



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ  
ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΑΘΗΝΩΝ**

**ΕΛΛΗΝΙΚΟ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ  
ΠΑΣΤΕΡ**



**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΕΚΠΑ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ & ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Μελέτη της επίδρασης του συζευγμένου με οξειδωμένη μαννάνη MOG35-55 πεπτιδίου στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των μυελοειδικών T λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ κατά την Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα.**

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΔΑΓΚΩΝΑΚΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ**

**ΑΜ: 20150335**

**ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ: 2016-2017**

**Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής**

**Κουτσιλιέρης Μιχάλης**, Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ  
**Βαϊόπουλος Γιώργος**, Ομ. Καθηγητής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ  
**Probert Lesley**, Ερευνήτρια Α', Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

**ΑΘΗΝΑ 2017**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ. Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στα άτομα και τους φορείς που συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της εργασίας αυτής

Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω την Ερευνήτρια Α' και επικεφαλής του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής, Lesley Probert η οποία ήταν η επιστημονική υπεύθυνη της εργασίας μου. Την ευχαριστώ που με δέχτηκε στο εργαστήριο της και μου πρόσφερε την καθοδήγηση της και τις επιστημονικές της γνώσεις σε όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας καθώς και για την υποστήριξη της και την πίστη της σε εμένα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Μαρία Ευαγγελίδου, η συμβολή της οποίας ήταν επίσης καθοριστική για την υλοποίηση αυτής της εργασίας. Την ευχαριστώ θερμά για την προθυμία και την υπομονή που έδειξε κατά την περίοδο εκπαίδευσης μου, για τις γνώσεις και την υποστήριξη της αλλά και για την προσφορά της τόσο στο θεωρητικό όσο και στο πρακτικό μέρος αυτής της εργασίας. Επίσης αξίζει να αναφερθεί η συμβολή όλων των συναδέλφων στην ομαλή ένταξη μου στο εργαστήριο και στην πληρέστερη κατάρτισή μου. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Μαρία Καραμίτα η οποία ήταν πάντα φιλική και υποστηρικτική, την υποψήφια διδάκτορα Ειρήνη Παπαζιάν που ήταν πάντα πρόθυμη να βοηθήσει, την προπτυχιακή φοιτήτρια Αθηνά Μπούτου για την στήριξη της και τα μέλη της ομάδας Φλεγμονής, Φώτη Μπαντούνα και Μελίνα Μαρκογιαννάκη για τη δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος στο εργαστήριο. Τέλος δεν μπορώ φυσικά να παραλείψω τα προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου, τις προπτυχιακές φοιτήτριες Μαρία Αυλωνίτη και Λήδα Ηλιοπούλου, τις τεχνικούς Ελένη Μαλακτάρη και Παναγιώτα Μαυροειδή και τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Φώτη Ιωακιμείδη που με βοήθησαν στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο αυτής της διπλωματικής και διευθυντή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία Μιχάλη Κουτσιλιέρη που μου έδωσε την ευκαιρία να παρακολουθήσω ένα τόσο ενδιαφέρον πρόγραμμα σπουδών. Ευχαριστώ εκ των προτέρων τα μέλη της Τριμελούς επιτροπής που θα κρίνουν την εργασία αυτή σήμερα.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς στους φίλους που ήταν πάντα δίπλα μου, στην οικογένεια μου, και ειδικά στους γονείς μου, οι οποίοι με στηρίζουν σε κάθε βήμα μου και χωρίς αυτούς δεν θα είχα καταφέρει, ότι έχω καταφέρει μέχρι σήμερα.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |    |
|---|----|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....   | 2  |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....  | 5  |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ .....   | 6  |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....   | 7  |
| ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ (ΣΚΠ) .....   | 7  |
| Διάγνωση της ΣΚΠ .....  | 7  |
| Επιδημιολογία .....   | 8  |
| Παθοφυσιολογία της ΣΚΠ .....  | 8  |
| Κλινικά στάδια .....  | 9  |
| Αιτιολογία της ΣΚΠ .....  | 10 |
| Αντιμετώπιση .....  | 13 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ (ΠΑΕ).....  | 16 |
| Ιστορικά Στοιχεία .....   | 16 |
| Η Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα στον ποντικό .....  | 17 |
| Η ΠΑΕ στην ανάπτυξη ανοσοτροποποιητικών θεραπειών για τη ΣΚΠ .....                                    | 21 |
| Στόχευση μυελινικών πεπτιδίων σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μέσω σύζευξης<br>τους με μαννάνη ..... | 22 |
| Σκοπός της εργασίας .....   | 24 |
| ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....   | 25 |
| Περιγραφή της πειραματικής πορείας.....   | 25 |
| Ποντικοί: Σειρές, συνθήκες και γενοτύπηση.....  | 26 |
| Δημιουργία Χιμαιρικών Ποντικών.....   | 27 |
| Σύνθεση του πεπτιδίου μυελίνης MOG35-55 του ποντικού .....  | 27 |
| Χορήγηση των συζευγμένων με μαννάνη πεπτιδίων στους ποντικούς.....                                    | 27 |
| Επαγωγή της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας .....  | 28 |
| Θυσία των δοτών και απομόνωση των κυττάρων από τη σπλήνα και τους λεμφαδένες ....                     | 28 |
| Χρώση με φθορίζον CFDA-SE και μεταφορά στους ποντικούς δέκτες .....                                   | 29 |
| Παρακολούθηση και θυσία των δεκτών .....  | 30 |
| Απομόνωση κυττάρων από τις μήνιγγες του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού.....                        | 30 |
| Απομόνωση κυττάρων από το παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού .....   | 31 |
| Απομόνωση και μονιμοποίηση των κυττάρων των λεμφαδένων και της σπλήνας.....                           | 31 |
| Χρώση των λευκοκυττάρων με φθορίζοντα αντισώματα έναντι των αντιγόνων CD45.1 και<br>CD45.2 .....      | 32 |

|  |    |
|--|----|
| Ανάλυση των δειγμάτων στο FACS.....  | 32 |
| Επαγωγή θανάτου μέσω ενεργοποίησης .....   | 33 |
| Στατιστική Ανάλυση .....   | 34 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....   | 36 |
| Τα MOG-ειδικά CD4 T λεμφοκύτταρα που έχουν εκτεθεί σε OM-MOG εκδηλώνουν καθυστερημένη είσοδο στο ΚΝΣ αλλά στη συνέχεια έντονη διήθηση στο παρέγχυμα του ΚΝΣ κατά την ΠΑΕ ..... | 36 |
| Τα ενεργοποιημένα MOG-ειδικά T λεμφοκύτταρα δεν διατηρούν την μειωμένη ικανότητα αντιγόνο-ειδικού πολλαπλασιασμού όταν μεταφέρονται σε μη εμβολιασμένους δέκτες ...            | 39 |
| Το OM-MOG δεν καθιστά τα MOG- ειδικά κύτταρα επιρρεπή σε απόπτωση.....   | 43 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....  | 45 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....   | 53 |

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Σκλήρυνση Κατά Πλάκας (ΣΚΠ) είναι μία χρόνια, φλεγμονώδης, νευροεκφυλιστική ασθένεια του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), στην οποία το ανοσοποιητικό παίζει καθοριστικό ρόλο προκαλώντας απομυελίνωση, εκφυλισμό των αξόνων και προοδευτική νευρολογική δυσλειτουργία. Η Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ) είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη της ανοσοπαθογένειας της ΣΚΠ και μπορεί να επαχθεί σε πειραματόζωα μέσω ανοσοποίησης με πεπτίδια μυελίνης. Πρόσφατη δημοσίευση της ερευνητικής μας ομάδας έδειξε πως τα πεπτίδια μυελίνης συζευγμένα με την οξειδωμένη μορφή της μαννάνης (OM), ενός πολυσακχαρίτη του ζυμομήκυτα, επάγουν πεπτιδο-ειδική περιφερειακή ανοχή των T λεμφοκυττάρων και προστατεύουν έναντι της ΠΑΕ όταν χορηγούνται προφυλακτικά ή θεραπευτικά σε ποντικούς. Η ανοχή των T λεμφοκυττάρων χαρακτηρίζεται από μειωμένη απόκριση αντιγόνο-ειδικού πολλαπλασιασμού, και μειωμένη παραγωγή της IL-2 και του υποδοχέα της (CD25) από τα CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα, χαρακτηριστικά που αντιστρέφονται όταν γίνει επώαση με εξωγενή IL-2, σε συμφωνία με το μηχανισμό της ανέργειας των T λεμφοκυττάρων. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε αν η χορήγηση του πεπτιδίου OM-MOG<sub>35-55</sub> (OM-MOG) επάγει ανοχή των T λεμφοκυττάρων επηρεάζοντας την ικανότητα τους να μεταναστεύουν στο ΚΝΣ ή αλλάζοντας την ευαισθησία τους στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου μέσω ενεργοποίησης. Δημιουργήσαμε χημεικούς ποντικούς με τη χρήση συνδυασμών διαφορετικών στελεχών ποντικών (συνισσογενή στελέχη CD45.1 και αγρίου τύπου ή διαγονιδιακά στελέχη CD45.2 με ή χωρίς MOG-ειδικό TCR) ως δότες και δέκτες περιφερικών ανοσοκυττάρων. Μεταφέραμε σπληνοκύτταρα και κύτταρα από λεμφαδένες σημασμένα με CFSE από δότες που είχαν εμβολιαστεί με το OM-MOG ή PBS (ομάδα ελέγχου) σε δέκτες με ενεργό ΠΑΕ, οι οποίοι δεν είχαν εμβολιαστεί. Η απομόνωση των CFSE<sup>+</sup> κυττάρων από τους ιστούς των δεκτών 5-7 ημέρες μετά τη μεταφορά και η ανάλυση με FACS έδειξε πως τα OM-MOG κύτταρα χάνουν τον φαινότυπο μειωμένου πολλαπλασιασμού τους και μεταναστεύουν στο ΚΝΣ ακόμη και με μία καθυστέρηση σε σχέση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου. Επίσης μελετήθηκε η ευπάθεια στην απόπτωση των CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων από ποντικούς εμβολιασμένους με OM-MOG ή PBS (ομάδα ελέγχου). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα κύτταρα που απομονώθηκαν από τους εμβολιασμένους με OM-MOG ποντικούς δεν εμφανίζουν αυξημένο θάνατο μετά από ενεργοποίηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το OM-MOG επάγει ανοχή είτε μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με τα MOG-ειδικά T λεμφοκύτταρα είτε μέσω της επαγωγής ενός ανεξάρτητου πληθυσμού ανοσορυθμιστικών κυττάρων.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, inflammatory, neurodegenerative disease of the CNS in which the immune system plays a prominent role, resulting in demyelination, axonal degeneration and progressive neurological disability. Experimental

Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) is a powerful tool for studying immunopathogenesis in MS that can be induced in animals by immunization with myelin antigens. Recently we showed that myelin peptides conjugated to an oxidized form of the yeast polysaccharide mannan (OM) induces peptide-specific peripheral T cell tolerance and protection against EAE when administered prophylactically or therapeutically in mice. Tolerance in splenocytes and lymph node cells is characterized by reduced peptide-specific proliferation responses, and IL-2, and IL-2 receptor (CD25) production by CD4<sup>+</sup> T cells, defects reversed by incubation with IL-2 in accordance with a T cell anergy model. In this study we investigated whether OM-MOG<sub>35-55</sub> peptide (OM-MOG) administration modulates disease by affecting the ability of T cells to migrate into the CNS or by increasing their sensitivity to activation-induced cell death. We generated chimeric mice using combinations of CD45.2 (wild type C57BL/6) and CD45.1 (congenic C57BL/6) mice with or without the 2D2 MOG<sub>35-55</sub>-specific TCR transgene in the transferred donor immune cells.

