο. Η αύξηση της φαγοκυτταρικής ικανότητας των ουδετερόφιλων στους ασθενείς με καρκίνο, ήταν χαμηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη των υγιών δοτών,

καθώς ένα μεγάλο ποσοστό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων στους ασθενείς αυτούς είναι ανώριμα με χαμηλή φαγοκυτταρική ικανότητα. Αντίθετα, η παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$ από τα ουδετερόφιλα των καρκινοπαθών ήταν υψηλότερη από την αντίστοιχη των ουδετερόφιλων των υγιών, γεγονός που έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά και σε άλλους τύπους καρκίνου, ενώ αντίστοιχη εικόνα παρατηρήθηκε και στην εξωκυτταρική απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$. Συνολικά, και τα δύο μόρια επανέφεραν τις κατασταλμένες, λόγω της νόσου, λειτουργίες των ουδετερόφιλων των ασθενών με καρκίνο του μαστού στα φυσιολογικά επίπεδα των υγιών. Ως προς την κυτταροτοξικότητα, τόσο τα ουδετερόφιλα των υγιών όσο και των καρκινοπαθών εμφάνισαν μέτρια ικανότητα λύσης διάφορων καρκινικών σειρών, η οποία ενισχύθηκε από τα μελετώμενα μόρια κατά δύο περίπου φορές. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας Bursttest έδειξαν ότι το προΤα(100-109) και η προΤα ενίσχυσαν την οξειδωτική έκρηξη των απομονωμένων ουδετερόφιλων.

Η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων με προΤα(100-109) ή προΤα διπλασίασε τη φαγοκυτταρική τους ικανότητα, αύξησε κατά 2,5 φορές την ενδοκυτταρική παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$ και κατά 2 φορές την εξωκυτταρική απελευθέρωσή του, τόσο στους υγιείς δότες όσο και στους καρκινοπαθείς. Συγκρίνοντας τα ποσοστά αυτά με τα αντίστοιχα των ουδετερόφιλων, παρατηρούμε ότι κυμαίνονται σε παρόμοια επίπεδα όσον αφορά τη φαγοκυτταρική ικανότητα και την εξωκυτταρική απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$, ωστόσο τα ουδετερόφιλα ανέπτυξαν εντονότερες αναπνευστικές εκρήξεις από τα μονοκύτταρα.

Παράλληλα, για να διαλευκάνουμε τον τρόπο δράσης του δεκαπεπτιδίου, παράγαμε πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του προΤα(100-109) και αναπτύξαμε σύστημα ανταγωνιστικής ELISA ειδικής για το δεκαπεπτίδιο και αρκετά ευαίσθητης, ώστε να ανιχνεύει χαμηλές συγκεντρώσεις του στον ορό του περιφερικού αίματος.

Από τον πολυκλωνικό αντιορό απομονώθηκαν οι ειδικές για το δεκαπεπτίδιο IgG, ενώ έγινε κατακρήμνιση του ορού με ακετόνη προς απομάκρυνση των μεγαλομοριακών πρωτεϊνών. Στο πρωτόκολλο που τελικά αναπτύξαμε, προηγείται επίστρωση της μικροπλάκας με πρωτεΐνη A, η οποία προσδένει την Fc περιοχή των IgG. Παράλληλα, επωάζονται οι ειδικές για το δεκαπεπτίδιο IgG με βιοτινυλιωμένο και ελεύθερο προΤα(100-109) προς ανταγωνισμό. Το μίγμα μοιράζεται στην επιστρωμένη μικροπλάκα, και προστίθενται συζευγμένη με υπεροξειδάση στρεπταβιδίνη και διάλυμα ενζυμικού υποστρώματος ABTS. Η οπτική πυκνότητα μετρείται σε μετρητή ELISA στα 405 nm. Η ευαισθησία της αναπτυχθείσας ELISA ήταν από 10 $\mu\text{g/mL}$ έως 0,1 ng/mL προΤα(100-109), δεν παρουσίασε χιαστά διασταυρούμενη αντίδραση με άλλες θυμοσίνες ή την BSA, ενώ τα αντισώματα αναγνωρίζουν εξίσου καλά και την ακέραιη προΤα. Με την αναπτυχθείσα

ELISA, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου *in vitro* σε υπερκείμενα κυττάρων που οδηγήθηκαν σε κυτταρικό θάνατο, *in vivo* στον ορό ποντικών μολυσμένων με βακτήρια και *ex vivo* σε ανθρώπινους ορούς από φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις.

Στα *in vitro* πειράματα, για την επαγωγή απόπτωσης και νέκρωσης, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa τα οποία φυσιολογικά υπερεκφράζουν την προΤα. Τα ποσοστά των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας αννεξίνη V και ιωδιούχο προπίδιο (PI). Στην απόπτωση, ως βέλτιστες συνθήκες ορίστηκαν εκείνες κατά τις οποίες το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων HeLa βρισκόταν στο στάδιο της πρώιμης απόπτωσης (annexin+PI-). Η επώαση των κυττάρων με το συνδυασμό 5 ng/mL TNF-α και 1 μg/mL εμετίνη για 4 ώρες ήταν η βέλτιστη συνθήκη επαγωγής απόπτωσης, καθώς το 85,7% των κυττάρων HeLa χαρακτηρίστηκαν ως πρώιμα αποπτωτικά. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από διάφορες σειρές, καθώς και λευκοκυτταρικοί υποπληθυσμοί, απομονωμένοι από περιφερικό αίμα υγιών δοτών, τα οποία οδηγήθηκαν σε απόπτωση σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο. Τα υπερκείμενα των αποπτωτικών καλλιέργειών συλλέχθηκαν και ελέγχθηκαν με την αναπτυχθείσα ELISA. Το προΤα(100-109) ανιχνεύθηκε σε όλα τα αποπτωτικά υπερκείμενα, ενώ στα αντίστοιχα υπερκείμενα-μάρτυρες, η συγκέντρωσή του ήταν χαμηλή. Στη νέκρωση, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε 3 διαδοχικούς κύκλους ψύξης-απόψυξης ή επώαστηκαν με υψηλή συγκέντρωση δοξορουβικίνης (100 μg/mL). Στα νεκρωτικά υπερκείμενα, ανιχνεύθηκε ανοσοδραστικό υλικό, το οποίο πιθανόν αφορά την ακέραιη προΤα που απελευθερώνεται κατά τη ρήξη των κυττάρων και την οποία τα αντισώματα αναγνωρίζουν εξίσου καλά με το προΤα(100-109).

Σε επόμενο βήμα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του προΤα(100-109) στον ορό BALB/c και C57BL/6 ποντικών, με τα δεύτερα να θεωρούνται πιο ευαίσθητα στις λοιμώξεις, και τα οποία μολύνθηκαν με πέντε διαφορετικά είδη βακτηρίων (*Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Corynebacterium urealyticum*, *Pasteurella multocida* και *Klebsiella oxytoca*). Χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια από διαφορετικές εργαστηριακές συνθήκες: αυτά που μεγάλωσαν σε συμβατικές συνθήκες (conventional) και αυτά τα οποία δεν είχαν έρθει σε επαφή με κανένα παθογόνο από τη γέννησή τους (germ-free). Τα ποντίκια ενοφθαλμίστηκαν ενδοπεριτοναϊκά με μία δόση βακτηριακού εναιωρήματος (10^3 CFU/0,5 mL/ποντίκι) και συλλέχθηκε αίμα πριν τη μόλυνση, καθώς και 2, 24 και 72 ώρες μετά από αυτή.

Παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την ποσότητα του προΤα(100-109) που προσδιορίστηκε στον ορό των ζώων, ανάλογα με τη φυλή, τις εργαστηριακές συνθήκες διαβίωσης και το είδος του παθογόνου που τα μόλυνε. Γενικά, φάνηκε ότι τα επίπεδα του

προΤα(100-109) πριν τη μόλυνση είναι ελάχιστα, αυξήθηκαν σταδιακά με την πρόοδο της λοίμωξης και, για τα περισσότερα παθογόνα, κορυφώθηκαν στις 72 ώρες. Γνωρίζοντας ότι τα συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη προκαλούν μαζική απόπτωση μακροφάγων στα ζώα, θεωρούμε ότι μετά τον ενδοκυτταρικό κατακερματισμό της προΤα, το δεκαπεπτιδίο εξωκυτταρώνεται στον ορό, λειτουργώντας ως «σήμα κινδύνου». Με MALDI-TOF φασματομετρία μάζας, ανιχνεύθηκε κορυφή που αντιστοιχούσε στη μοριακή μάζα του δεκαπεπτιδίου μόνο στους ορούς των μολυσμένων με βακτήρια ποντικών, που αποτελεί ένδειξη της εξωκυτταρικής παρουσίας του προΤα(100-109).

Ως συνέχεια των μοντέλων αυτών, αναπτύξαμε ένα πιο επιθετικό μοντέλο θανατηφόρου σηψαιμίας, με τη χρήση δύο στελεχών *Klebsiella pneumoniae* σε ποντίκια της φυλής ICR. Το ένα στέλεχος είναι κλινικά απομονωμένο (L-78), χαμηλής μολυσματικότητας και ενδοκυτταρώνεται από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα του περιφερικού αίματος, ενώ το δεύτερο είναι πρότυπο στέλεχος (ATCC43816), υψηλής μολυσματικότητας και δεν ενδοκυτταρώνεται. Τα ποντίκια μολύνθηκαν ενδοπεριτοναϊκά και οι αιμοληψίες έγιναν πριν τη μόλυνση (0), 3, 6, 12, 24 και 48 ώρες μετά από αυτή. Στα ζώα που χορηγήθηκε το L-78 στέλεχος, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του προΤα(100-109), με τη μέγιστη ποσότητά του 48 ώρες μετά τη λοίμωξη. Στα ζώα που μολύνθηκαν με το στέλεχος ATCC43816, παρατηρήσαμε αυξομειώσεις στην ανιχνευθείσα συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου. Στην περίπτωση αυτή, λόγω της μη ενδοκυττάρωσης του βακτηρίου, ενεργοποιούνται πολλαπλά μονοπάτια θανάτου, κυρίως όμως νεκρωτικά, όπως φάνηκε από την ανάλυση των σπληνοκυττάρων των ζώων με κυτταρομετρία ροής, μετά από χρώση με αννεξίνη V/PI.

Τέλος, μετρήσαμε τα επίπεδα του προΤα(100-109) σε ανθρώπινους ορούς υγιών ατόμων, παιδιατρικών ασθενών και ασθενών της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ). Για πρώτη φορά, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του προΤα(100-109) σε ορό υγιών ατόμων και ήταν ιδιαίτερα χαμηλά (<1 ng/mL) και ανεξάρτητα από την ηλικία των δοτών. Τα δείγματα των παιδιών χωρίστηκαν σε 3 ομάδες: παιδιά με αυτοφλεγμονώδη νοσήματα και χαμηλή CRP, παιδιά με αυτοφλεγμονώδη νοσήματα και υψηλή CRP και παιδιά με λοιμώξεις. Οι ομάδες αυτές επελέγησαν προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η απελευθέρωση του προΤα(100-109) στον ορό είναι ειδική μόνο για συνθήκες μαζικής απόπτωσης των κυττάρων, όπως είναι η μόλυνση από βακτήρια και δε σχετίζεται με οποιαδήποτε φλεγμονώδη νόσο. Πράγματι, στα παιδιά με λοιμώξεις ανιχνεύθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις δεκαπεπτιδίου σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα των παιδιών με αυτοφλεγμονώδη νοσήματα, όπου η συγκέντρωση του προΤα(100-109) ήταν σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα. Τα δείγματα από τη ΜΕΘ ελήφθησαν

σειριακά από τη στιγμή της εισαγωγής του ασθενούς μέχρι την έξοδό του, ώστε να είναι αντιπροσωπευτικά της πορείας νοσηλείας του. Παρατηρήσαμε διακυμάνσεις στη συγκέντρωση του προΤα(100-109) κατά την πορεία νοσηλείας ασθενών που εμφάνισαν βακτηριακές λοιμώξεις, οι οποίες συσχετίστηκαν με την αντίστοιχη κλινική εικόνα και τους εργαστηριακούς δείκτες. Αντίθετα, ελάχιστη ήταν η συγκέντρωση του προΤα(100-109) σε περιστατικά που νοσηλεύθηκαν στη ΜΕΘ χωρίς να εμφανίσουν λοίμωξη.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, το προΤα(100-109) δρα ανοσοενισχυτικά σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα και, ίσως, μελλοντικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ανοσοθεραπευτικό μόριο για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος καρκινοπαθών. Παράλληλα, το ίδιο μόριο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και ως διαγνωστικό εργαλείο διαφοροδιάγνωσης μεταξύ σηπτικής και άσηπτης φλεγμονής, εφόσον αυτό επιβεβαιωθεί με ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων ασθενών με λοιμώξεις.

ProT α is a nuclear protein involved in cellular processes strongly associated with cell development, such as proliferation and apoptosis. Specifically during apoptosis, proT α is subjected to cleavage by activated caspases at D⁹⁹ and the generated fragment proT α (1-99) relocalises in the cytoplasm. In parallel, proT α exhibits pleiotropic extracellular activity, enhancing the functionality of immune cells. The decapeptide proT α (100-109) is the immunoreactive centre of the protein and the immunological mechanism of action of both proT α and proT α (100-109) is mediated by TLR-4.

Based on the afore mentioned information, the aims of this PhD thesis were:

- to explore the activity of proT α (100-109) and intact proT α on basic cell functionalities of innate immune cells expressing TLR-4 and
- using highly specific antibodies, to develop and evaluate an immunoassay (ELISA) able to quantify proT α (100-109) extracellularly, in order to elucidate its mode of action.

Considering that proT α signals through TLRs on human monocytes, binds to TLR-4 on mouse macrophages and both proT α and proT α (100-109) generate phenotypically mature and functionally immunocompetent dendritic cells, we studied the *in vitro* effects of the two peptides on innate immune cells expressing TLR-4. In particular, we selected to study phagocytes, neutrophils and monocytes, derived from healthy donors and patients with breast cancer. Upon activation with proT α (100-109) or proT α , we determined their phagocytic capacity (by zymosan particle incorporation), intracellular production of superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$) (by NBT reduction), extracellular release of $\cdot\text{O}_2^-$ (by cytochrome c reduction) and oxidative burst (Bursttest). In parallel, we assessed the cytotoxic activity of neutrophils against cancer targets by ⁵¹Cr release assay.

The activation of neutrophils with proT α (100-109) or proT α duplicated their phagocytic capacity, quadruplicated intracellular $\cdot\text{O}_2^-$ production and increased by 1.5-2-fold extracellular $\cdot\text{O}_2^-$ release, both in healthy donors and cancer patients. The increase of the phagocytic capacity of neutrophils in cancer patients was lower compared to healthy donors, as a large proportion of circulating neutrophils in these patients is immature with reduced phagocytic capacity. In contrast, and in agreement with earlier reports from other types of cancer, $\cdot\text{O}_2^-$ production by cancer patient neutrophils was higher than that of healthy donors, and a similar pattern was observed for the extracellular release of $\cdot\text{O}_2^-$ as well. Overall, both molecules restored to the levels of normal subjects, the suppressed due to the disease, functions of neutrophils derived from patients with breast cancer. Concerning their

cytotoxicity, neutrophils from both healthy donors and cancer patients exhibited moderate lytic ability of various cancer cell lines, which was enhanced by approximately 2-fold in the presence of the studied molecules. The Bursttest results showed that proT α (100-109) and proT α enhanced the oxidative burst of isolated neutrophils.

Monocyte activation with proT α (100-109) or proT α duplicated their phagocytic capacity, increased intracellular O $_2^-$ production by 2.5-fold and extracellular O $_2^-$ release by 2-fold, both in healthy donors and in cancer patients. Comparing these percentages with those of neutrophils, we observed that they were at similar levels in terms of phagocytosis and extracellular O $_2^-$ release; however, neutrophils developed enhanced respiratory burst compared to monocytes.

In order to elucidate the mode of action of the decapeptide, we generated antibodies against proT α (100-109) and developed a competitive ELISA, specific for proT α (100-109) and sensitive enough to detect low concentrations of the decapeptide in serum.

From the polyclonal antiserum, we isolated the decapeptide-specific IgG, while prior testing the serum was precipitated with acetone to remove macromolecular proteins. The protocol we finally developed is as follows: a microplate is coated with protein A, which binds the Fc region of the IgG. At the same time, proT α (100-109) specific IgG are incubated with biotinylated and free proT α (100-109) for competition. The mixture is distributed in the precoated microplate, peroxidase conjugated streptavidin is added, followed by addition of ABTS enzyme substrate solution. The optical density is measured with an ELISA reader at 405 nm. The sensitivity of the developed ELISA was 10 μ g/mL to 0,1 ng/mL proT α (100-109), the assay showed no cross-reaction with other thymosins or BSA, whereas the antibodies recognized intact proT α equally well. Using the developed ELISA, we determined the concentration of the decapeptide *in vitro*, in supernatants of cells driven to cell death, *in vivo* in the serum of mice infected with bacteria and *ex vivo* in human sera from normal and pathological conditions.

For the *in vitro* apoptotic and necrotic experiments, we used HeLa cells which naturally overexpress proT α . The percentages of apoptotic and necrotic cells were assessed by flow cytometry, using Annexin V and propidium iodide (PI). In apoptosis, we defined as optimal the conditions under which the largest percentage of HeLa cells was in the phase of early apoptosis (annexin+PI-). Incubation of cells with the combination of 5 ng/mL TNF- α and 1 ng/mL emetine for 4 hours was the optimal condition for apoptosis induction, as 85.7% of HeLa cells were characterized as early apoptotic. Further, following the afore protocol, various cell lines and leukocyte subpopulations, isolated from the peripheral blood of healthy

donors, were driven to apoptosis. The apoptotic supernatants were collected and analyzed by the developed ELISA. ProT α (100-109) was detected in all apoptotic supernatants, while its concentration was low in the corresponding control supernatants. For induction of necrosis, the cells were subjected to three consecutive freeze-thaw cycles or incubated with a high concentration of doxorubicin (100 μ g/mL). In necrotic supernatants, immunoreactive material was also detected, which probably is intact proT α released during cell membrane rupture, as our antibodies recognize equally well proT α and proT α (100-109).

At a next step, we determined the concentration of proT α (100-109) in the serum of BALB/c and C57BL/6 mice infected with five different bacterial strains (*Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Corynebacterium urealyticum*, *Pasteurella multocida* and *Klebsiella oxytoca*). For the experiments, we used mice bred under different laboratory conditions: those grown under conventional conditions (conventional) and those that had no pathogen contact since their birth (germ-free). Mice were intraperitoneally inoculated with a single dose of bacterial suspension (10³ CFU/0,5 mL/mouse) and blood was collected prior to infection, 2, 24 and 72 hours after infection. We noticed differences in the amount of proT α (100-109) as determined in the serum of animals, depending on the strain, the laboratory conditions of maintenance and the type of pathogen that infected them. In general, we observed that the levels of proT α (100-109) before infection were low, increased gradually during the progress of the infection and, for most pathogens, peaked at 72 hours. Considering that these specific bacterial strains cause massive macrophage apoptosis in animals, we assume that upon intracellular fragmentation of proT α , the decapeptide is released in serum, where it acts as a “danger signal”. Using MALDI-TOF mass spectrometry, we detected a peak corresponding to the molecular mass of the decapeptide only in the sera of mice infected with bacteria, which is a primary indication of the extracellular presence of proT α (100-109).

Following these models, we developed a more aggressive model of lethal sepsis using two strains of *Klebsiella pneumoniae* in ICR mice. The strain L-78 is clinical isolate, with low infectivity and is endocytosed by monocytes/macrophages in the peripheral blood, while the second strain (ATCC43816) is a prototype, highly infective and is not endocytosed. Mice were infected intraperitoneally and blood samples were collected before infection (0), 3, 6, 12, 24 and 48 hours after infection. In animals administered the L-78 strain, a gradual increase in the concentration of proT α (100-109) was noticed, with maximum levels detected at 48 hours post-infection. In animals infected with the ATCC43816 strain, we observed variations in the detected concentration of the decapeptide. For this bacterial strain which is not

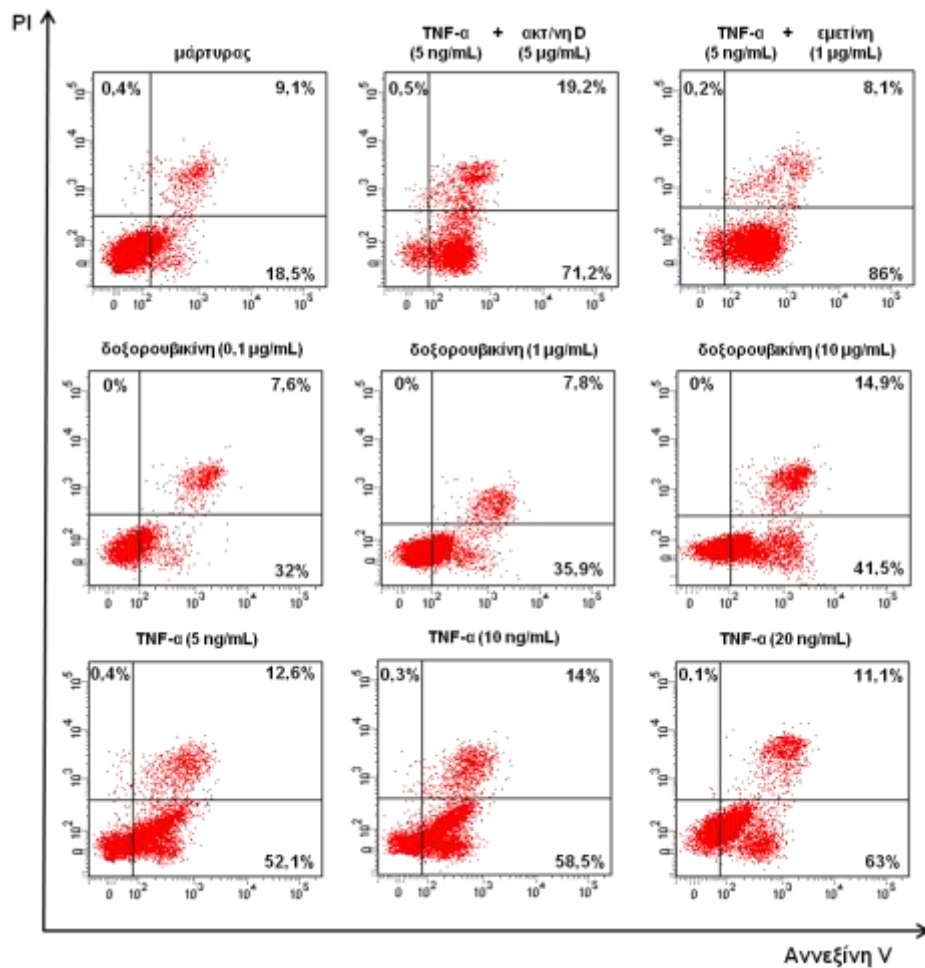
subjected to endocytosis, multiple death pathways were triggered, in principle necrotic, as was revealed after spleen cell analysis by flow cytometry following Annexin V/PI staining.