CFSE-labeled splenocytes and lymph node cells isolated from donor mice that had been previously tolerized or not by vaccination with OM-MOG or PBS, respectively, were adoptively transferred into recipient mice with ongoing MOG-EAE. Isolation of CFSE-labeled cells from tissues of the EAE mice 5-7 days after transfer revealed that OM-MOG-tolerized cells showed equal proliferation and unimpaired migration into secondary lymphoid and CNS tissues compared to non-tolerized cells, albeit with a small delay in reaching the CNS tissues (meninges and parenchyma). We next tested whether the T cells isolated from OM-MOG tolerized mice showed increased susceptibility to apoptosis that might be associated with their anergic phenotype and inability to induce EAE. Our results show that OM-MOG tolerized T cells don't show increased apoptosis after activation induced cell death assay, compared to their controls. These results indicate that OM-MOG imposes T cell tolerance either through direct interaction with MOG-specific T cells or through induction of an independent population of immune regulatory cells

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ (ΣΚΠ)

Η Σκλήρυνση Κατά Πλάκας (ΣΚΠ), ή Πολλαπλή Σκλήρυνση, ή Διάχυτη Σκλήρυνση, όπως είναι γνωστή είναι μία χρόνια, φλεγμονώδης και εκφυλιστική ασθένεια του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Χαρακτηρίζεται από την καταστροφή της μυελίνης (του μονωτικού περιβλήματος των νευραξόνων), δημιουργώντας προβλήματα στην (Miller, Karpus et al. 2007) επικοινωνία των νευρώνων και αποτελεί την κύρια αιτία χρόνιας κινητικής δυσλειτουργίας στους νέους ανθρώπους. Για πολλά χρόνια η ΣΚΠ θεωρούνταν ως ασθένεια που εμπλέκεται μόνο το ανοσοποιητικό σύστημα και προκαλούσε το ενδιαφέρον μόνο των ανοσολόγων. Το σκηνικό άλλαξε στα μέσα της δεκαετίας του 1990 όπου αναγνωρίστηκε ότι η νευροεκφυλιστική διαδικασία που λαμβάνει χώρα, η οποία δεν ανταποκρίνεται σε ανοσοκατασταλτικές θεραπείες, είναι υπεύθυνη για τα νευρολογικά συμπτώματα των ασθενών. Η διαπίστωση αυτή έγινε χάρη στα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών, προκαλώντας έτσι το ενδιαφέρον των νευρολόγων στην έρευνα για την ασθένεια. (Hauser, Oksenberg 2006)

Το όνομα Σκλήρυνση Κατά Πλάκας αναφέρεται στις ουλές (γνωστές και ως πλάκες) που σχηματίζονται στο νευρικό σύστημα. Οι βλάβες αυτές επηρεάζουν κυρίως τη λευκή ουσία στο οπτικό νεύρο, το στέλεχος, τα βασικά γάγγλια και το νωτιαίο μυελό ή τη λευκή ουσία κοντά στις πλευρικές κοιλίες του εγκεφάλου. (Compston, Coles 2008)

#### Διάγνωση της ΣΚΠ

Τα κλινικά συμπτώματα και σημεία της ΣΚΠ ποικίλουν μπορεί να περιλαμβάνουν οπτικά, κινητικά αισθητικά και μονοπάτια του στελέχους του εγκεφάλου. Η πλειοψηφία των ασθενών αρχικά παρουσιάζουν επεισόδια νέων ή επαναλαμβανόμενων νευρολογικών συμπτωμάτων που εμφανίζονται και υποχωρούν. (Garg, Smith 2015) Τα διαγνωστικά κριτήρια της ΣΚΠ βασίζονται στην αξιολόγηση των κλινικών συμπτωμάτων αλλά και σε εργαστηριακά ευρήματα. Δίνεται έμφαση στην απόδειξη της παρουσίας απομυελινωτικών αλλοιώσεων σε διαφορετικούς χρόνους και περιοχές καθώς και στον αποκλεισμό άλλων διαγνώσεων (Polman, Reingold et al. 2005; Polman, Reingold et al. 2011) Η μόνη οριστική επιβεβαίωση της διάγνωσης είναι η ιστοπαθολογία αλλά η βιοψία είναι πολύ σπάνια. (Tsang, Macdonell 2011)

Τα λεγόμενα κριτήρια του McDonald που αναθεωρήθηκαν το 2010 από την Διεθνή επιτροπή για τη διάγνωση της ΣΚΠ (International Panel on Diagnosis of MS) περιλαμβάνουν σαφείς οδηγίες για τη χρήση απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού, οπτικών προκλητών δυναμικών και ανάλυσης εγκεφαλονωτιαίου υγρού για φλεγμονώδεις δείκτες με σκοπό την επίσπευση της διάγνωσης. (<http://www.nationalmssociety.org>) (Gronseth, Ashman 2000) Η παρουσία των αλλοιώσεων σε διαφορετικούς χρόνους και περιοχές επιβεβαιώνεται με απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού. (Rashid, Miller 2008).

## Επιδημιολογία

Η ΣΚΠ είναι μία ασθένεια που σήμερα πλήττει τις γυναίκες σε διπλάσιο βαθμό από ότι τους άνδρες, γεγονός που παρατηρείται και σε άλλες ασθένειες που θεωρείται ότι είναι αυτοάνοσης αιτιολογίας.(Compston, Coles 2008). Υπολογίζεται ότι 2,500,000 άτομα παγκοσμίως πάσχουν από ΣΚΠ, 500,000 εκ των οποίων βρίσκονται στην Ευρώπη (Dendrou, Fugger et al. 2015). Στις Ηνωμένες Πολιτείες περίπου 400,000 άτομα έχουν διαγνωσθεί με ΣΚΠ και γίνεται διάγνωση σε περίπου 10,000 νέες περιπτώσεις το χρόνο.(DiPiro 2011; Goldenberg 2012). Στη χώρα μας υπολογίζεται ότι πάσχουν περίπου 10,000-12,000 άτομα. (<http://msassociationhellas.org/>). Η ασθένεια πλήττει περίπου 7 άτομα ανά 100,000 κάθε χρόνο με επιπολασμό περίπου 120 ανά 100,000, και με κίνδυνο εμφάνισης στη διάρκεια σε 1 στα 400 άτομα. Το 80% των περιπτώσεων παρουσιάζουν την υποτροπιάζουσα διαλείπουσα μορφή της νόσου. Περίπου στο 25% των ασθενών δεν επηρεάζονται οι καθημερινές δραστηριότητες, ενώ περίπου το 15% των περιπτώσεων αντιμετωπίζει σοβαρά προβλήματα κινητικότητας σε σύντομο χρονικό διάστημα. Στο περίπου 20% των ασθενών η νόσος έχει την προϊούσα μορφή της από το ξεκίνημά της, γι αυτό καλείται και πρωτοπαθής προϊούσα. Η έναρξη της νόσου συνήθως συμβαίνει κατά την 3<sup>η</sup> ή 4<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής, ενώ το 2% των ασθενών η νόσος παρουσιάζεται πριν την ηλικία των 10 ετών και στο 5% πριν την ηλικία των 16 ετών. Σε γενικές γραμμές, το προσδόκιμο ζωής είναι τουλάχιστον 25 χρόνια από την έναρξη της νόσου, με το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών να πεθαίνουν από μη σχετιζόμενα αίτια.(Compston, Coles 2008)

## Παθοφυσιολογία της ΣΚΠ

Η ΣΚΠ χαρακτηρίζεται από την παρουσία περιοχών με έντονη απομυελίνωση στη λευκή αλλά και στη φαιά ουσία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού που καλούνται πλάκες ή ουλές. Οι ουλές αυτές υποδηλώνουν την απώλεια του μονωτικού καλύμματος των νευρώνων, της μυελίνης, αλλά και την απώλεια ολιγοδενδροκυττάρων, των κυττάρων που συνθέτουν και διατηρούν τη μυελίνη στο ΚΝΣ. (Dendrou, Fugger et al. 2015). Υπό φυσιολογικές συνθήκες η μυελίνη είναι συμπαγής και περιβάλλει τους νευρώνες παρέχοντας ένα μονωτικό κάλυμμα που διακόπτεται από τους κόμβους του Ranvier και εξυπηρετεί στην κατά άλματα μετάδοση του σήματος στους νευράξονες. Κατά την ΣΚΠ η απομυελίνωση των νευραξόνων δυσκολεύει την κατά άλματα μετάδοση του σήματος και έτσι υπάρχει καθυστέρηση στην επικοινωνία των νευρώνων. Ωστόσο υπάρχει επικοινωνία μεταξύ των γειτονικών νευρώνων που έχουν υποστεί απομυελίνωση, με αποτέλεσμα την εμφάνιση παροξυσμικών συμπτωμάτων, όπως νευραλγία τριδύμου, αταξία, δυσαρθρία, ή επώδυνη τετανία των άκρων που διαρκεί ένα με δύο λεπτά και υποκινείται συχνά από την αφή ή την κίνηση (Compston, Coles 2008). Παρόλο που οι νευρώνες και οι νευράξονες δεν καταστρέφονται στα πρώτα στάδια της ΣΚΠ, κατά την προοδευτική μορφή της νόσου υπάρχει απώλεια νευραξόνων η οποία σχετίζεται με το βαθμό απώλειας της κινητικότητας των ασθενών. Οι περιοχές που έχουν υποστεί απομυελίνωση μπορούν να ανακάμψουν προσωρινά μέσω της διαδικασίας της επαναμυελίνωσης. Στη φαιά ουσία η απομυελίνωση απαντάται στο φλοιό, τους πυρήνες και στο νωτιαίο μυελό. (Popescu, Lucchinetti 2012).



Η φλεγμονή είναι παρούσα σε όλα τα στάδια της νόσου αλλά είναι πιο έντονη στην οξεία φάση παρά στην χρόνια. Οι νέες βλάβες χαρακτηρίζονται από την παρουσία περιφερειακών κυττάρων του ανοσοποιητικού, τα οποία έχουν εισβάλλει χάρη στη διακοπή της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Τα κύτταρα αυτά είναι κατά κύριο λόγο μακροφάγα, CD8 T λεμφοκύτταρα, ενώ απαντώνται μικρότεροι αριθμοί CD4 T λεμφοκυττάρων, B λεμφοκυττάρων και πλασματοκυττάρων. (Dendrou, Fugger et al. 2015) Καθώς η νόσος προχωράει είναι διάχυτη η παρουσία των φλεγμονοδών T και B λεμφοκυττάρων και παρατηρείται ενεργοποίηση της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων, καθώς και διάχυτη απώλεια της μυελίνης και βλάβη των νευραξόνων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ατροφία της λευκής και φαιάς ουσίας (Popescu, Lucchinetti 2012). Παρόλο που η σύσταση των T λεμφοκυττάρων δεν αλλάζει καθ' όλη την πορεία της νόσου, το σχετικό ποσοστό B λεμφοκυττάρων και πλασματοκυττάρων αυξάνει. (Frischer, Bramow et al. 2009) Η μικρογλοία και τα μακροφάγα παραμένουν σε μία διαρκή κατάσταση ενεργοποίησης καθ' όλη τη διάρκεια της νόσου. (Fischer, Sharma et al. 2012)

Τελικώς η φλεγμονή γίνεται οργανωμένη μέσα στο ΚΝΣ, με λιγότερα κύτταρα να εισβάλλουν στις βλάβες κατά την πρόοδο της ασθένειας. Στην δευτεροπαθή προϊούσα μορφή της ΣΚΠ, έχει δειχθεί ότι τριτογενείς λεμφοειδείς δομές σχηματίζονται στις μήνιγγες, οι οποίες πιθανόν να συμβάλλουν στην απομυελίνωση του φλοιού και στην ιστική βλάβη που παρατηρείται σε μετέπειτα στάδια. (Popescu, Lucchinetti 2012)

## **Κλινικά στάδια**

Η κλινική πορεία της ΣΚΠ μπορεί να ποικίλει με την πρόοδο του χρόνου, όμως σε γενικές γραμμές χαρακτηρίζεται είτε από σύντομες περιόδους με έντονη συμπτωματολογία που σύντομα υποχωρεί, είτε από σταδιακή προοδευτική επιδείνωση των συμπτωμάτων ή από το συνδυασμό των δύο. Σύμφωνα με τις αναθεωρημένες οδηγίες του 2014 υπάρχουν τέσσερις υπότυποι της ΣΚΠ: 1) Κλινικά Απομονωμένο Σύνδρομο, 2) Υποτροπιάζουσα-Διαλείπουσα ΣΚΠ, 3) Πρωτοπαθής Προϊούσα ΣΚΠ και 4) Δευτεροπαθής Προϊούσα ΣΚΠ. (Lublin, Reingold et al. 2014).