Finally, we determined the levels of proT α (100-109) in human sera of healthy individuals, paediatric patients and patients hospitalized in an Intensive Care Unit (ICU). For the first time, we determined the levels of proT α (100-109) in the serum of healthy subjects. ProT α (100-109) concentration was very low (<1 ng/mL), and independent of the age of the individuals. Paediatric samples were divided into 3 groups: children with autoinflammatory diseases and low CRP, children with autoinflammatory diseases and high CRP and children with infections. These groups were purposely selected so as to confirm that the release of proT α (100-109) in the serum is specific, only when massive cell apoptosis occurs, as for example after a bacterial infection, and does not characterise any inflammatory condition. Indeed, in children with infections, we detected the highest concentration of the decapeptide compared to the samples of children with autoinflammatory diseases, in which the concentration of proT α (100-109) was marginal. The sera samples from the ICU were serially collected from the time of admission of the patient till ICU exit, to cover the extent of the entire infection/hospitalization. We observed variable concentrations of proT α (100-109) during the course of treatment of patients with bacterial infections, which were associated with the development of clinical signs and the increased in laboratory markers. In contrast, there was minimal concentration of proT α (100-109) in cases hospitalized in the ICU without showing signs of infection.

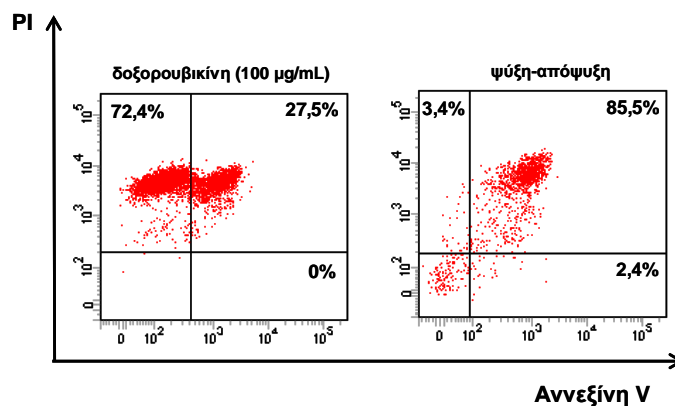
The results of this PhD thesis show that proT α (100-109) acts as an adjuvant on neutrophils and monocytes and, perhaps, eventually, it can be used as an immunotherapeutic molecule to enhance the immune systems of cancer patients. Meanwhile, the same molecule could be used as a diagnostic tool for the differential diagnosis between septic and aseptic inflammation, albeit this needs to be further confirmed by analysing a larger number of samples from patients with infections.

7

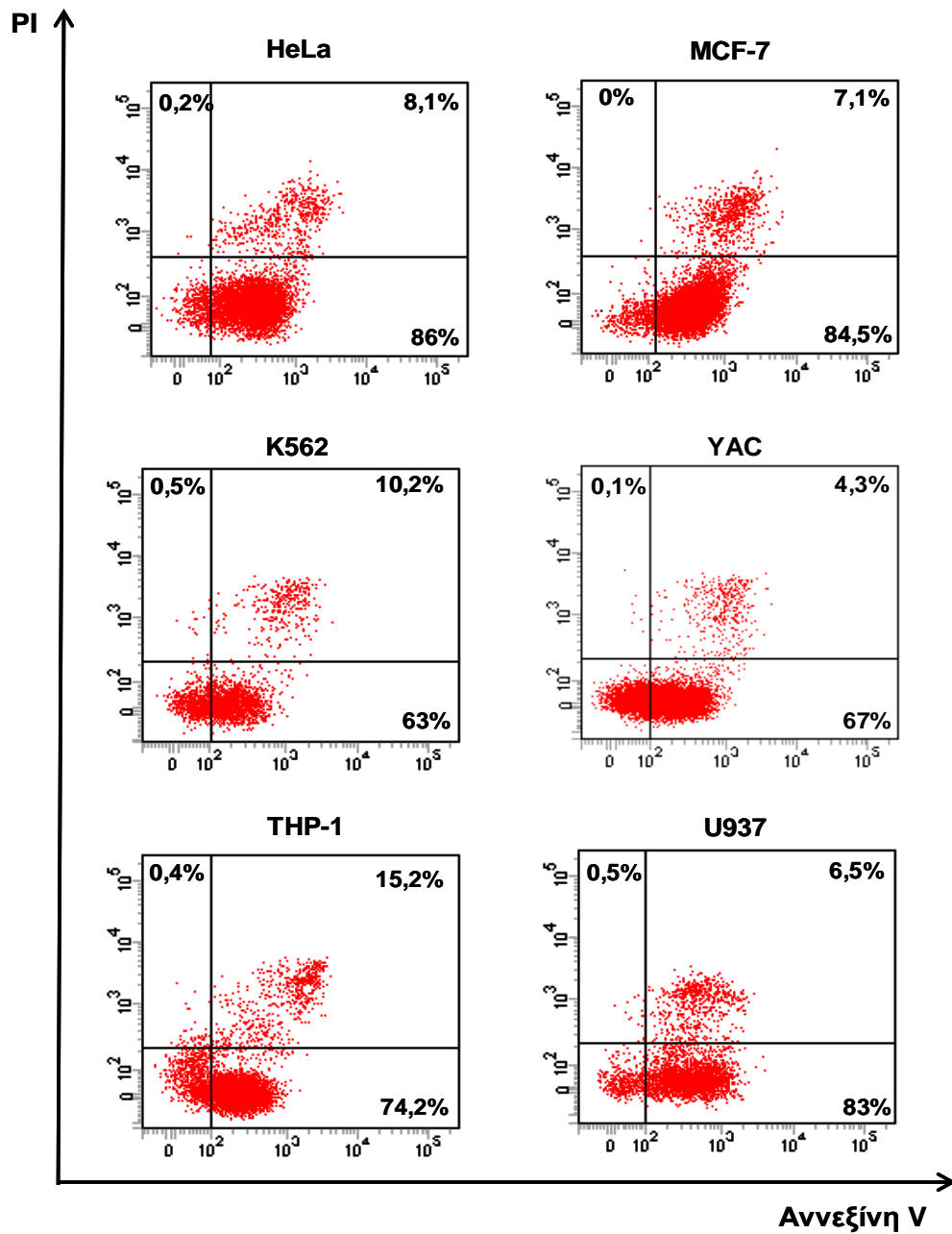
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι



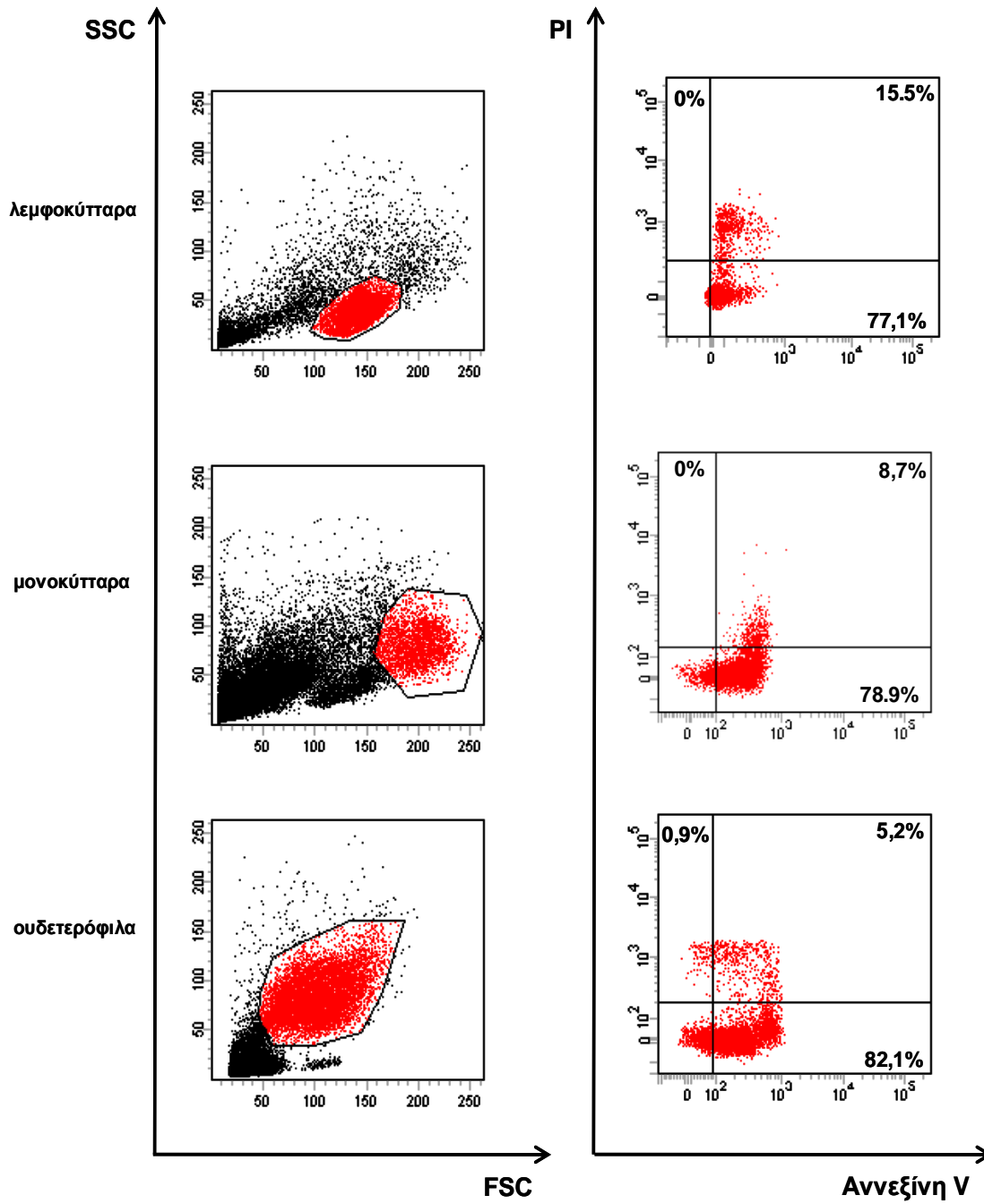
Εικόνα 7.1. Ενδεικτικά στικτογράμματα κυττάρων HeLa που επώαστηκαν για 4 ώρες με διάφορους επαγωγικούς παράγοντες απόπτωσης, μετά από χρώση με αννεξίνη V και PI. Τα ποσοστά των κυττάρων με πρώιμα αποπτωτικά, όψιμα αποπτωτικά/πρώιμα νεκρωτικά και νεκρωτικά χαρακτηριστικά σημειώνονται στο κάτω δεξιά, άνω δεξιά και άνω αριστερά τεταρτημόριο, αντίστοιχα. Μάρτυρας: κύτταρα σε θρεπτικό υλικό.



Εικόνα 7.2. Ενδεικτικά στικτογράμματα κυττάρων HeLa που οδηγήθηκαν σε νέκρωση με δοξορουβικίνη (100 μg/mL) για 4 ώρες ή υποβλήθηκαν σε 3 διαδοχικούς κύκλους ψύξης-απόψυξης. Η απεικόνιση των ποσοστών είναι ανάλογη με αυτή που περιγράφεται στη λεζάντα της Εικόνας 7.1.