### Κλινικά απομονωμένο σύνδρομο (Clinically Isolated Syndrome, CIS)

Ως Κλινικά Απομονωμένο Σύνδρομο (CIS) ορίζεται η ασθένεια που χαρακτηρίζεται από την πρώτη εκδήλωση νευρολογικών συμπτωμάτων που διαρκούν περισσότερο από 24 ώρες και οφείλονται στη φλεγμονή ή/και απομυελίνωση στο ΚΝΣ, η οποία θα μπορούσε να είναι ΣΚΠ αλλά δεν πληροί ακόμα το κριτήριο της διασποράς στο χρόνο. (<http://www.nationalmssociety.org>) (Miller, Barkhof, Montalban et al. 2005). Το 30-70% των ασθενών με CIS θα αναπτύξει ΣΚΠ και η παρουσία κλινικά σιωπηλών απομυελινωτικών βλαβών στην MRI αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης ΣΚΠ. (Miller, Barkhof, Montalban et al. 2005)

### Ακτινολογικά Απομονωμένο Σύνδρομο (Radiologically Isolated Syndrome, RIS)

Το Ακτινολογικά Απομονωμένο Σύνδρομο (RIS) αποτελεί μία πιο περίπλοκη κατάσταση κατά την οποία γίνεται ανίχνευση απομυελινωτικών βλαβών χωρίς την παρουσία νευρολογικών συμπτωμάτων (Lebrun, Bensa et al. 2009; Okuda, Mowry, Beheshtian et al. 2009; Siva, Saip et al. 2009). Αλλαγές στις βλάβες που ανιχνεύονται με MRI υποδηλώνουν απομυελινωτική παθολογία και θεωρούνται παράγοντας

κινδύνου για μελλοντική ανάπτυξη ΣΚΠ. (Okuda, Mowry, Beheshtian et al. 2009). Τα άτομα με RIS πρέπει να παρακολουθούνται σε βάθος χρόνου.

#### Υποτροπιάζουσα Διαλείπουσα ΣΚΠ (Relapsing-Remitting MS, RRMS)

Η Υποτροπιάζουσα-Διαλείπουσα μορφή της ΣΚΠ είναι η πιο κοινή. Το 85% των ατόμων με ΣΚΠ διαγιγνώσκονται πρωταρχικά με αυτόν τον υπότυπο. (Goldenberg 2012). Χαρακτηρίζεται από περιόδους με επιδείνωση των νευρολογικών συμπτωμάτων (υποτροπές) τις οποίες διαδέχονται διαστήματα με βελτίωση ή απουσία των συμπτωμάτων της νόσου (υφέσεις). Ο υπότυπος αυτός χαρακτηρίζεται από την παρουσία φλεγμονής, κατά την οποία τα κύτταρα του ανοσοποιητικού προκαλούν μικρές εστίες βλαβών που ευθύνονται για τα κλινικά σημεία.

(<http://www.nationalmssociety.org>). Περίπου το 65% των ασθενών με Υποτροπιάζουσα-Διαλείπουσα ΣΚΠ θα αναπτύξουν αργότερα τη δευτεροπαθή-προϊούσα μορφή. (Compston, Coles 2008)

#### Πρωτοπαθής Προϊούσα ΣΚΠ (Primary Progressive MS, PPMS)

Η Πρωτοπαθής Προϊούσα μορφή παρατηρείται σε 10-15% των αρχικών διαγνώσεων για ΣΚΠ. (Miller, Leary 2007) Κύριο χαρακτηριστικό της είναι η συνεχής εξέλιξη της νόσου από τη στιγμή της εκδήλωσης, με περιστασιακή σταθερότητα και ελάχιστη βελτίωση των συμπτωμάτων που κρατάει για μικρό χρονικό διάστημα. Υπάρχει μία σταδιακή, σχεδόν συνεχής επιδείνωση των συμπτωμάτων, με ελάχιστες διακυμάνσεις και χωρίς ξεκάθαρες υποτροπές. (Lublin, Reingold 1996). Στη μορφή αυτή παρατηρείται σε μικρότερο βαθμό φλεγμονή σε σχέση με την Υποτροπιάζουσα-Διαλείπουσα μορφή και λιγότερες απομυελινωτικές βλάβες στον εγκέφαλο με μειωμένη παρουσία ανοσοκυττάρων. Οι ασθενείς με αυτόν τον υπότυπο εμφανίζουν μεγαλύτερα προβλήματα κινητικότητας. (<http://www.nationalmssociety.org>)

#### Δευτεροπαθής Προϊούσα ΣΚΠ (Secondary Progressive MS, SPMS)

Η Δευτεροπαθής Προϊούσα μορφή της ΣΚΠ ακολουθεί την Υποτροπιάζουσα Διαλείπουσα μορφή. Ποσοστό 65%-70% των ατόμων που έχουν διαγνωσθεί αρχικά με την Υποτροπιάζουσα-Διαλείπουσα μορφή, θα μεταπέσουν στη συνέχεια στη δευτεροπαθή προϊούσα μορφή. Η δευτεροπαθής εξέλιξη ορίζεται συνήθως ως μία περίοδος προοδευτικής επιδείνωσης των συμπτωμάτων, που είναι ανεξάρτητη από υφέσεις και διατηρείται τουλάχιστον για 6 μήνες. Στον υπότυπο αυτό είναι πιθανόν να υπάρχουν περιστασιακές υποτροπές, όπως και περίοδοι σταθερότητας. (Fitzner, Simons 2010)

#### Ασυνήθιστοι Τύποι ΣΚΠ

Εκτός από τις συνήθεις τύπους ΣΚΠ υπάρχουν και άλλες μορφές που πλήττουν μικρό ποσοστό του πληθυσμού. Αυτές μπορεί να είναι: η Πολλαπλή Σκλήρυνση Marburg, η Συγκεντρική Σκλήρυνση Baló η Νόσος Devic, η Διάχυτη Σκλήρυνση του Schilder, και η Οξεία Διάσπαρτη Εγκεφαλομυελίτιδα (Stadelmann, Bruck 2004).

#### **Αιτιολογία της ΣΚΠ**

Η αιτιολογία της ΣΚΠ παραμένει άγνωστη, ωστόσο θεωρείται ότι προκαλείται από δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος που οφείλεται σε γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. (Ascherio, Munger 2007) Η συχνότητα είναι

υψηλότερη σε χώρες της Βόρειας Ευρώπης (όπως η Ισλανδία, Μεγάλη Βρετανία αλλά και οι Σκανδιναβικές χώρες) καθώς στη Βόρεια Αμερική (κυρίως στον Καναδά) σε σχέση με χώρες της Ασίας και της Αφρικής. (Rosati 2001) Παρόλο που η ΣΚΠ δεν είναι κληρονομούμενη ασθένεια υπάρχει μία ισχυρή γενετική συνιστώσα στην αιτιολογία της όπως έχει δείχθει από την συγκέντρωση πολλών περιστατικών ΣΚΠ μέσα σε οικογένειες. (Garg, Smith 2015) Ο ρυθμός επανεμφάνισης μέσα στις οικογένειες είναι 15% και ο κίνδυνος εμφάνισης είναι υψηλότερος μεταξύ συγγενών πρώτου βαθμού ( για τα αδέρφια 3%, για τους γονείς 2% και για τους απογόνους 2%) σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Στην περίπτωση των μονοζυγωτικών διδύμων επηρεάζονται και τα δύο αδέλφια περίπου το 35% των φορών, ενώ το ποσοστό είναι περίπου 5% για τα μη μονοζυγωτικά δίδυμα. (Compston, Coles 2002; Garg, Smith 2015)

Ο ρόλος των T λεμφοκυττάρων θεωρούνταν πάντα κεντρικός στην παθογένεση της ΣΚΠ, κυρίως λόγω της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας, ζωικού μοντέλου της νόσου (βλέπε παρακάτω) αλλά και κυρίως λόγω της στενής σύνδεσης της νόσου με τα γονίδια HLA τάξης II (βλέπε παρακάτω). Ένας από τους βασικότερους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς περιλαμβάνει την εμπλοκή των αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων κυρίως των T βοηθητικών CD4+ Th1 και των Th17 τα οποία διηθούν στο ΚΝΣ και με την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών οδηγούν στην ενεργοποίηση φλεγμονωδών αποκρίσεων που καταλήγουν σε απομυελίνωση στον εγκέφαλο και στο νωτιαίο μυελό και στην καταστροφή των αξόνων. (Dargahi, Katsara et al. 2017) Η παρουσία των T λεμφοκυττάρων στον περιαγγειακό χώρο και στο παρέγχυμα επάγει την επιστράτευση περισσότερων T κυττάρων, όπως επίσης και B κυττάρων, δενδριτικών κυττάρων, μικρογλοιακών κυττάρων και κυττάρων φυσικών φονέων (NK cells). Τόσο οι κυτταροκίνες, όσο και στοιχεία του συμπληρώματος αλλά και η ενεργοποίηση της μικρογλοίας και των μακροφάγων είναι ικανά να προκαλέσουν απομυελίνωση και καταστροφή των αξόνων. Τα CD8+ εντοπίζονται επίσης στις βλάβες και είναι πιθανώς υπεύθυνα για τις βλάβες των νευρώνων μέσω της κυτταρομεσολαβούμενης κυτταροτοξικότητας. Παρόντα στις βλάβες είναι επίσης τα γδ T λεμφοκύτταρα. (Høglund 2014) Σε μελέτη δείχθηκε ότι παίζει ρόλο και η απώλεια λειτουργίας των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Viglietta et al. 2004). Ο ιδιαίτερα σημαντικός ρόλος των T λεμφοκυττάρων στη ΣΚΠ φαίνεται και σε μελέτες γενετικής, καθώς η πλειοψηφία των γενετικών πολυμορφισμών που έχουν ενοχοποιηθεί για ευπάθεια στη ΣΚΠ, βρίσκονται σε γενετικούς τόπους σημαντικούς για τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων. (Berge et al. 2016)