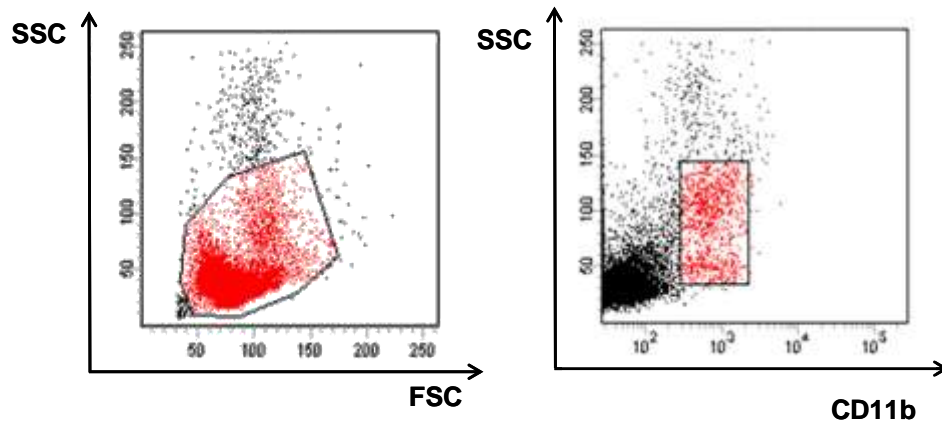
Εικόνα 7.3. Ενδεικτικά στικτογράμματα έξι κυτταρικών σειρών που οδηγήθηκαν σε απόπτωση με 5 ng/mL TNF-α και 1μg/mL εμετίνη για 4 ώρες και χρώστηκαν με αννεξίνη V και PI. Η απεικόνιση των ποσοστών είναι ανάλογη με αυτή που περιγράφεται στη λεζάντα της Εικόνας 7.1.



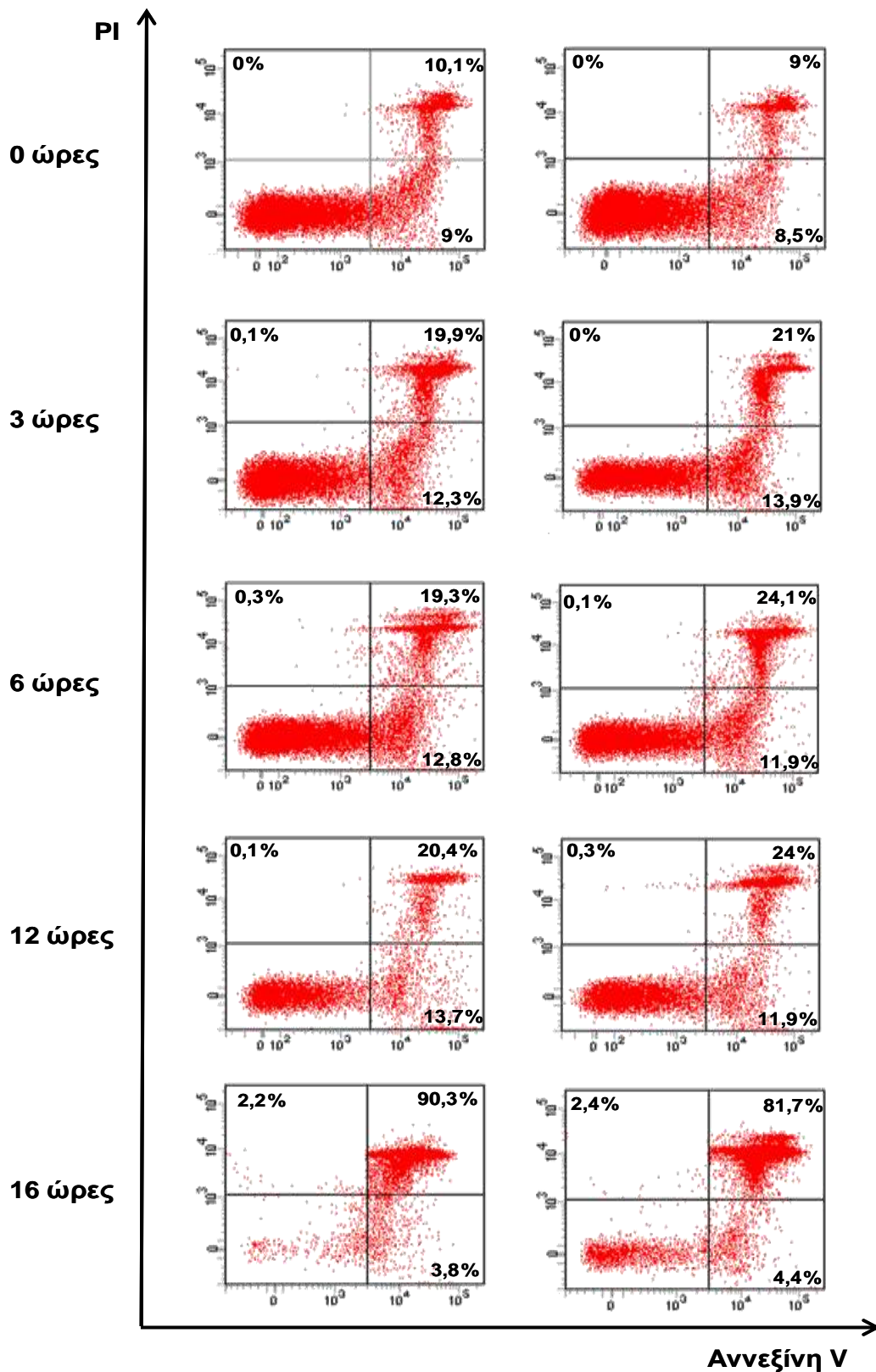
Εικόνα 7.4. Ενδεικτικά στικτογράμματα λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών που οδηγήθηκαν σε απόπτωση, μετά από επώαση για 4 ώρες με 5 ng/mL TNF-α και 1 μg/mL εμετίνη (λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα) ή μετά από 24ωρη καλλιέργεια απουσία ορού (ουδετερόφιλα). Η χρώση έγινε με αννεξίνη V και PI. Αριστερά απεικονίζονται οι υποπληθυσμοί που έχουν οριοθετηθεί (gated) και αναλυθεί κάθε φορά. Δεξιά, η απεικόνιση των ποσοστών είναι ανάλογη με αυτή που περιγράφεται στη λεζάντα της Εικόνας 7.1.

8

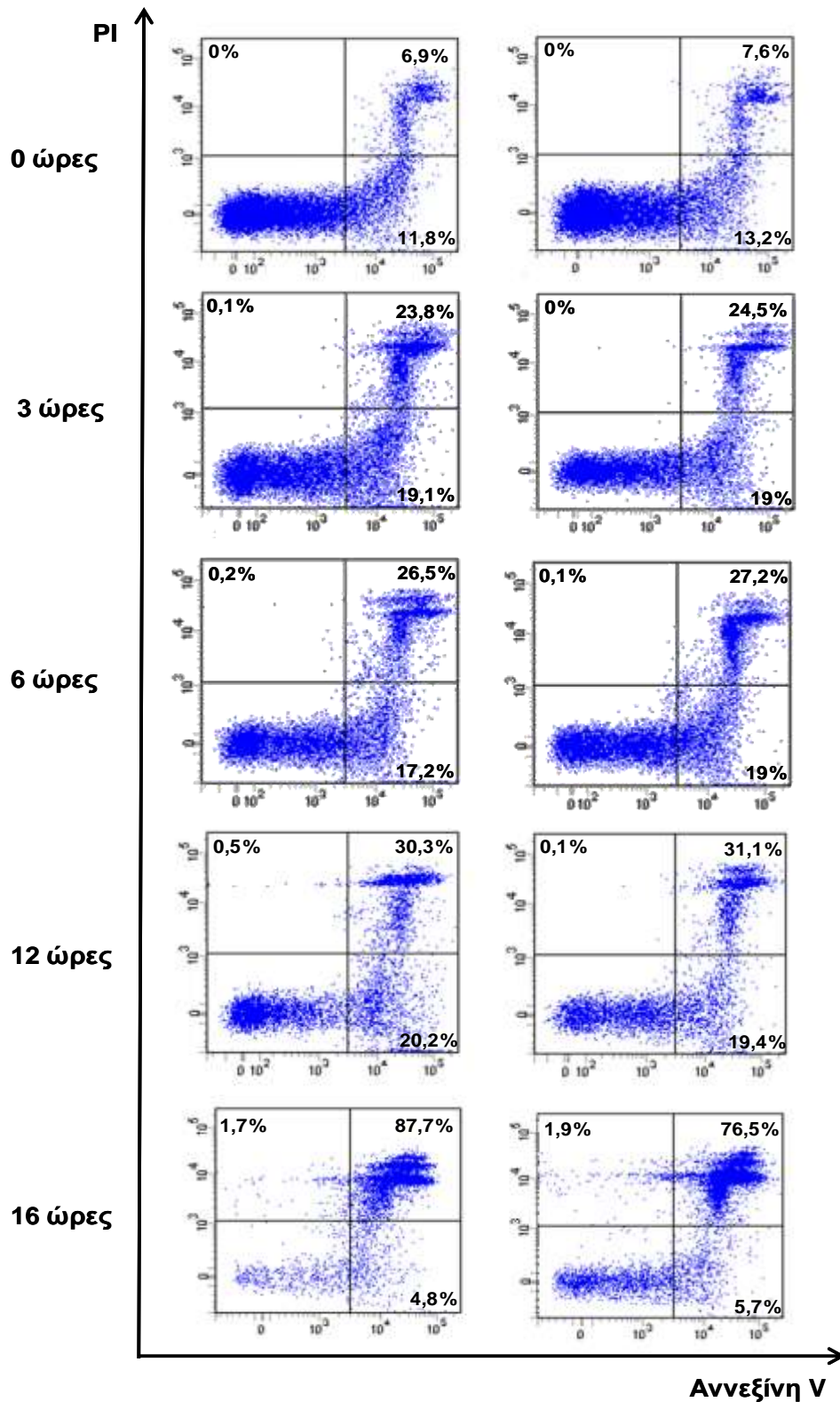
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ



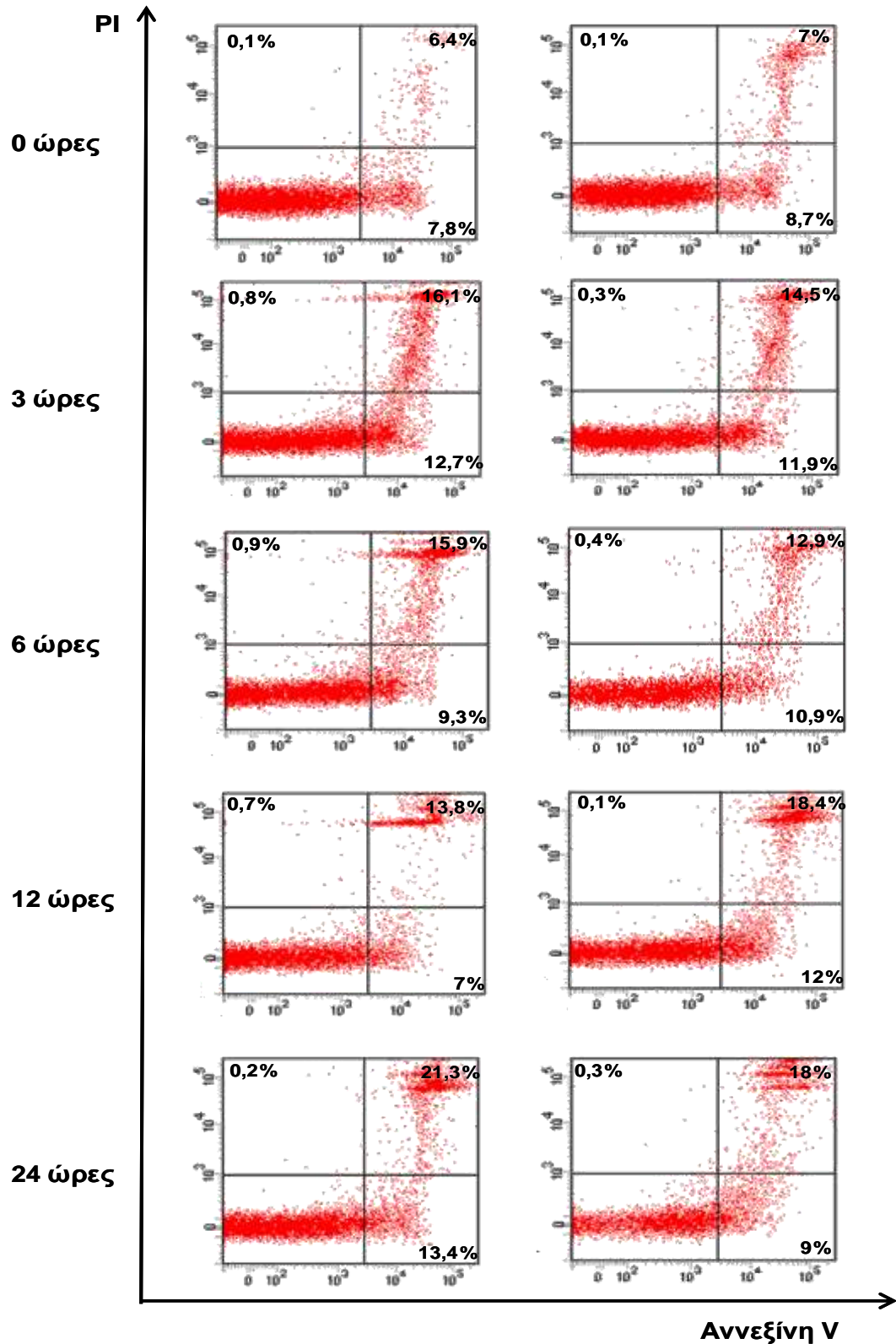
Εικόνα 7.5. Ενδεικτικά στικτογράμματα ολικών σπληνοκυττάρων από ποντίκι CD-1 (αριστερά) και μακροφάγων μετά από χρώση με CD11b (δεξιά).



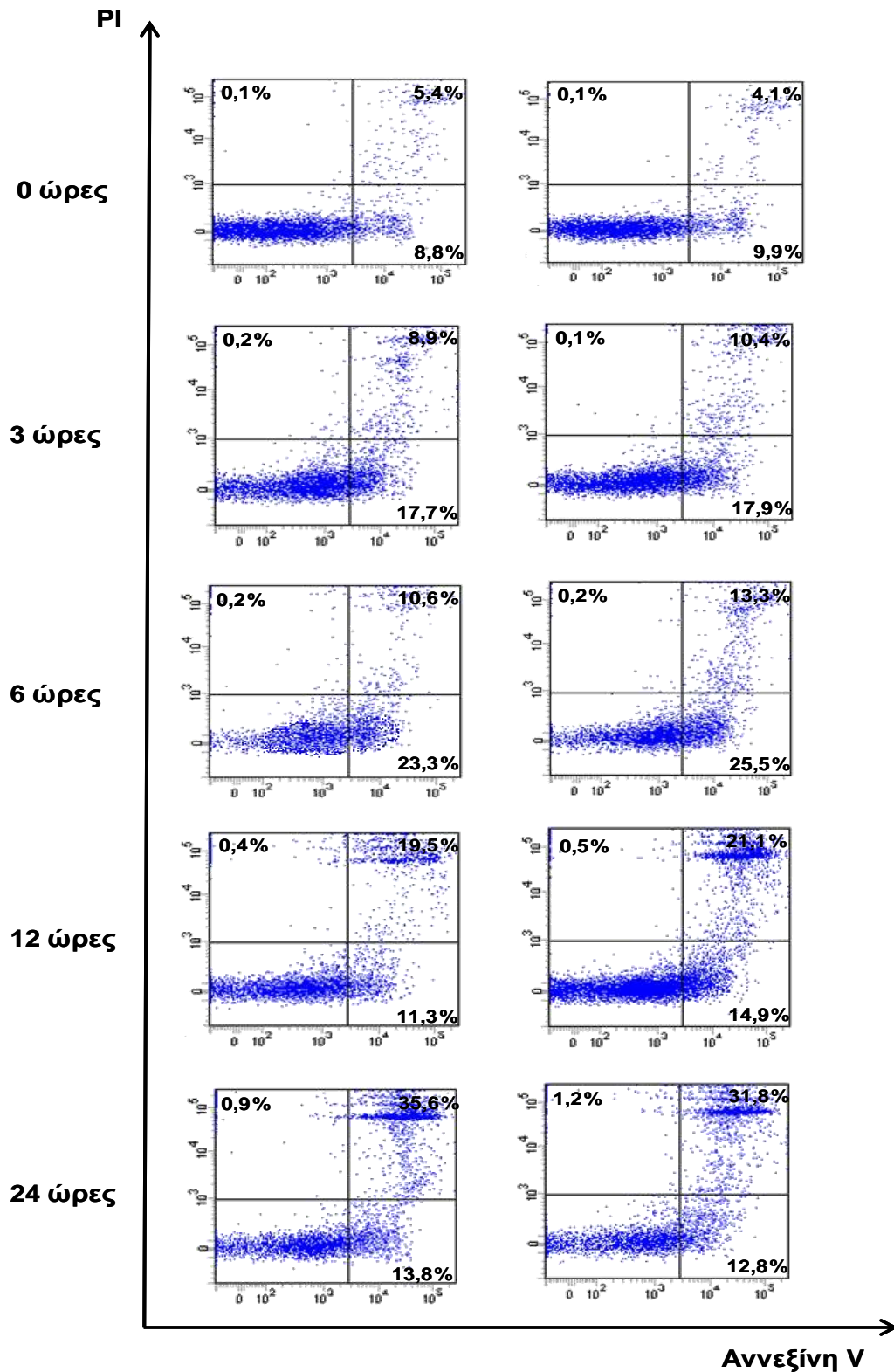
Εικόνα 7.6. Ενδεικτικά στικτογράμματα σπληνοκυττάρων απομονωμένων από δύο ποντίκια CD-1, κατά τη διάρκεια βακτηριακής λοίμωξής τους (0-16 ώρες) με το στέλεχος ATCC43816 του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae*. Η χρώση έγινε με αννεξίνη V και PI. Η απεικόνιση των ποσοστών είναι ανάλογη με αυτή που περιγράφεται στη λεζάντα της Εικόνας 7.1.



Εικόνα 7.7. Ενδεικτικά στικτογράμματα μακροφάγων απομονωμένων από σπλήνες δύο ποντικών CD-1 κατά τη διάρκεια βακτηριακής λοίμωξής τους (0-16 ώρες) με το στέλεχος ATCC43816 του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae*. Η χρώση έγινε με αννεξίνη V και PI. Η απεικόνιση των ποσοστών είναι ανάλογη με αυτή που περιγράφεται στη λεζάντα της Εικόνας 7.1.



Εικόνα 7.8. Ενδεικτικά σκιστογράμματα σπληνοκυττάρων απομονωμένων από δύο ποντίκια κατά τη διάρκεια βακτηριακής λοίμωξης τους (0-24 ώρες) με το στέλεχος L-78 του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae*. Η χρώση έγινε με αννεξίνη V και PI. Η απεικόνιση των ποσοστών είναι ανάλογη με αυτή που περιγράφεται στη λεζάντα της Εικόνας 7.1.

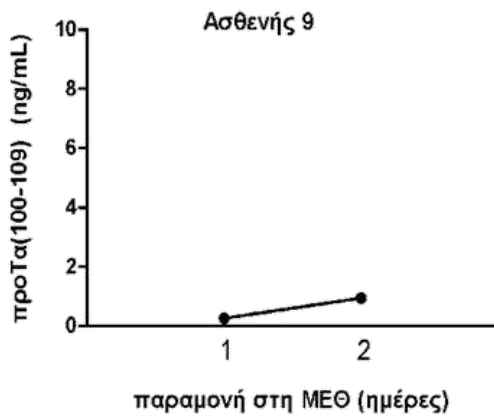


Εικόνα 7.9. Ενδεικτικά στικτογράμματα μακροφάγων απομονωμένων από σπλήνες δύο ποντικών κατά τη διάρκεια βακτηριακής λοίμωξής τους (0-24 ώρες) με το στέλεχος L-78 του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae*. Η χρώση έγινε με αννεξίνη V και PI. Η απεικόνιση των ποσοστών είναι ανάλογη με αυτή που περιγράφεται στη λεζάντα της Εικόνας 7.1.

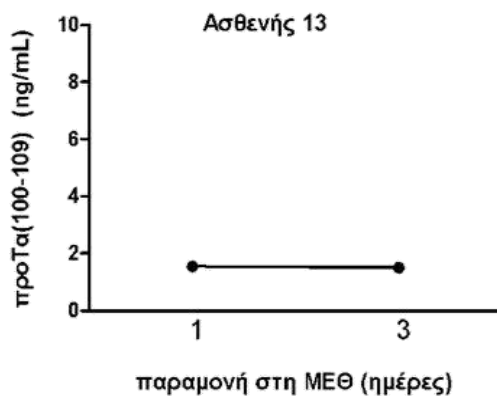
9

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

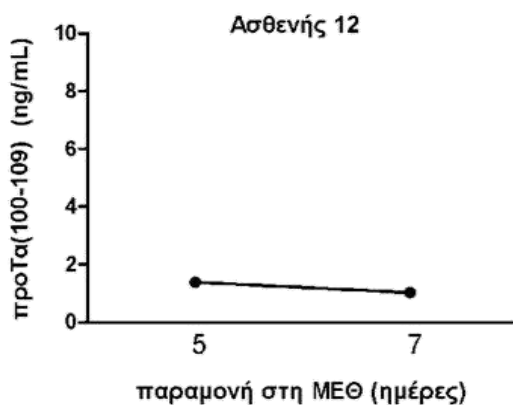
Ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στη ΜΕΘ χωρίς να εμφανίσουν λοίμωξη (μάρτυρες)



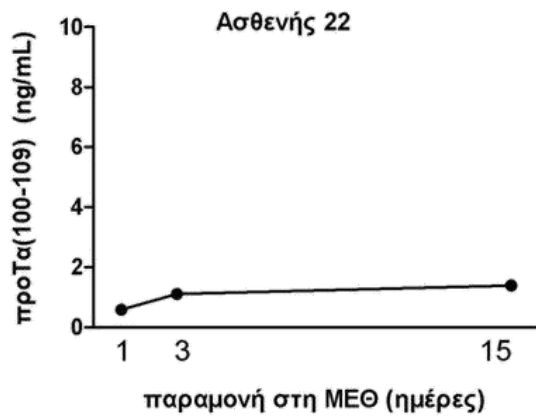
Ο ασθενής 9 εισήχθη στη ΜΕΘ λόγω εκούσιας φαρμακευτικής δηλητηρίασης και νοσηλεύθηκε 2 ημέρες για παροχή αυξημένης φροντίδας. Εξήλθε βελτιωμένος, χωρίς να εμφανίσει λοίμωξη [<1 ng/mL προΤα(100-109)].



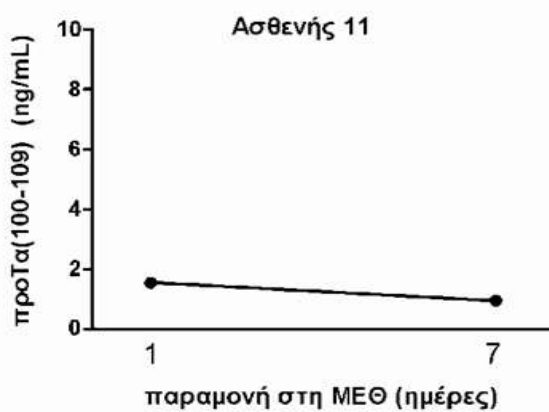
Ο ασθενής 13 εισήχθη στη ΜΕΘ σε κωματώδη κατάσταση λόγω λήψης φαρμάκων και εμφάνισε σταθερά χαμηλά επίπεδα προΤα(100-109) κατά την τριήμερη νοσηλεία του (~1,5 ng/mL).