### Γενετική Προδιάθεση

Ο πρώτος γενετικός παράγοντας που έχει συνδεθεί με τη ΣΚΠ τη δεκαετία του 1970 είναι ο γενετικός τόπος του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου (Human Leukocyte Antigen, HLA). Η περιοχή αυτή βρίσκεται στον κοντό βραχίονα του έκτου χρωμοσώματος που καλείται μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC). Τα γονίδια αυτά εκφράζουν υψηλού πολυμορφισμού γλυκοπρωτεΐνες της επιφάνειας των κυττάρων που είναι πολύ σημαντικά στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος. (Muñoz-Culla, Irizar et al. 2013). Μακροχρόνιες πληθυσμιακές μελέτες έχουν δείξει τη συσχέτιση της ΣΚΠ με τα αλληλόμορφα DR15 και DQ6 ( συγκεκριμένα τα DRB1\*1501 και DQB2\*0602 αλληλόμορφα) των MHC τάξης II μορίων καθώς και με το γονίδιο του TNF μέσα στην ίδια ομάδα σύνδεσης. (Compston, Coles 2002) Πρόσφατα αλληλόμορφα του

γονιδίου άλφα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2 (IL-2RA) και του γονιδίου άλφα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 7 (IL-7RA) έχουν ταυτοποιηθεί ως κληρονομήσιμοι παράγοντες κινδύνου, ωστόσο οι περισσότεροι γενετικοί παράγοντες που μπορεί να σχετίζονται με την προδιάθεση για ανάπτυξη ΣΚΠ δεν έχουν ακόμη καθοριστεί. Η συσχέτιση της ΣΚΠ με τα γονίδια HLA και συγκεκριμένα με το DRB1\*1501 αλληλόμορφο είναι ένα σταθερό εύρημα σε όλες σχεδόν τις πληθυσμιακές μελέτες. (Oksenberg, Barcellos 2005). Ωστόσο τα HLA γονίδια δεν μπορούν από μόνα τους να εξηγήσουν τη γενετική συνιστώσα της ΣΚΠ. Με τα νέα εργαλεία γενετικής των τελευταίων δεκαετιών έλαβαν χώρα μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-Wide Association Studies, GWAS). Το 2011 στο Nature δημοσιεύτηκε μία λίστα με μη HLA υποψήφια γονίδια σχετιζόμενα με τη ΣΚΠ. (Sawcer, Hellenthal, Pirinen et al. 2011) Το συμπέρασμα ήταν ότι οι μηχανισμοί της κυτταρικής ανοσίας παίζουν βασικό ρόλο στην παθογένεια της ΣΚΠ και άνοιξαν νέοι δρόμοι για την κατανόηση της νόσου με βάση τα ανοσολογικά μονοπάτια και την απαπορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. (Muñoz-Culla, Irizar et al. 2013)

### Επίδραση του Περιβάλλοντος

Εκτός από του γενετικούς παράγοντες που σχετίζονται με την ευπάθεια στη ΣΚΠ, σημαντική είναι και η επίδραση του περιβάλλοντος στην έναρξη της νόσου. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως προκειμένου να δειχθεί η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στη ΣΚΠ. (Hauser, Oksenberg 2006; Ascherio, Munger 2007 I; Ascherio, Munger 2007 II). Οι παράγοντες αυτοί είναι είτε μολυσματικοί όπως ο ιός της λοιμώδους μονοπυρήνωσης, (Epstein-Barr virus, EBV), αλλά και μη μολυσματικοί παράγοντες όπως τα χαμηλά επίπεδα της βιταμίνης D , η διατροφή και το κάπνισμα. (Ascherio, Munger 2007 I) (Ascherio, Munger 2007 II).

Μελέτες μετανάστευσης υποστηρίζουν επίσης τη σημασία των περιβαλλοντικών παραγόντων στον κίνδυνο εμφάνισης ΣΚΠ. Η εμφάνιση της ΣΚΠ είναι συχνότερη σε χώρες που βρίσκονται μακριά από τον Ισημερινό με κάποιες εξαιρέσεις.(Compston, Coles 2008)

Τα επίπεδα της Βιταμίνης D σε σχέση με την έκθεση στο ηλιακό φως έχουν προταθεί ως πιθανή εξήγηση της διαφορετικής συχνότητας της ΣΚΠ μεταξύ χωρών ανάλογα με τη γεωγραφική τους θέση.(Goldberg 1974). Στους κατοίκους περιοχών με χαμηλή έκθεση σε ηλιακό φως έχουν παρατηρηθεί χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης D και υψηλότερη συχνότητα της νόσου.(Ascherio, Munger 2007), ενώ υψηλά επίπεδα βιταμίνης D έχει δειχθεί ότι έχουν προστατευτικό ρόλο μειώνοντας το βαθμό κινδύνου. (Munger, Zhang, O'Reilly et al. 2004) Η βιταμίνη D έχει ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες. (May, Asadullah, Zugel et al. 2004; Kamen, Tangpricha 2010). Επιπλέον είναι σημαντική για τη λειτουργία των νευροδιαβιβαστών και των νευρώνων. (Tenenhouse, Warner, Commissiong et al. 1991) Έχει δειχθεί επίσης ο ρόλος της στη μετρίαση της απομυελίνωσης, στη διευκόλυνση της επαναμυελίνωσης, στην παύση της απόπτωσης των ολιγοδενδροκυττάρων και στη διέγερση της διαφοροποίησης των προδρόμων των ολιγοδενδροκυττάρων σε ώριμα κύτταρα. (Goudarzvand, Javan, Mirnajafi-Zadeh et al. 2010)

Στους μη μολυσματικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες που έχουν προταθεί ως παράγοντες κινδύνου για την ΣΚΠ συγκαταλέγεται και το κάπνισμα. Το κάπνισμα

έχει συσχετιστεί επίσης με την επιδείνωση των συμπτωμάτων της ΣΚΠ (Handel, Williamson et al. 2011) αλλά και με τη μετάβαση από την Υποτροπιάζουσα-Διαλείπουσα στην Δευτεροπαθή Προϊούσα μορφή.(Hernán, Jick et al. 2005)

Κατά καιρούς έχουν προταθεί ως παράγοντες κινδύνου η διατροφή, οι ορμόνες του φύλου και άλλοι παράγοντες χωρίς όμως να υπάρχουν πειστικές αποδείξεις για την εμπλοκή τους. (Ascherio, Munger 2007 II) Υψηλά επίπεδα οιστρογόνων έχουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν την ανοσολογική απόκριση από προφλεγμονώδη τύπου 1 στη μη φλεγμονώδη τύπου 2 (Whitacre, Reingold et al. 1999; Whitacre 2001), γεγονός που εξηγεί την απουσία υποτροπών κατά την κύηση και την επιστροφή τους κατά την περίοδο της λοχείας. (Confavreux , Hutchinson et al. 1998)

Στην κατηγορία των μολυσματικών παραγόντων ως πιθανών αιτίων της ΣΚΠ οι κύριοι υποψήφιοι είναι ο ιός EBV , ο ανθρώπινος ερπητοϊός τύπου 6 (human herpesvirus type 6, HHV-6) και οι ανθρώπινοι ενδογενείς ρετροϊοί (human endogenous retrovirus, HERV) (Giovannoni, Cutter et al. 2006). Οι αλληλουχίες των ιών HERV και HHV-6 και αντισώματα έναντι αυτών έχουν βρεθεί στο πλάσμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό των ασθενών με ΣΚΠ (Voumnourakis, Kitsos et al. 2010; Morandi, Tarlinton et al. 2015), όμως δεν έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν αίτια. Η μόλυνση από τον ιό EBV είναι αυτή που έχει συσχετιστεί περισσότερο με το βαθμό κινδύνου για ΣΚΠ. Μελέτες έχουν δείξει ισχυρό συσχετισμό ανάμεσα στην παρουσία αντισωμάτων ειδικών για τον EBV και ιστορικού λοιμώδους μονοκυττάρωσης με την εκδήλωση της ΣΚΠ. (Operskalski, Visscher, Malmgren et al. 1989; Lossius, Johansen et al. 2014; Belbasis, Bellou et al. 2015)

## **Αντιμετώπιση**

Για την αντιμετώπιση της ΣΚΠ δεν υπάρχει γνωστή θεραπεία αλλά πολλές μέθοδοι αντιμετώπισης έχουν αποδειχθεί βοηθητικές. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις στοχεύουν στην τροποποίηση της προόδου της νόσου, την πρόληψη και θεραπεία των υποτροπών και τον περιορισμό των συμπτωμάτων με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών.

### Αντιμετώπιση των υποτροπών

Η θεραπεία που συνιστάται από τους νευρολόγους κατά τις υποτροπές με σοβαρά συμπτώματα (τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν απώλεια της όρασης, αδυναμία ή απώλεια της ισορροπίας) είναι η χορήγηση κορτικοειδών. (Compston, Coles 2008) Η πιο συνήθης αγωγή είναι η χορήγηση υψηλών δόσεων ενδοφλέβιων στεροειδών με σκοπό τη μείωση της φλεγμονής του ΚΝΣ και τον γρηγορότερο τερματισμό της υποτροπής. Τα κορτικοστεροειδή ωστόσο δεν φαίνεται να έχουν κάποιο μακροπρόθεσμο όφελος στην εξέλιξη της νόσου. (<http://www.nationalmssociety.org>)

### Θεραπείες που τροποποιούν τη νόσο

Οι θεραπείες που τροποποιούν τη νόσο αποτελούν την καλύτερη διαθέσιμη στρατηγική για την επιβράδυνση της κλινικής πορείας της νόσου. Τα φάρμακα αυτά έχει δείχθει ότι: α. Μειώνουν τη συχνότητα και τη σοβαρότητα των υποτροπών των ασθενών β. Μειώνουν το σχηματισμό νέων εστιών απομυελίνωσης στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό όπως απεικονίζονται στην MRI, γ. Επιβραδύνουν τη συσσώρευση αναπηρίας. Περαιτέρω κλινική διερεύνηση και κλινική εμπειρία δείχνουν ότι η έγκαιρη παρέμβαση με τέτοιες θεραπείες συμβάλλει στην πρόληψη

μόνιμης βλάβης στο ΚΝΣ γι' αυτό η έναρξη τους συνίσταται να γίνει όσο το δυνατόν γρηγορότερα. (Gold, Wolinsky et al. 2010) Η έναρξη της θεραπείας άμεσα συνίσταται όταν: 1) το άτομο διαγνωστεί με Υποτροπιάζουσα-Διαλείπουσα ΣΚΠ, 2) το άτομο είχε το πρώτο επεισόδιο νευρολογικών συμπτωμάτων και τα ευρήματα της MRI είναι σύμφωνα με τη νόσο και έχουν αποκλειστεί άλλες αιτίες, και 3) όταν το άτομο πάσχει από Πρωτοπαθή ή Δευτεροπαθή Προϊούσα ΣΚΠ αλλά εξακολουθεί να βιώνει υποτροπές.

Μέχρι στιγμής κυκλοφορούν 15 τροποποιητικά της νόσου φάρμακα τα οποία έχουν εγκριθεί από τον FDA και χρησιμοποιούνται στην Υποτροπιάζουσα-Διαλείπουσα ΣΚΠ, ένα εκ των οποίων εγκρίθηκε πρόσφατα και για την Πρωτοπαθή Προϊούσα μορφή της νόσου. Κανένα από αυτά δεν αποτελεί τη θεραπεία της ΣΚΠ, ωστόσο σε όλα υπάρχει ιστορικό αποτελεσματικότητας. Σε γενικές γραμμές η δράση τους είναι μέσω καταστολής ή τροποποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος. (Dargahi, Katsara et al. 2017)

Οι ιντερφερόνες β (interferon-β 1a και interferon-β 1b), η οξική γλατιμέρη (glatimer acetate). Τεριφλουνομίδη (teriflunomide) και ο φουμαρικός διμεθυλεστέρας (Tsang, Macdonell 2011) αποτελούν φάρμακα πρώτης γραμμής. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα φάρμακα αυτά καθυστερούν την εμφάνιση υποτροπών και την πρόοδο της νόσου από το CIS στην κλινικά διαγνωσμένη ΣΚΠ. (Tintore 2008) Η τεριφλουνομίδη αναστέλλει το ένζυμο διυδροοροτική αφυδρογονάση που είναι απαραίτητο για τη de novo σύνθεση των πυριμιδινών, οδηγώντας στη μείωση του πολλαπλασιασμού των ενεργοποιημένων Τ και Β λεμφοκυττάρων. (Bar-Or, Pachner et al. 2014) Ο φουμαρικός διμεθυλεστέρας δρα ενεργοποιώντας μια πρωτεΐνη που ονομάζεται «Nrf2» που ρυθμίζει τη δράση ορισμένων «αντιοξειδωτικών» γονιδίων, που εμπλέκονται στην προστασία των κυττάρων από βλάβες. Μειώνει την φλεγμονή και ρυθμίζει τη δραστηριότητα του ανοσοποιητικού συστήματος. (Burness, Deeks 2014) Η μιτοξανδρόνη (mitoxantrone) είναι κυτταροστατικό και ισχυρά ανοσοκατασταλτικό φάρμακο και χορηγείται σε ασθενείς με δευτεροπαθή προϊούσα ΣΚΠ αλλά και σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα ΣΚΠ που επιδεινώνεται. (Mazerski, Martelli, Borowski et al. 1998) Η χρήση της είναι περιορισμένη λόγω των σοβαρών παρενεργειών της, αποτελεί φάρμακο τρίτης γραμμής για όσους δεν ανταποκρίνονται θετικά σε άλλα φάρμακα. (Tsang, Macdonell 2011)

Δεδομένου ότι ο ρόλος των Τ λεμφοκυττάρων είναι καθοριστικός για την έναρξη και την επιδείνωση της ΣΚΠ, είναι λογικό πολλές από τις υπάρχουσες θεραπευτικές αγωγές να έχουν ως στόχο τα συγκεκριμένα κύτταρα, είτε εμποδίζοντας τις λειτουργίες τους είτε εμποδίζοντας τη μετανάστευση τους στο ΚΝΣ.

Η ναταλιζουμάμπη (natalizumab) είναι ένα ανασυνδυασμένο εξανθρωποποιημένο αντίσωμα αντι-α4-ιντεγκρίνης. Η α4-ιντεγκρίνη είναι ένα απαραίτητο μόριο για την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο VCAM-1, που αποτελεί σημαντικό βήμα για να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό σε καταστάσεις φλεγμονής στο ΚΝΣ. Το αντίσωμα αυτό εμποδίζει τη μετανάστευση των κυττάρων αυτών στο φλεγμένον ΚΝΣ. (Leger, Yednock, Tanner et al. 1997) Τη μετανάστευση των Τ λεμφοκυττάρων επηρεάζει και η φιγκολιμόδη (fingolimod, FTY720) που αποτελεί τροποποιητή των υποδοχέων της 1-φωσφορικής σφιγγοσίνης (S1P). Δρα ως λειτουργικός ανταγωνιστής του υποδοχέα S1P στα λεμφοκύτταρα, εμποδίζοντας την ικανότητα τους να εξέρχονται από τους λεμφαδένες και να εισέρχονται στο ΚΝΣ όπου επάγουν τη δημιουργία βλαβών. (Kappos, Antel et al. 2006)

Η αλεμτουζουμάμπη (alemtuzumab) είναι ένα κάππα μονοκλωνικό αντίσωμα της ανοσοσφαιρίνης IgG1 το οποίο στοχεύει ειδικά το αντιγόνο CD52 που εκφράζεται στην επιφάνεια των κακοηθών και φυσιολογικών T και B λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων. Με την πρόσδεση της στο CD52 προκαλεί την απομάκρυνση των κυττάρων αυτών από την κυκλοφορία. (Freedman, Kaplan et al. 2013) Μονοκλωνικό αντίσωμα της ανοσοσφαιρίνης IgG1 είναι και η δακλιζουμάμπη (daclizumab) η οποία συνδέεται με μεγάλη εξειδίκευση με την άλφα ή Tac υπομονάδα του συμπλέγματος του υψηλής συγγένειας υποδοχέα της Ιντερλευκίνης-2 (που εκφράζεται σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα) και αναστέλλει τη σύνδεση και τη βιολογική δραστηριότητα της Ιντερλευκίνης-2, μιας σημαντικής οδού στην κυτταρική ανοσολογική απάντηση (Smith, Gilbride, Favata et al. 1980). Η οκρελιζουμάμπη είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του αντιγόνου επιφανείας CD20 των B λεμφοκυττάρων και οδηγεί στην απομάκρυνση των B λεμφοκυττάρων από την κυκλοφορία δρώντας ως ανοσοκατασταλτικό φάρμακο. (McGinley, Moss et al. 2017) Το Μάρτιο του 2017 πήρε έγκριση από τον FDA ως θεραπεία για την Υποτροπιάζουσα-Διαλείπουσα και την Πρωτοπαθή Προϊούσα ΣΚΠ. Αποτελεί το πρώτο φάρμακο που εγκρίνεται από τον FDA για την πρωτοπαθή προϊούσα ΣΚΠ. (<https://www.accessdata.fda.gov>)

Τα τροποποιητικά της νόσου φάρμακα έχει δειχθεί ότι σε γενικές γραμμές μειώνουν το ρυθμό των υποτροπών, τις απομυελινωτικές βλάβες και σταθεροποιούν ή καθυστερούν τα κινητικά προβλήματα. Η πλειοψηφία τους στοχεύει στη μακροχρόνια και μη ειδική καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος. Ωστόσο η μη ειδική ανοσοκαταστολή μπορεί να έχει σοβαρές παρενέργειες όπως οι μολύνσεις και ο καρκίνος. Η πιο σοβαρή επιπλοκή είναι η εμφάνιση της προϊούσας πολυεστιακής εγκεφαλοπάθειας σε πολλούς ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε ναταλιζουμάμπη, η οποία προκαλείται από τον ιό JC. (Dargahi, Katsara et al. 2017). Έτσι λοιπόν ο κύριος στόχος της σύγχρονης έρευνας είναι στοχευμένη ανοσοκαταστολή και η επαγωγή ανοχής έναντι στα εαυτά αντιγόνα, οδηγώντας έτσι στην επαναφορά της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος. (Dargahi, Katsara et al. 2017)

Η επαγωγή πεπτιδο-ειδικής ανοχής στοχεύοντας αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική (Turley, Miller 2010). Πριν μερικά χρόνια δημοσιεύτηκαν τα αποτελέσματα κλινικής δοκιμής φάσης I όπου είχαν χρησιμοποιηθεί αυτόλογα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος χημικά συνδεδεμένα με πεπτίδια μυελίνης για την επαγωγή αντιγονοειδικής ανοχής. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η προσέγγιση αυτή είναι ασφαλής και ανεκτή από τους ασθενείς και μπορεί να έχει εφαρμογή, ενώ έχει σχεδιαστεί και κλινική μελέτη φάσης II. (Lutterotti et al. 2013). Άλλες στρατηγικές επαγωγής πεπτιδοειδικής ανοχής είναι η χρήση εμβολίων DNA, νανοσωματιδίων και τροποποιημένων προσδετών πεπτιδίων τα οποία σε προκλινικές δοκιμές επάγουν ανοχή, ωστόσο δεν έχουν προχωρήσει πέρα από κλινικές δοκιμές φάσης II. (Dargahi, Katsara et al. 2017)

Αρκετές από τις εγκεκριμένες θεραπείες (glatimer acetate, IFN-β, fingolimod, natalizumab) που αναφέρονται παραπάνω οφείλουν την ανάπτυξή τους στο ανοσολογικό πειραματικό μοντέλο της ΣΚΠ που καλείται Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα. Το μοντέλο αυτό, που περιγράφεται παρακάτω, έχει συνεισφέρει τόσο στην κατανόηση της νόσου όσο και στον έλεγχο της αποτελεσματικότητας και την κατανόηση των μηχανισμών δράσης των ανοσορρυθμιστικών θεραπειών. (Robinson, Harp et al. 2014)

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ (ΠΑΕ)

Η Πειραματική Αυτοάνοση (ή Αλλεργική) Εγκεφαλομυελίτιδα αποτελεί το καλύτερα μελετημένο και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο της ΣΚΠ. (Robinson, Harp et al. 2014) Είναι μία αυτοάνοση ασθένεια που μεσολαβείται από τα Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα και χαρακτηρίζεται από διήθηση μονοκυττάρων και Τ λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ και τοπική φλεγμονή. Ο μοριακός στόχος(οι) των κυττάρων αυτών που έχουν ταυτοποιηθεί και χρησιμοποιούνται είναι πρωτεΐνες που εκφράζονται από τα ολιγοδεδνροκύτταρα που παράγουν μυελίνη στο ΚΝΣ. Αποτέλεσμα είναι η απομυελίνωση των αξόνων, η προβληματική μετάδοση του σήματος και η προοδευτική ανιούσα παράλυση που ξεκινάει από τα πίσω άκρα. Η ΠΑΕ έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως μοντέλο της ΣΚΠ, τόσο για τη μελέτη της παθογένειας της νόσου όσο και για τον έλεγχο πιθανών θεραπειών. Σήμερα υπάρχουν πολλές διαφορετικές παθοφυσιολογικές μορφές της ΠΑΕ με ποικίλα πρότυπα κλινικής εκδήλωσης, ανάλογα με το ζωικό είδος, το στέλεχος, την πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται για την επαγωγή της και την οδό χορήγησης που χρησιμοποιείται. Ως εκ τούτου έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά διαφορετικά μοντέλα για τη μελέτη της ανάπτυξης της νόσου και συγκεκριμένων ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών που σχετίζονται με την ΣΚΠ για την αποσαφήνιση των μηχανισμών δράσης πιθανών θεραπευτικών προσεγγίσεων. (Robinson, Harp et al. 2014)

### Ιστορικά Στοιχεία

Το 1885, λίγο μετά την εισαγωγή του εμβολίου κατά της λύσσας από τον Louis Pasteur, έκαναν την εμφάνιση τους οι πρώτες αναφορές νευρολογικών επιπλοκών σε μερικούς ασθενείς που είχαν εμβολιαστεί. Οι επιπλοκές περιλάμβαναν την αδυναμία των άκρων, τη διαταραχή της αισθητικότητας, τη δυσλειτουργία του σφικτήρα και την εμπλοκή του κρανιακού νεύρου. (Pender, McCombe 1995) Η κλινική και παθοφυσιολογική εικόνα διέφεραν από εκείνη της λύσσας ενώ παρατηρήθηκε περιαγγειακή φλεγμονή και απομυελίνωση στο ΚΝΣ. (Bassoe, Grinker 1930) Οι εμβολιασμοί του Pasteur περιλάμβαναν επαναλαμβανόμενες ενέσεις με ομογενοποίηση από νωτιαίο μυελό κουνελιών που είχαν μολυνθεί με τον ιό της λύσσας. (Pender, McCombe 1995) Διάφορες θεωρίες αναπτύχθηκαν για να εξηγήσουν αυτές τις νευρολογικές επιπλοκές μεταξύ των οποίων ήταν η μετάδοση του εξασθενημένου ιού της λύσσας μέσω του εμβολίου (Bassoe, Grinker 1930) και η τοξική επίδραση μίας ουσίας του ξένου νευρικού ιστού που χορηγούνταν με το εμβόλιο. (Muller 1908)

Προκειμένου να διαλευκανθεί το ζήτημα, εξετάστηκε η επίδραση χορήγησης νευρικού ιστού σε πειραματόζωα. Το 1898 ο Centanni παρατήρησε ότι τα κουνέλια δεν παρουσιάζουν ανοχή στις ενέσεις από συστατικά του εγκεφάλου, και εκδήλωναν αδυναμία και καχεξία που οφειλόταν στην ουσία η οποία χορηγούνταν. Οι Koritschoner και Schweinburg προκάλεσαν φλεγμονή του νωτιαίου μυελού σε κουνέλια μέσω εμβολιασμού με ανθρώπινο νωτιαίο μυελό. Ιστολογική μελέτη έδειξε περιαγγειακή διήθηση με μικρά στρογγυλά μονοπύρηννα κύτταρα (Koritschoner, Schweinburg 1925). Συμπέραναν έτσι πως ο νευρικός ιστός ήταν αυτός που



ευθυνόταν για την παράλυση που παρατηρούνταν στους ανθρώπους μετά από τον εμβολιασμό κατά της λύσσας.