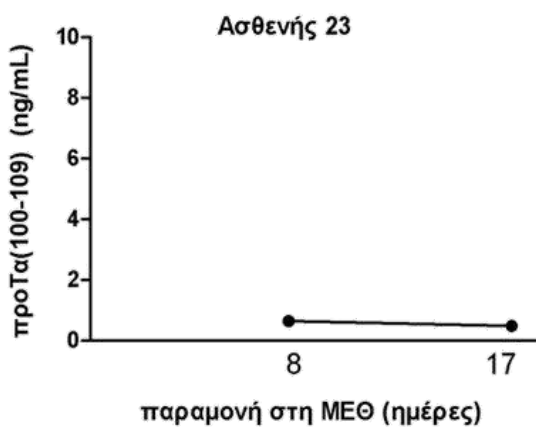
Ο ασθενής 12 νοσηλεύθηκε στη ΜΕΘ λόγω καρδιακής ανεπάρκειας, εμφάνισε σταθερά χαμηλά επίπεδα προΤα(100-109) ($<1,5$ ng/mL), ωστόσο κατέληξε την ημέρα 7.



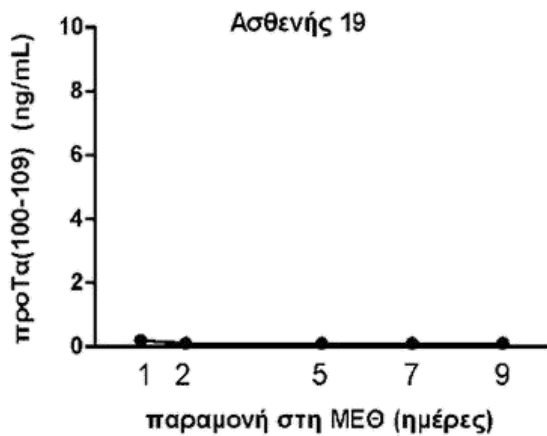
Ο ασθενής 22 εισήχθη στη ΜΕΘ λόγω καρδιοαναπνευστικής ανεπάρκειας και εμφάνισε σταθερά χαμηλά επίπεδα προΤα(100-109) (<1,5 ng/mL).



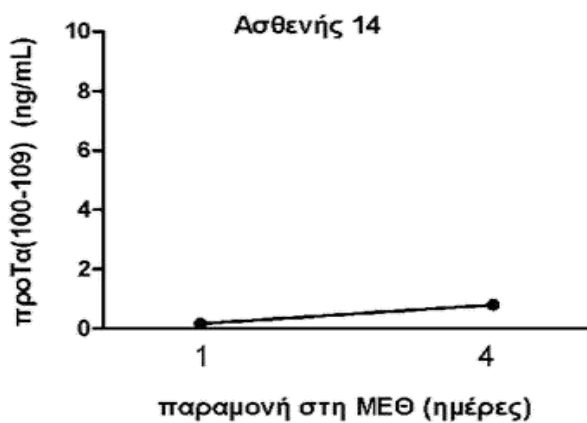
Ο ασθενής 11 εισήχθη στη ΜΕΘ λόγω καρδιοαναπνευστικής ανακοπής μετά από σοβαρή χειρουργική επέμβαση στο πάγκρεας [$<1,5$ ng/mL προΤα(100-109)] και εξήλθε βελτιωμένος την ημέρα 8.



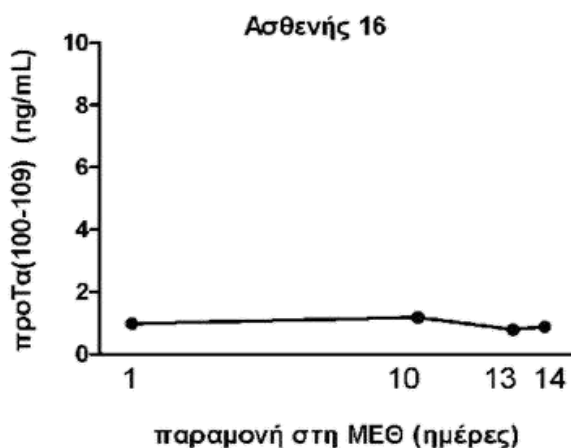
Ο ασθενής 23 εισήχθη στη ΜΕΘ με καρδιογενή καταπληξία λόγω εμφράγματος του μυοκαρδίου. Τα επίπεδα του προΤα(100-109) παρέμειναν <1 ng/mL, ωστόσο ο ασθενής κατέληξε την ημέρα 18.



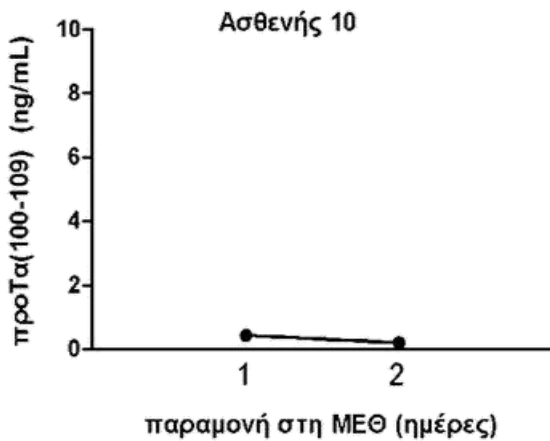
Ο ασθενής 19 νοσηλεύθηκε 9 ημέρες στη ΜΕΘ για μετεγχειρητική παρακολούθηση λόγω σοβαρής χειρουργικής επέμβασης, χωρίς να εμφανίσει λοίμωξη [$\sim 0,2$ ng/mL προΤα(100-109)].



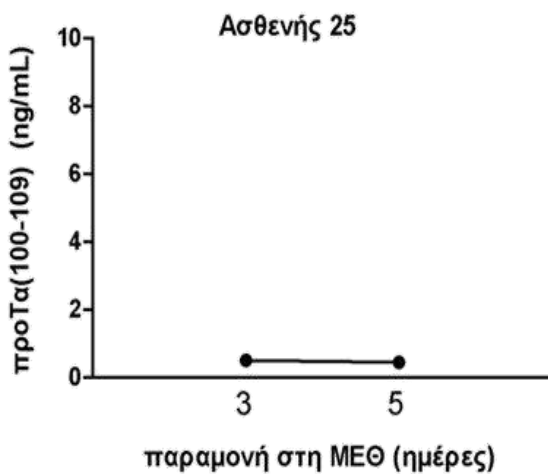
Ο ασθενής 14 εισήχθη στη ΜΕΘ για παρακολούθηση μετά από επιπλοκές κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης και εξήλθε μετά από 4 ημέρες [<1 ng/mL προΤα(100-109)].



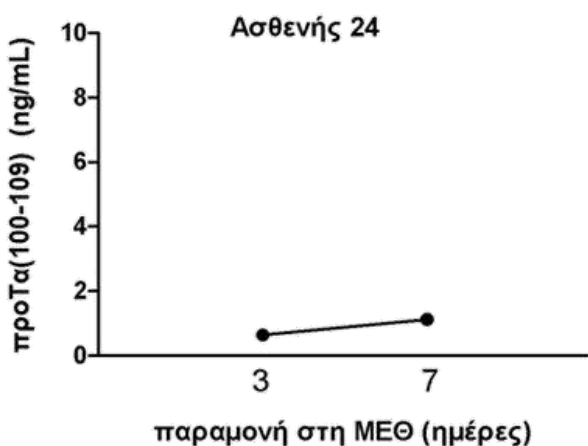
Ο ασθενής 16, ο οποίος έπασχε από αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο, εισήχθη στη ΜΕΘ με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια [<1 ng/mL προΤα(100-109)] και κατέληξε την ημέρα 15.



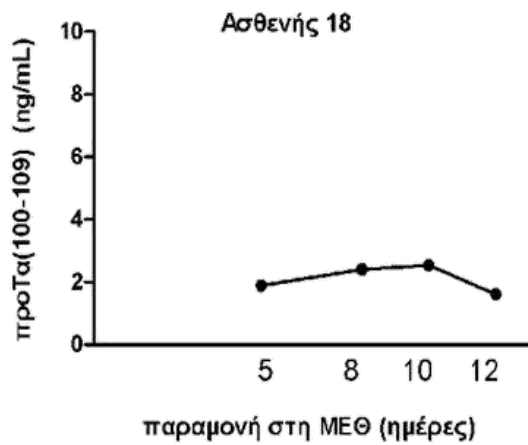
Ο ασθενής 10 εισήχθη στη ΜΕΘ λόγω εκτεταμένου αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, διαπιστώθηκε ο εγκεφαλικός του θάνατος και αποσυνδέθηκε από τη μηχανική υποστήριξη, με αποτέλεσμα να καταλήξει την ημέρα 3. Οι τιμές του προΤα(100-109) παρέμειναν <0,5 ng/mL.



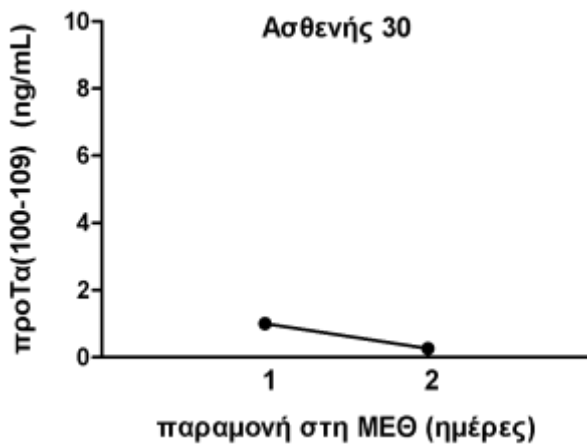
Ο ασθενής 25 νοσηλεύθηκε στη ΜΕΘ λόγω κίρρωσης του ήπατος. Εμφάνισε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα προΤα(100-109) (~0,5 ng/mL) και εξήλθε βελτιωμένος την ημέρα 6.



Ο ασθενής 24 νοσηλεύθηκε στη ΜΕΘ λόγω χειρουργικής επέμβασης εκτομής των όρχεων. Τα επίπεδα του προΤα(100-109) παρέμειναν χαμηλά (<1,5 ng/mL) και την ημέρα 8 ο ασθενής εξήλθε βελτιωμένος.

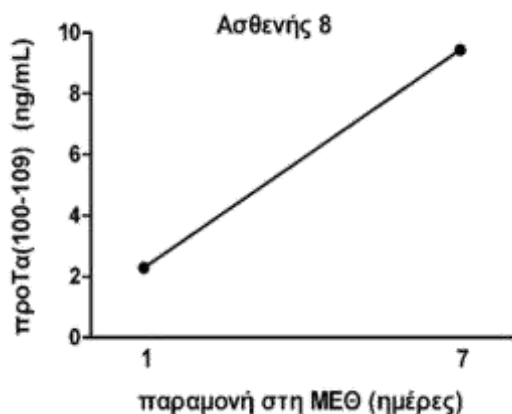


Ο ασθενής 18 νοσηλεύθηκε στη ΜΕΘ μετά από τροχαίο ατύχημα λόγω σοβαρών καταγμάτων και αδυναμίας χειρισμού των εκκρίσεων, εμφάνισε επίπεδα προΤα(100-109) της τάξης του 2,5 ng/mL και εξήλθε βελτιωμένος την ημέρα 12.