Λίγο αργότερα το 1933 , οι Rivers, Sprunt και Berry εμβολίασαν επανειλημμένως πιθήκους με εκχύλισμα και ομογενοποίηση εγκεφάλου, προσπαθώντας να αναπαραστήσουν την εγκεφαλομυελίτιδα που προέκυπτε μετά από εμβολιασμό κατά της λύσσας. Κάποιοι από τους πιθήκους ανέπτυξαν αταξία και αδυναμία και βρέθηκε ότι είχαν περιαγγειακές φλεγμονώδεις βλάβες και εστίες απομυελίνωσης στο ΚΝΣ. (Rivers, Sprunt et al. 1933) Οι Rivers & Schwentker και οι Ferraro & Jervis επανέλαβαν και επιβεβαίωσαν αυτές τις μελέτες. (Rivers, Schwentker 1935; Ferraro, Jervis 1940)

Το ξεκίνημα της χρήσης ανοσοενισχυτικών, λίγα χρόνια μετά διευκόλυσε την επαγωγή της πειραματικής νόσου και συνεπώς την εκτενέστερη μελέτη της. (Pender, McCombe 1995) Από τότε και έπειτα η ΠΑΕ είχε δοκιμαστεί σε πολλά είδη όπως αρουραίοι, ποντικοί, γάτες, σκύλοι, πρόβατα, κασίκες, χοίροι, περιστέρια και κοτόπουλα. (Waksman 1959) Είναι πλέον καθιερωμένο ότι η πειραματική νόσος αυτή που μεσολαβείται από T λεμφοκύτταρα τα οποία στοχεύουν σε αντιγόνα μυελίνης καλείται Πειραματική Αυτοάνοση (Αλλεργική) Εγκεφαλομυελίτιδα. Η ΠΑΕ είναι πρότυπο κυτταρομεσολαβούμενης αυτοάνοσης ασθένειας γενικά και είναι το καλύτερο διαθέσιμο ζωικό μοντέλο της ανθρώπινης φλεγμονώδους απομυελινωτικής ασθένειας του ΚΝΣ. (Pender, McCombe 1995)

### **Η Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα στον ποντικό**

Μέχρι τη δεκαετία του 1980 οι αρουραίοι ήταν τα ζώα εργαστηρίου που χρησιμοποιούνταν στις μελέτες της ΣΚΠ. Οι αρουραίοι εκτός του ότι ήταν τα πρώτα πειραματόζωα είχαν πλεονέκτημα έναντι των ποντικών λόγω του μεγάλου μεγέθους που καθιστά ευκολότερο το χειρισμό του ΚΝΣ τους με σχετικά εύκολες μεθόδους απομόνωσης και ανάλυσης του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού τους. Από τα διάφορα στελέχη αρουραίων οι Lewis ήταν οι πιο δημοφιλείς για μελέτες της ΠΑΕ με το πλεονέκτημα ότι δεν χρειαζόταν χορήγηση της τοξίνης pertussis για την επαγωγή της νόσου. Παρόλα αυτά στο τέλος της δεκαετίας του 1980 οι αρουραίοι αντικαταστάθηκαν σταδιακά από τους ποντικούς, οι οποίοι λόγω του μικρότερου μεγέθους τους και ως εκ τούτου του χαμηλότερου κόστους τους επέτρεπαν την πραγματοποίηση περισσότερων πειραμάτων και επαναλήψεων. (Croxford, Kurschus et al. 2011)

Το μοντέλο της ΠΑΕ είναι ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη των παθογενετικών μηχανισμών της ΣΚΠ. (Constantinescu, Farooqi et al. 2011) Παρουσιάζει όμως και σημαντικές διαφορές καθώς απαιτεί το βήμα της εξωγενούς ανοσοποίησης σε αντίθεση με τους ανθρώπους που δεν υπάρχει τεχνητή πρόκληση της ΣΚΠ. (Gran, O'Brien et al. 2008) Μία ακόμη διαφορά είναι ότι η ευαισθητοποίηση στα αντιγόνα μυελίνης γίνεται με τη βοήθεια ανοσοενισχυτικών που περιέχουν βακτηριακούς παράγοντες που ενεργοποιούν ισχυρά την έμφυτη ανοσία μέσω υποδοχέων που αναγνωρίζουν πρότυπα (Pattern Recognition Receptors, PRR). (Libbey, Fujinami 2011) Στην ΠΑΕ τα αντιγόνα είναι γνωστά ενώ στην ΣΚΠ δεν υπάρχει ένα γνωστό ταυτοποιημένο αντιγόνο. (Constantinescu, Farooqi et al. 2011)

Χρόνια ερευνών οδήγησαν στην ανακάλυψη πολλών εγκεφαλιτογόνων πεπτιδίων και οι ποντικοί παραμένουν σήμερα το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο πειραματόζωο εν

μέρει λόγω της μεγάλης διαθεσιμότητας διαγονιδιακών ποντικών και ποντικών που τους έχουν απαλειφθεί γονίδια (knockout ποντικοί) για στοχευμένες μηχανιστικές έρευνες. (Robinson, Harp et al. 2014) Η ενεργός ΠΑΕ μπορεί να επαχθεί με ανοσοποίηση με αντιγόνα μυελίνης όπως η βασική πρωτεΐνη μυελίνης (Myelin Basic Protein, MBP) ή η πρωτεολιπιδική πρωτεΐνη (Proteolipid Protein, PLP) (Constantinescu, Farooqi et al. 2011) Η έναρξη της νόσου αναμένεται 10-15 ημέρες μετά την ανοσοποίηση, χρονικό διάστημα όπου εκδηλώνονται τα πρώτα κλινικά σημεία και ακολουθεί ανιούσα προοδευτική παράλυση που ξεκινάει από την ουρά επεκτείνεται στα πίσω άκρα και προχωράει προς τα εμπρόσθια άκρα με ταυτόχρονη απώλεια βάρους. (Robinson, Harp et al. 2014) Μετά την ανοσοποίηση με κάποιο αντιγόνο μυελίνης σε πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud (Freud's Complete Adjuvant, CFA) γίνεται η ενεργοποίηση των ειδικών για τον αντιγόνο CD4<sup>+</sup> T βοηθητικών λεμφοκυττάρων (μυελοειδικά T λεμφοκύτταρα). Ακολουθεί η μετανάστευση αυτών από τους λεμφαδένες κοντά στην περιοχή της ανοσοποίησης στο ΚΝΣ, η οποία περιλαμβάνει τη διαπίδωση των μυελοειδικών T λεμφοκυττάρων από τους στενούς δεσμούς του ενδοθηλίου που συνιστά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Γίνεται επανενεργοποίηση τους μετά από επαφή με τα ενδογενή αντιγόνα του ΚΝΣ, μέσω αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στον περιαγγειακό χώρο. Η παραγωγή χημειοκινών και κυτταροκινών από τα μυελοειδικά T λεμφοκύτταρα οδηγεί στην εισροή περιφερειακών μονοπύρηνων μακροφάγων στο παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού και στην ενεργοποίηση τόσο των μονκύτταρων/μακροφάγων της περιφέρειας όσο και στην ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων του ΚΝΣ. Όλα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την απομυελίνωση των αξόνων από τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα των ενεργοποιημένων μονοπύρηνων κυττάρων αλλά και από τη φλεγμονώδη και κυτταροτοξική δράση των κυτταροκινών (IFN- $\gamma$ , LT/TNF- $\beta$ , IL-17, TNF- $\alpha$ , και NO) που παράγονται από τα CD4<sup>+</sup> T βοηθητικά λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα. (Miller, Karpus et al. 2007)

Στους ποντικούς SJL (H-2<sup>s</sup>) η ΠΑΕ μπορεί να επαχθεί με ανοσοποίηση με ομογενοποίηση ΚΝΣ, με PLP, με MBP ή με εγκεφαλιτογόνους επίτοπους των πρωτεϊνών μυελίνης όπως PLP<sub>139-151</sub>, PLP<sub>178-191</sub> της PLP, MBP<sub>84-104</sub> της MBP ή MOG<sub>92-106</sub> της μυελινικής γλυκοπρωτεΐνης των ολιγοδενδροκυττάρων μέσα σε ένα γαλάκτωμα που περιέχει CFA. Η νόσος ακολουθεί μία προβλέψιμη κλινική πορεία που χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζουσα και διαλείπουσα παράλυση, επιτρέποντας έτσι μηχανιστικές μελέτες και μελέτες ανοσορρυθμιστικών στρατηγικών σε αυτό το μοντέλο. (Robinson, Harp et al. 2014)

Στους C57BL/6 ποντικούς, που αποτελούν την πλειοψηφία των διαγονιδιακών και knockout στελεχών που χρησιμοποιούνται (βλέπε παρακάτω), η ανοσοποίηση με τον επίτοπο MOG<sub>35-55</sub> επάγει μία μονοφασική ή χρόνια σταθερή μορφή της ΠΑΕ. (Constantinescu, Farooqi et al. 2011) Η νόσος αυτή χαρακτηρίζεται από διηθήσεις φλεγμονωδών μονοκυττάρων σε πολλές περιοχές και από πολλές εστίες απομυελίνωσης στη λευκή ουσία του νωτιαίου μυελού. (Day 2005) Τα κύτταρα που απαντώνται στις φλεγμονώδεις διηθήσεις είναι κυρίως μακροφάγα και CD4<sup>+</sup> βοηθητικά λεμφοκύτταρα. (Constantinescu, Farooqi et al. 2011) Τα χαρακτηριστικά αυτά κάνουν αυτή τη νόσο ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη της χρόνιας φλεγμονώδους απομυελίνωσης που προσομοιάζει στην περίπτωση της δευτεροπαθούς προϊούσας μορφής της ΣΚΠ. (Bannerman, Hahn et al. 2005)

Στο τέλος της δεκαετίας του 1980 η «γενετική στόχευση» (gene targeting) εισήχθη στο χώρο της ανοσολογίας. Η τεχνική αυτή δίνει τη δυνατότητα απενεργοποίησης