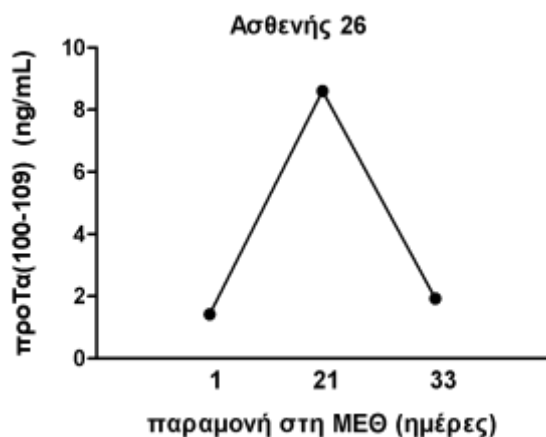


Ο ασθενής 30 εισήχθη στη ΜΕΘ προληπτικά λόγω ιογενούς εγκεφαλίτιδας από τον ιό του Δυτικού Νείλου. Τα επίπεδα του προΤα(100-109) ήταν <1 ng/mL και μετά από νοσηλεία 48 ωρών, ο ασθενής εξήλθε βελτιωμένος.

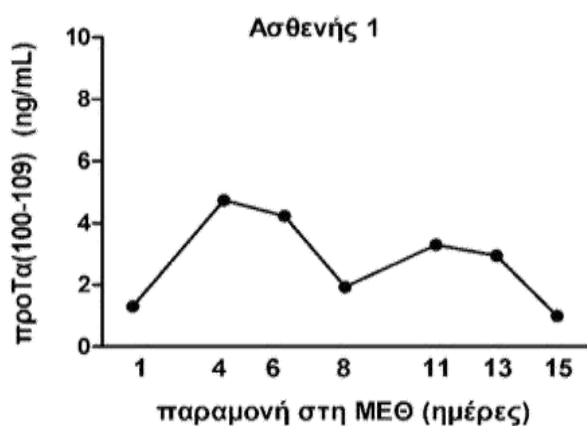
Ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στη ΜΕΘ με λοιμώξεις



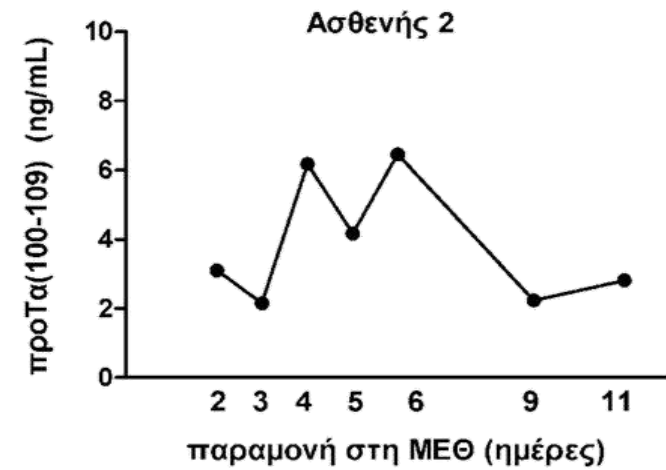
Ο ασθενής 8 εισήχθη στη ΜΕΘ λόγω σοβαρής χειρουργικής επέμβασης [2,29 ng/mL προΤα(100-109)], εμφάνισε γενικευμένη λοίμωξη από *Candida tropicalis* και τελικά κατέληξε από σηπτικό shock, μετά από 7 ημέρες [9,44 ng/mL προΤα(100-109)].



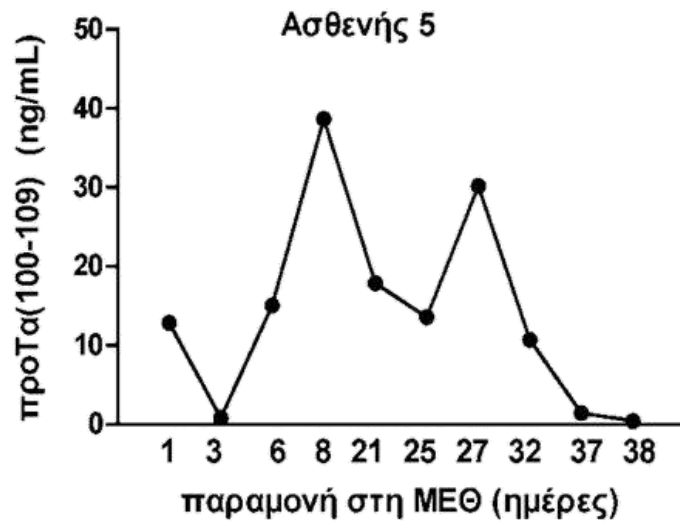
Ο ασθενής 26 εισήχθη στη ΜΕΘ, καθώς έπασχε από σοβαρά αγγειακά προβλήματα. Κατά τη νοσηλεία του εμφάνισε λοίμωξη από πολλαπλά βακτηριακά στελέχη [8,6 ng/mL προΤα(100-109)], έλαβε αντιβίωση, ωστόσο κατέληξε από σηπτικό shock την ημέρα 33.



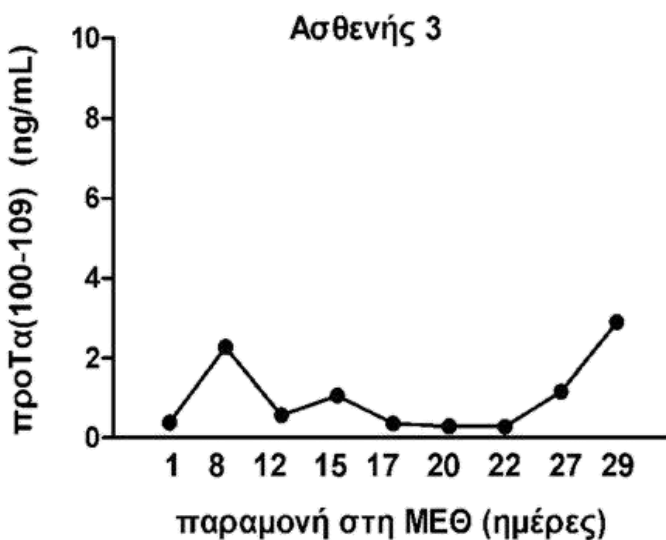
Ο ασθενής 1 εισήχθη στη ΜΕΘ λόγω καρδιοαναπνευστικής ανακοπής και εμφάνισε λοίμωξη από *Pseudomonas aeruginosa*, η οποία ταυτοποιήθηκε την ημέρα 11 [3,29 ng/mL προΤα(100-109)]. Τελικά, εξήλθε βελτιωμένος την ημέρα 15 [0,99 ng/mL προΤα(100-109)].



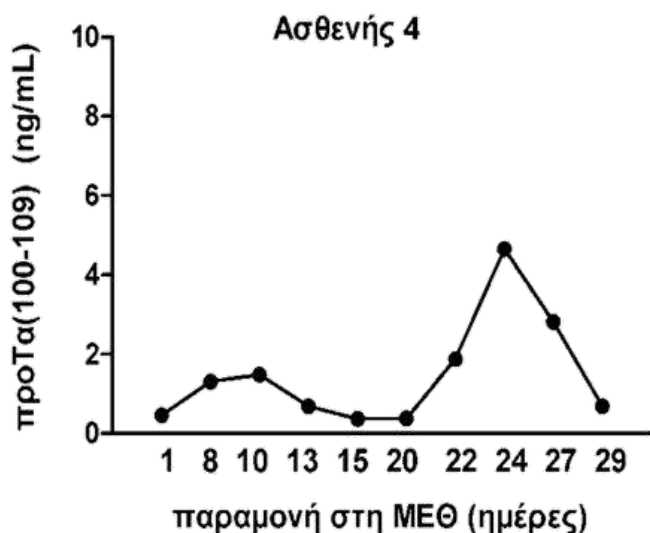
Ο ασθενής 2 εμφάνισε πνευμονία σε έδαφος ανοσοκαταστολής, [6,46 ng/mL η υψηλότερη συγκέντρωση προΤα(100-109) την ημέρα 6, με CRP=218,9 mg/L και αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων >30 χιλιάδες/mm³], και κατέληξε από μη αναστρέψιμο, σηπτικό shock την ημέρα 12.



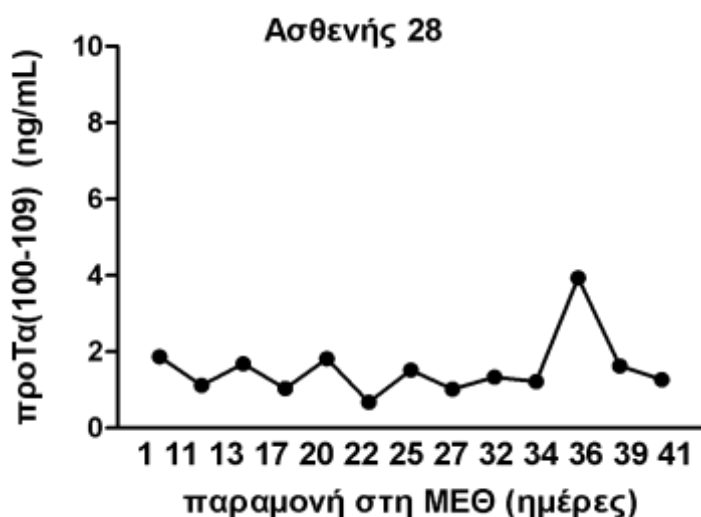
Ο ασθενής 5 νοσηλεύθηκε στη ΜΕΘ λόγω οξείας ηπατικής και νεφρικής ανεπάρκειας από χρήση τοξικών ουσιών. Εμφάνισε 2 φορές λοίμωξη, η οποία συμβαδίζει με τις δύο κορυφές αύξησης της συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου (38,65 και 30,2 ng/mL). Την ημέρα 38, εξήλθε βελτιωμένος για νοσηλεία στη νευρολογική κλινική [0,42 ng/mL προΤα(100-109)].



Ο ασθενής 3 εισήχθη στη ΜΕΘ με μηνιγγίτιδα και εμφάνισε σηψαιμία από *Streptococcus pyogenes*. Παρόλο που δεν εμφάνισε υψηλό πυρετό ή μεγάλη αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων, η συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου ήταν αυξημένη την ημέρα 8 [2,28 ng/mL προΤα(100-109)] και τις ημέρες 27 και 29 [1,16 και 2,9 ng/mL προΤα(100-109), αντίστοιχα].



Ο ασθενής 4 εμφάνισε γαστρεντερίτιδα και λοίμωξη του αναπνευστικού, που οδήγησαν σε σηπτική καταπληξία και πολυοργανική ανεπάρκεια. Την ημέρα 24, καταγράφηκε η υψηλότερη τιμή προΤα(1001-109), (4,65 ng/mL), η οποία συμπίπτει με υψηλό πυρετό ($>38^{\circ}\text{C}$) και αυξημένο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων (>30 χιλιάδες/ mm^3).



Ο ασθενής 28 έπασχε από λοίμωξη του αναπνευστικού, η οποία του προκάλεσε οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια και τον οδήγησε στη ΜΕΘ. Εκεί, εμφάνισε νέες λοιμώξεις από πολλαπλά βακτηριακά στελέχη και έλαβε διάφορα αντιβιοτικά σχήματα. Η συγκέντρωση του προΤα(100-109) εμφάνισε αυξομειώσεις (0,68-3,94 ng/mL).

9

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής έχουν προκύψει οι παρακάτω δύο δημοσιεύσεις:

Samara P, Ioannou K, Neagu M, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Voelter W, Tsitsilonis O. The C-terminal decapeptide of prothymosin α is responsible for its stimulatory effect on the functions of human neutrophils in vitro. *Int Immunopharmacol* 2013, 15:50-57

Samara P, Kalbacher H, Ioannou K, Radu DL, Livaniou E, Promponas VJ, Voelter W, Tsitsilonis O. Development of an ELISA for the quantification of the C-terminal decapeptide prothymosin α (100-109) in sera of mice infected with bacteria. *J Immunol Methods* 2013, 395:54-62

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΑΜΑΡΑ ΠΗΝΕΛΟΠΗΣ

Προσωπικά στοιχεία:

Όνοματεπώνυμο: Σαμαρά Πηνελόπη

Πατρώνυμο: Αναστάσιος

Τόπος, ημερομηνία γέννησης: Αθήνα, 1985

Οικογενειακή κατάσταση: Άγαμη

Διεύθυνση Οικίας:

Πορφύρα 36, Νέο Ψυχικό, Αθήνα, Τ.Κ: 15451.

Τηλ : 210-6754203, Κιν. 6977934400, e-mail: psamara@biol.uoa.gr

Εκπαίδευση:

- Υποψήφια Διδάκτωρ, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών με επιβλέπουσα την Επίκουρη Καθηγήτρια Ουρανία Τσιτσιλώνη (2009-σήμερα)
- Πτυχίο Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (2008)
- Απολυτήριο Ενιαίου Λυκείου Αυλωναρίου Ευβοίας (2003)

Πρακτική Άσκηση:

1/4/06-30/6/06: τρίμηνη πρακτική άσκηση στα πλαίσια του προγράμματος ΕΠΕΑΕΚ II στο Α΄ Ενδοκρινολογικό Τμήμα- Διαβητολογικό Κέντρο του Π.Γ.Ν.Α «Αλεξάνδρα», Αθήνα

Ξένες Γλώσσες:

- English, First Certificate in English, University of Cambridge, 1998
- English, Certificate of Proficiency in English, University of Michigan, 2001
- French, DELF 1 –DIPLOME D’ ETUDES EN LANGUE FRANCAISE- 1er degree, 1999
- French, DELF 2 –DIPLOME D’ ETUDES EN LANGUE FRANCAISE- 2nd degree, 2000

Γνώσεις Η/Υ

MS Office, Windows XP, Internet applications, GraphPad Prism 5.0, EndNote, BLAST, PyMOL, Adobe Photoshop

Πρωτότυπες Δημοσιεύσεις:

1. **Σαμαρά Π.** Μελέτη της επίδρασης της προθυμοσίνης α και των ανοσοδραστικών της πεπτιδίων στις αντιμικροβιακές λειτουργίες των ουδετερόφιλων ασθενών με καρκίνο. **Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, ΕΚΠΑ, 2008
2. Kyriakidis I, **Samara P**, Papa A. Serum TNF- α , sTNFR1, IL-6, IL-8 and IL-10 levels in Weil's syndrome. *Cytokine* 2011, 54:117-20
3. Ioannou K, **Samara P**, Livaniou E, Derhovanessian E, Tsitsilonis OE. Prothymosin alpha: ubiquitous polypeptide with potential use in cancer diagnosis and therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2012, 61:599-614
4. Argyropoulou A, **Samara P**, Tsitsilonis O, Skaltsa H. Polar constituents of Marrubium thessalum Boiss. & Heldr. (Lamiaceae) and their cytotoxic/cytostatic activity. *Phytother Res* 2012, 12:1800-06
5. **Samara P**, Ioannou K, Neagu M, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Voelter W, Tsitsilonis O. The C-terminal decapeptide of prothymosin α is responsible for its stimulatory effect on the functions of human neutrophils in vitro. *Int Immunopharmacol* 2013, 15:50-57
6. **Samara P**, Kalbacher H, Ioannou K, Radu DL, Livaniou E, Promponas VJ, Voelter W, Tsitsilonis O. Development of an ELISA for the quantification of the C-terminal decapeptide prothymosin α (100-109) in sera of mice infected with bacteria. *J Immunol Methods* 2013, 395:54-62
7. Ioannou K, Derhovanessian E, Tsakiri E, **Samara P**, Kalbacher H, Voelter W, Trougakos IP, Pawelec G, Tsitsilonis OE. Prothymosin α and a prothymosin α -derived peptide enhance T(H)1-type immune responses against defined HER-2/neu epitopes. *BMC Immunol* 2013, 14:43
8. Daniilides K, Lougiakis N, Pouli N, Marakos P, **Samara P**, Tsitsilonis O. Design, Synthesis and Cytotoxic Activity Evaluation of New Aminosubstituted Benzofurans. *Med Chem* 2013, in press

Peer-reviewed Conference Proceedings Papers

- Ioannou K, **Samara P**, Kavrohorianou N, Bega C, Thyfronitis G, Haralambous S, Tsitsilonis O. The C-terminal decapeptide of prothymosin α induces a Th1-type immune response in vitro and retards tumor growth in vivo. *Cytokine* 2010, 52:47
- Ioannou K, Derhovanessian E, **Samara P**, Voutsas I, Voelter W, Kalbacher H, Pawelec G, Tsitsilonis O. Prothymosin α and its carboxy-terminal decapeptide

proTa(100-109) induce Th1-type tumor-specific immune responses. *European Journal of Cancer* 2012; 48: 259-260

- **Samara P**, Ioannou K, Kavrohorianou N, Voutsas I, Kappa N, Williams E, Haralambous S, Tsitsilonis O. Immune responses induced by the TLR-4 agonist-based adjuvant prothymosin alpha. *ASCO Annual Meeting* 2014

Συμμετογή σε ερευνητικά προγράμματα:

- **Τίτλος:** Επίδραση της Προθυμοσίνης α στη λειτουργικότητα ανθρώπινων ουδετερόφιλων και εφαρμογή τους σε *in vivo* πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας του καρκίνου.
Χορηγός: Ειδικός Λογαριασμός Κονδυλίων Έρευνας, ΕΚΠΑ
Επιστημονικός υπεύθυνος: Επικ. Καθηγήτρια Ο. Τσιτσιλώνη
- **Τίτλος:** Μελέτη της δράσης φυτικών ορμονών και δραστικών αναλόγων τους στα λεμφοκύτταρα. Εκτίμηση της δυνατότητας χρησιμοποίησής τους στην ενίσχυση των ανοσολογικών απαντήσεων καρκινοπαθών
Χορηγός: Ειδικός Λογαριασμός Κονδυλίων Έρευνας, ΕΚΠΑ
Επιστημονικός υπεύθυνος: Επικ. Καθηγήτρια Ο. Τσιτσιλώνη
- **Τίτλος:** Development of a novel immunoassay for the very early detection of biothreatening bacterial infections
Χορηγός: NATO SfP No. 982838
Επιστημονικός υπεύθυνος: Καθ. W. Voelter, Dr. M. Neagu
- **Τίτλος:** Ανοσολογικές απαντήσεις του καρβοξυτελικού δεκαπεπτιδίου της προθυμοσίνης α. **Χορηγός:** ΙΚΥ, ΙΚΥΔΑ 2010/065
Επιστημονικός υπεύθυνος: Επικ. Καθηγήτρια Ο. Τσιτσιλώνη
- **Τίτλος:** ELISA development for the quantification of a novel marker of bacterial infection, decapeptide proTa(100-109), in blood plasma
Χορηγός: Ίδρυμα Λάτση
Επιστημονικός υπεύθυνος: Επικ. Καθηγήτρια Ο. Τσιτσιλώνη
- **Τίτλος:** Integrating the emerging research potential of the University of Athens Cancer Research Group in the European Research area (INsPiRE).
Χορηγός: EU FP7 Capacities REGPOT-CT-2011-284460
Επιστημονικός υπεύθυνος: Καθηγητής Χρ. Κίττας

Σεμινάρια:

2ο Πανελλήνιο Σεμινάριο Πειραματικής Βιοϊατρικής Έρευνας, της Ελληνικής Εταιρείας Βιοϊατρικής Έρευνας & Ζώων Εργαστηρίου (Νοέμβριος 2008)

Επιστημονικές επισκέψεις-εκπαίδευση:

- Immunobiology Laboratory, Victor Babes National Institute, Bucharest, Romania (Head Dr. Monica Neagu)
- Institute of Physiological Chemistry, Medical and Natural Sciences Research Center, University of Tübingen, Tübingen, Germany (Head Dr. Hubert Kalbacher)

Μέλος Επιστημονικών Εταιρειών:

- Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας
- Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ)

Διακρίσεις-Βραβεία:

Έπαινος για καλύτερη εργασία βασικής έρευνας στα πλαίσια του 37^{ου} Ετήσιου Πανελλήνιου Ιατρικού Συνεδρίου για την εργασία με τίτλο: Μελέτη επαγόμενων ανοσοαπαντήσεων από νέους συνθετικούς αναστολείς του MIF. Έλεγχος της αντικαρκινικής τους δραστηριότητας *in vivo*.

Ανακοινώσεις σε συνέδρια:

Εθνικά Συνέδρια

- Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο: 12 προφορικές παρουσιάσεις (2007-2013)
- Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών: 10 αναρτημένες ανακοινώσεις και προφορικές παρουσιάσεις (2007-2013)
- Πανελλήνιο Συνέδριο Φαρμακευτικών Επιστημών: 1 αναρτημένη ανακοίνωση (2012)
- Πανελλήνιο Συνέδριο Ανοσολογίας: 2 αναρτημένες ανακοινώσεις (2007, 2013) και δύο προφορικές παρουσιάσεις (2010, 2013)

Διεθνή Συνέδρια

- Ioannou K, **Samara P**, Kalbacher H, Voelter W, Tsitsilonis O.E. Elucidation of the immunomodulatory effects and mode of action of prothymosin alpha and its immunoreactive carboxy-terminal decapeptide. *15th FEBS Summer School on Immunology, Immune System: Genes, Receptors and Regulation*, Hvar, Croatia, September 2009

- Tsitsilonis OE, Ioannou K, **Samara P**, Skopeliti M, Voutsas I, Neagu M, Constantin C, Kalbacher H, Voelter W. Tumor immunotherapeutic strategies using novel immunomodulators. Invited speech, *6th Balkan Congress of Immunology of BAIS*, Sibiu, Romania, April-May 2010
- Ioannou K, **Samara P**, Kavrohorianou N, Bega C, Thyfronitis G, Haralambous S, Tsitsilonis O. The C- terminal decapeptide of prothymosin α induces a Th1- type immune response in vitro and retards tumor growth in vivo. Oral presentation and publication in *Proceedings of the 8th Joint Conference of the ICS and ISICR, Cytokines 2010*, Chicago, October 2010
- Ioannou K, Derhovanessian E, **Samara P**, Voutsas IF, Kalbacher H, Voelter W, Pawelec G, Tsitsilonis O.E. Prothymosin alpha and its carboxy-terminal decapeptide proTalpha(100-109) induce Th1-type tumor specific immune responses. *22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research*, Barcelona, Spain, July 2012
- **Samara P**, Ioannou K, Neagu M, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Voelter W, Tsitsilonis O. The decapeptide prothymosin α (100-109) stimulates the functions of breast cancer patient-derived neutrophils. *Progress in Combination Therapy of Cancer using Novel Immunomodulators*, Athens, Greece, November 2012
- Ioannou K, Derhovanessian E, Tsakiri E, **Samara P**, Kalbacher H, Voelter W, Trougakos I, Pawelec G, Tsitsilonis O. Prothymosin α and its carboxy-terminal decapeptide proT α (100-109) induce T_H1-type tumor-reactive immune responses via Toll-like receptor-4 signaling. *Progress in Combination Therapy of Cancer using Novel Immunomodulators*, Athens, Greece, November 2012
- Ioannou K, **Samara P**, Williams ED, Kappa N, Fortis S, Kavrohorianou A, Haralambous S, Tsitsilonis O. *Ageing and Cancer cell biology: Convergent and divergent molecular mechanisms*, Athens, Greece, June 2013
- **Samara P**, Ioannou K, Kavrohorianou N, Voutsas I, Kappa N, Williams E, Haralambous S, Tsitsilonis O. Immune responses induced by the TLR-4 agonist-based adjuvant prothymosin alpha. *ASCO Annual Meeting*, Chicago, Illinois, May 2014