γονιδίων, όπως για παράδειγμα τα γονίδια που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και στα σηματοδοτικά μονοπάτια των κυτταροκινών. Με την απενεργοποίηση γονιδίων είναι δυνατόν να καθοριστεί αν μία πρωτεΐνη είναι σημαντική ή όχι για έναν μηχανισμό. (Croxford, Kurschus et al. 2011) Το στέλεχος C57BL/6 αποτελεί μοντέλο επιλογής των ερευνητών κυρίως επειδή τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα που απαιτούνται για τη γονιδιακή στόχευση ήταν διαθέσιμα νωρίς από αυτούς τους ποντικούς και επειδή μπορεί να επαχθεί σε αυτούς μία πρώτυπη αυτοάνοση ασθένεια όπως η ΠΑΕ. Ωστόσο το στέλεχος αυτό παρουσιάζει ετερογενή και συχνά μη προβλέψιμη απόδοση της διαδικασίας επαγωγής της νόσου, και η ανάπτυξη της νόσου εξαρτάται από τη χορήγηση της τοξίνης Pertussis που χρησιμοποιείται και από άλλους άγνωστους παράγοντες. Πριν επικρατήσουν οι C57BL/6 ποντικοί στις μελέτες της ΠΑΕ, ήταν πιο κοινή η χρήση των SJL ποντικών, οι οποίοι έχουν το πλεονέκτημα της πιο αξιόπιστης επαγωγής της νόσου αλλά και τη δυνατότητα επαγωγής παθητικής ΠΑΕ, η οποία περιγράφεται παρακάτω. (Croxford, Kurschus et al. 2011)

Εκτός από την ενεργό ΠΑΕ υπάρχει και η παθητική ΠΑΕ η οποία επιτυγχάνεται μέσω μεταφοράς εγκεφαλιτογόνων CD4<sup>+</sup> T βοηθητικών λεμφοκυττάρων που έχουν δημιουργηθεί σε ποντίκια δότες από την ενεργό ανοσοποίηση τους, σε ποντίκια δέκτες που δεν έχουν ανοσοποιηθεί. (Stromnes, Goverman 2006) Αυτός ο τύπος ΠΑΕ ήταν πολύ σημαντικός στην καθιέρωση του ρόλου των μυελοειδικών T λεμφοκυττάρων στην παθογένεση της ΠΑΕ και πιθανώς και της ΣΚΠ. (Pettinelli, McFarlin 1981) Τα μυελοειδικά T λεμφοκύτταρα απομονώνονται από τους ανοσοποιημένους δότες, ενεργοποιούνται *in vitro* με το εγκεφαλιτιγόνο πεπτίδιο και μεταφέρονται είτε ενδοφλέβια είτε ενδοπεριτοναϊκά μέσα στους δέκτες. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει τον χειρισμό των εγκεφαλιτογόνων T λεμφοκυττάρων *in vitro* και την επαγωγή της νόσου με ένα σχετικά ομοιογενή πληθυσμό αντιγονοειδικών T λεμφοκυττάρων. (Robinson, Harp et al. 2014) Επιτρέπεται επίσης ο προσδιορισμός του ρόλου συγκεκριμένων κυτταροκινών και βιολογικών παραγόντων *in vitro* πριν τη μεταφορά στους δέκτες. (Constantinescu, Farooqi et al. 2011)

### Διαγονιδιακοί Ποντικοί Μοντέλα της ΠΑΕ

Η κατασκευή και η χρήση γενετικά τροποποιημένων ποντικών πρόσφερε νέες και πολλές φορές μη αναμενόμενες πληροφορίες για την παθογένεση της ΠΑΕ. Οι ποντικοί ως πειραματόζωο δίνουν τη δυνατότητα γενετικής τροποποίησης, και χάρη στη διαθεσιμότητα επαναστατικών μεθοδολογιών είναι εφικτή η δημιουργία διαγονιδιακών και knockout ποντικών που αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο στη μελέτη παραγόντων που εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου. (Gold, Linington et al. 2006)

Δεδομένου ότι η ΠΑΕ προκύπτει από την ενεργό ανοσοποίηση των πειραματοζώων με αντιγόνα μυελίνης που παρουσιάζονται από τα MHC τάξης II στα CD4<sup>+</sup> T βοηθητικά λεμφοκύτταρα, το μοντέλο είναι ιδανικό για τη μελέτη της ανάπτυξης των T βοηθητικών λεμφοκυττάρων, των λειτουργιών τους και της σηματοδότησης που μεσολαβείται από αυτά *in vivo*. Οι CD4<sup>+</sup> πληθυσμοί των Th1 και Th17 λεμφοκυττάρων παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IFN- $\gamma$  και IL-17 αντίστοιχα και εντοπίζονται στις βλάβες του ΚΝΣ τόσο σε ασθενείς με ΣΚΠ όσο και σε ποντικούς με ΠΑΕ. Παρόλο που η ΠΑΕ θεωρείται ότι ξεκινάει ως μια νόσος που μεσολαβείται από τα CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα, τα CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα φαίνεται να παίζουν επίσης ρόλο στην παθογένεια της νόσου, καθώς απαντώνται επίσης στις

απομυελινωτικές βλάβες του ΚΝΣ τόσο στην ΠΑΕ, όσο και σε ασθενείς με ΣΚΠ. (Robinson, Harp et al. 2014) Δεδομένου λοιπόν του ρόλου των CD4+ και CD8+ κυττάρων στην πειραματική νόσο είναι λογική η προσπάθεια κατασκευής γενετικά τροποποιημένων ποντικών μοντέλων της νόσου, που να στοχεύουν αυτά τα κύτταρα αλλά και τα μόρια που συμμετέχουν στην ενεργοποίησή τους.

Μέχρι στιγμής τα γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ποντικού που να εμφανίζουν νόσο που να προσομοιάζει στην ΣΚΠ αυθόρμητα είναι λίγα. Ωστόσο η καθιέρωση διαγονιδιακών ποντικών με γενετικά τροποποιημένο υποδοχέα T λεμφοκυττάρων (T Cell Receptor, TCR) επέτρεψε την ανάλυση ποντικών με ένα ρεπερτόριο T λεμφοκυττάρων έντονα εξειδικευμένου έναντι ειδικών αυτοαντιγόνων. Στο πρώτο TCR- διαγονιδιακό ποντίκι ο υποδοχέας T λεμφοκυττάρων αναγνώριζε το αυτοαντιγόνο MBP Ac1-10 σε H-2<sup>u</sup> (B10.PL) ποντίκια. (Goverman, Woods et al. 1993) Τα αυθόρμητα μοντέλα ΠΑΕ στηρίζονται είτε μόνο στην παρουσία ενός γενεικά τροποποιημένου TCR που αναγνώριζε ειδικά ένα αυτοαντιγόνο (όπως στην περίπτωση των SJL ποντικών με PLP-139–151-ειδικό TCR) (Waldner et al. 2000) είτε στο συνδυασμό γενετικά τροποποιημένου TCR με B κύτταρα που παράγουν αντισώματα για το συγκεκριμένο αυτοαντιγόνο (όπως στην περίπτωση των C57BL/6 ποντικών με MOG-ειδικά T και B λεμφοκύτταρα). (Pöllinger et al. 2009). Τα περισσότερα TCR διαγονιδιακά μοντέλα στα CD4+ βοηθητικά T λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν τα πεπτίδια μυελίνης που παρουσιάζονται μέσω των MHC τάξης II μορίων. Υπάρχουν και λίγα μοντέλα που έχουν περιγραφεί τα οποία βασίζονται στα CD8+ κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα τα οποία αναγνωρίζουν τα πεπτίδια που παρουσιάζονται μέσω των MHC τάξης I (Perchellet, Stromnes et al. 2004; Friese, Jakobsen et al. 2008; Na, Cao et al. 2008). Σήμερα υπάρχει ποικιλία TCR- διαγονιδιακών μοντέλων της ΠΑΕ σε ποικίλα στελέχη ποντικών, συμπεριλαμβανομένων και ανθρωποποιημένων ποντικών που εκφράζουν ανθρώπινα μόρια HLA τάξης II που σχετίζονται με γενετική προδιάθεση για ΣΚΠ και ανθρώπινους υποδοχείς T λεμφοκυττάρων ειδικών για μυελινικούς επίτοπους που παρουσιάζονται από αυτά τα μόρια (π.χ., ένας TCR ειδικός για το ανθρώπινο MBP<sub>84-102</sub> που προσδένεται στο ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο (HLA)-DR2). (Miller, Karpus et al. 2007; Robinson, Harp et al. 2014) Με εξαίρεση το διαγονιδιακό μοντέλο HLA-DR15 με TCR ειδικό MBP<sub>85-99</sub> (Ellmerich, Mycko et al. 2005), οι ποντικοί αυτοί δεν εμφανίζουν αυθόρμητη νόσο και είναι απαραίτητη η ανοσοποίηση με πεπτίδιο ή η χορήγηση τοξίνης pertussis (Madsen, Andersson et al. 1999) ή μεταφορά ενεργοποιημένων διαγονιδιακών T λεμφοκυττάρων. (Quandt, Baig et al. 2004)

Ορόσημο στην έρευνα της ΠΑΕ αποτέλεσε η δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών με TCR ειδικό για το πεπτίδιο MOG<sub>35-55</sub> από την Bettelli και τους συνεργάτες της. (Bettelli, Pagany et al. 2003) Οι ποντικοί αυτοί, 2D2 όπως καλούνται, είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι TCR διαγονιδιακοί ποντικοί στην έρευνα της ΠΑΕ. Πάνω του 90% των T λεμφοκυττάρων τους εκφράζουν διαγονιδιακές Vα και Vβ αλυσίδες, που είναι ειδικές για τον εγκεφαλιτογόνο επίτοπο MOG<sub>35-55</sub>. Παρόλο που οι ποντικοί αυτοί σε γενετικό υπόβαθρο αγρίου τύπου εμφανίζουν την ΠΑΕ αυθόρμητα σε χαμηλό ποσοστό μεταξύ 4 και 15%, ένα μεγαλύτερο ποσοστό, πάνω από 30% εμφανίζει οπτική νευρίτιδα, κατάσταση που συνιστά ένδειξη για ΣΚΠ καθώς ταλαιπωρεί το 50% των ασθενών με τη νόσο. Η δημιουργία των ποντικών αυτών επέτρεψε την ανακάλυψη μίας νέας μορφής αυθόρμητης ΠΑΕ που καλείται οπτικονωτιαία ΠΑΕ. (Bettelli, Pagany et al. 2003)

## Η ΠΑΕ στην ανάπτυξη ανοσοτροποποιητικών θεραπειών για τη ΣΚΠ

Η ΠΑΕ αποτελεί ένα πολύ ισχυρό εργαλείο στην έρευνα θεραπειών για τη ΣΚΠ και όπως αναφέρθηκε και παραπάνω έχει συμβάλει τόσο στην ανακάλυψη όσο και στον έλεγχο της αποτελεσματικότητας φαρμάκων που σήμερα χορηγούνται σε ασθενείς με ΣΚΠ. Χρησιμοποιείται επίσης για τον έλεγχο νέων φαρμάκων και νέων θεραπευτικών στρατηγικών. (Robinson, Harp et al. 2014)

Από τις εγκεκριμένες θεραπείες που αναφέρονται παραπάνω η οξική γλατιμέρη, η ιντερφερόνη βήτα καθώς και τα μονοκλωνικά αντισώματα που παρεμβαίνουν στη μετανάστευση των Τ λεμφοκυττάρων, ναταλιζουμάμπη και φιγκολιμόδη, καθώς και οκρελιζουμάμπη που απομακρύνει τα Β λεμφοκύτταρα από την κυκλοφορία οφείλουν το πέρασμα τους από τις προ-κλινικές μελέτες στην κλινική πρακτική στην ΠΑΕ. (Robinson, Harp et al. 2014) Ωστόσο καθώς αυτά τα φάρμακα επικεντρώνονται στην μη ειδική ανοσοκαταστολή ή στην ολική καταστολή της δράσης και της μετανάστευσης των Τ λεμφοκυττάρων, πολλές φορές έχουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα τους και σχετίζονται με δυσάρεστες παρενέργειες.

Χάρη στην ΠΑΕ είναι σήμερα γνωστός ο σημαντικός ρόλος των CD4+ βοηθητικών λεμφοκυττάρων στην παθογένεση της νόσου. Ήταν επόμενο λοιπόν, οι περισσότερες πειραματικές θεραπευτικές στρατηγικές να επικεντρωθούν στην ολική καταστολή των κυττάρων αυτών. Ωστόσο ρόλος της ανοσορύθμισης στην ΣΚΠ θα έπρεπε να είναι η απαλοιφή της ανοσολογικής απόκρισης έναντι των αυτοαντιγόνων του ΚΝΣ, χωρίς να επηρεάζεται η ανοσολογική απόκριση έναντι ξένων παθογόνων (Robinson, Harp et al. 2014) Η επαγωγή αντιγόνο-ειδικής ανοχής αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη στρατηγική ανοσοθεραπείας και περιγράφεται παρακάτω.

### Η ΠΑΕ στην ανάπτυξη αντιγόνο-ειδικών θεραπειών

Η άμεση στόχευση των αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων αποτελεί ιδανική στρατηγική για τη θεραπεία αυτοάνοσης νόσου καθώς οδηγεί στην εξάλειψη της αντιγονοειδικής ανοσολογικής απόκρισης, χωρίς καθολική ανοσοκαταστολή. Έχουν περιγραφεί τέσσερις διαφορετικές προσεγγίσεις επαγωγής πεπτιδο-ειδικής ανοσολογικής ανοχής: η επαγωγή ανοχής από τροποποιημένους προσδέτες πεπτιδίων altered peptide ligand (APL), η επαγωγή ανοχής μέσω στοματικής ή της ρινικής οδού, η επαγωγή ανοχής με τη χορήγηση διαλυτών πεπτιδίων και η επαγωγή ανοχής με χορήγησης λευκοκυττάρων που έχουν συνδεθεί με αντιγόνα μυελίνης μέσω καρβοδιμίδιου του αιθυλενίου (ethylene carbodiimide, ECDI). (Turley, Miller 2010)

Οι APL είναι ανάλογα πεπτιδίων που προσδένονται στον ίδιο TCR με το ενδογενές αυτοαντιγόνο αλλά οδηγούν σε διαφορετικές αποκρίσεις από αυτό. Ανταγωνίζονται λοιπόν τη πρόσδεση του αυτοαντιγόνου τροποποιώντας τα σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην πλήρη ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων. Ο τρόπος δράσης τους είναι είτε με επαγωγή ανέργειας των Τ λεμφοκυττάρων, είτε με επαγωγή των Τ ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων ( Tregs) είτε με μετατροπή της ανοσολογικής απόκρισης από προ-φλεγμονώδη (Th1) σε αντι-φλεγμονώδη (Th2). (Turley, Miller 2010) Η ανοχή μέσω της στοματικής ή ρινικής οδού προσομοιάζει στην ανοχή στα αντιγόνα με τα οποία ο ξενιστής έρχεται σε επαφή μέσω της τροφής. Τα Τ λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στη γαστροοισοφαγική οδό εκτίθενται τακτικά σε αντιγόνα που καταναλώνονται με την τροφή και εν ενεργοποιούνται έναντι αυτών επιτρέποντας την προστατευτική ανοχή έναντι μη παθογόνων αντιγόνων και την

άμυνα έναντι παθογόνων. Η χορήγηση υψηλών δόσεων αντιγόνου οδηγεί είτε στην ανέργια των αντιγόνο-ειδικών T λεμφοκυττάρων είτε στην απομάκρυνση τους από την κυκλοφορία (Bitar, Whitacre 1988; Whitacre, Gienapp et al. 1991) ενώ χαμηλές δόσεις οδηγούν στην ενεργοποίηση των Tregs που εκκρίνουν κατασταλτικές κυτταροκίνες (όπως TGF- $\beta$ , IL-4 και IL-10). (Miller, Lider et al. 1992) Η χορήγηση διαλυτών πεπτιδίων σε ενέσιμη μορφή οδηγεί σε μία κατάσταση ανέργιας των T λεμφοκυττάρων μέσω αναστολής του πολλαπλασιασμού τους ή/και της παραγωγής της IL-2. (Burstin, Shea et al. 1992; Gaur, Wiers et al. 1992; Critchfield, Racke et al. 1994) Μετά από έκθεση σε υψηλή και επαναλαμβανόμενη δόση αντιγόνου τα T λεμφοκύτταρα γίνονται ανεργικά ή απομακρύνονται λόγω του θανάτου μέσω ενεργοποίησης (Activation Induced Cell Death, AICD). (Critchfield, Racke et al. 1994; Racke, Critchfield, Quigley et al. 1996) Η επαγωγή ανοχής με ενδοφλέβια χορήγηση λευκοκυττάρων (συγκεκριμένα μονιμοποιημένων σπληνοκυττάρων) συνδεδεμένων με πεπτίδια μυελίνης (Ag-SP όπως καλούνται) είναι μία μέθοδος που προκαλεί ανέργια *in vitro* και περιφερειακή ανοχή *in vivo*. (Miller, Wetzig et al. 1979; Miller, Lider et al. 1992) Ωστόσο κάποιες από τις προσεγγίσεις αυτές δεν έχουν έχουν εισαχθεί στην κλινική πρακτική λόγω της έλλειψης αποτελεσματικότητας αλλά και των σοβαρών παρενεργειών, όπως οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας. (Kent, Fukaura et al. 1997; Bielekova, Goodwin et al. 2000; Kappos, Comi et al. 2000) Μία άλλη προσέγγιση είναι η αξιοποίηση των ρυθμιστικών ιδιοτήτων των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (ΑΠΚ), συγκεκριμένα των δενδριτικών κυττάρων, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση της φυσικής ανοσίας αλλά και στη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής έναντι των εαυτών συστατικών. (Steinman 2008) Παρακάτω περιγράφεται μία από τις προσεγγίσεις της στόχευσης μυελινικών πεπτιδίων σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα με σκοπό την επαγωγή αντιγόνο-ειδικής ανοχής, της οποίας η μελέτη θα απασχολήσει την παρούσα εργασία.

### **Στόχευση μυελινικών πεπτιδίων σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μέσω σύζευξής τους με μαννάνη**

Οι υποδοχείς λεκτίνης τύπου C, όπως ο υποδοχέας DEC-205 και ο υποδοχέας της μαννόζης (MR, CD206), που αναγνωρίζουν γλυκοζυλιωμένα εαυτά και μη εαυτά αντιγόνα εκφράζονται έντονα στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (ΑΠΚ) και έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην στόχευση πεπτιδικών αντιγόνων στα ΑΠΚ, με σκοπό την αντιγονοπαρουσίαση στα T λεμφοκύτταρα και την τροποποίηση των ανοσολογικών αποκρίσεων. (McGreal, Miller et al. 2005) Σε ποντικούς που χορηγήθηκε αντίσωμα έναντι του υποδοχέα DEC-205 ενωμένο με μυελινικά αυτοαντιγόνα είτε από MOG (Hawiger, Masilamani, Bettelli et al. 2004) είτε από PLP (McGreal, Miller et al. 2005), παρατηρήθηκαν ανεπαρκείς αποκρίσεις των T λεμφοκυττάρων και αντίσταση στην επαγωγή ΠΑΕ. Μία άλλη προσέγγιση είναι η στόχευση αντιγονικών πεπτιδίων στον υποδοχέα μαννόζης, ο οποίος εκφράζεται έντονα στα ΑΠΚ, συλλαμβάνει και παρουσιάζει διαλυτούς προσδέτες, με ειδικότητα στις έντονα γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια μυκήτων, βακτηρίων και παρασίτων. (Sallusto, Cella et al. 1995) Μαννοζυλιωμένα πεπτίδια (Engering, Cella et al. 1997; Tan, Mommaas et al. 1997) ή πεπτίδια τα οποία έχουν συζευχθεί χημικά με μαννάνη (τον πολυσακχαρίτη της μαννόζης) υφίστανται έντονη αντιγονοπαρουσίαση μέσω των MHC μορίων τάξης I και II στα T λεμφοκύτταρα. (Apostolopoulos, Pietersz et al. 1995) Ωστόσο τα μαννοζυλιωμένα πεπτίδια δεν προωθούν τις ανοσολογικές αποκρίσεις *in vivo*. Αντ' αυτού ανοσοποίηση ποντικών

με μαννοζυλιωμένο PLP<sub>139-151</sub>, παρουσία πλήρους ανοσοενισχυτικού με μυκοβακτήριο, προκάλεσε μειωμένες αποκρίσεις πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων, εξασθενημένες αποκρίσεις υπερευαισθησίας καθυστερημένου τύπου και προστάτευσε τους ποντικούς από την ανάπτυξη ΠΑΕ μετά από ανοσοποίηση με PLP<sub>139-151</sub>. (Luca, Kel et al. 2005; Kel, Oldenampsen et al. 2007; Kel, Slütter et al. 2008) Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την συμμετοχή των ΑΠΚ στην ανάπτυξη ανοχής σε μαννοζυλιωμένα αυτοαντιγόνα και υποδεικνύουν ότι η στόχευση αντιγόνων στον υποδοχέα μαννόζης αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη στρατηγική καταστολής των αυτοάνοσων αποκρίσεων. (Tseveleki et al. 2015)

Η μαννάνη, ένας πολυσακχαρίτης του ζυμομύκητα, έχει μοριακή δομή που αναγνωρίζεται ως παθογόνο ( pathogen associated molecular pattern, PAMP) και σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλεί την ενεργοποίηση των μακροφάγων, (Tada, Nemoto et al. 2002) επάγει την φαινοτυπική ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (ΔΚ) μέσω του υποδοχέα τύπου Toll-4 (Toll-like receptor 4, TLR-4) (Sheng, Pouniotis et al. 2006) και ενισχύει την αντιγονοπαρουσίαση και τις ανοσολογικές αποκρίσεις. (Apostolopoulos, Pietersz et al. 2000) Σύμφωνα με μελέτες η σύζευξη του ανθρώπινου καρκινικού αντιγόνου mucin 1 (MUC1) με τη μαννάνη στην οξειδωμένη (oxidized mannan, OM) ή την ανηγμένη της μορφή (reduced mannan, RM) οδηγεί στην αποτελεσματική αντιγονοπαρουσίαση του από τα MHC τάξης I και II και στην επαγωγή των ανοσολογικών αποκρίσεων τύπου T1 και T2 αντίστοιχα, με το OM-MUC1 να δίνει τις εντονότερες αποκρίσεις των κυτταροτοξικών T IFN- $\gamma^+$  λεμφοκυττάρων και να προστατεύει από το σχηματισμό όγκου. (Apostolopoulos, Pietersz et al. 1995; Apostolopoulos, Pietersz et al. 2000)

Λαμβάνοντας υπόψην όλα αυτά τα ευρήματα, η ερευνητική ομάδα μας διεξήγαγε έρευνες με σκοπό την αξιολόγηση των αυτοαντιγόνων που έχουν συζευχθεί με μαννάνη ως πιθανή στρατηγική εκτροπής των ανοσοαποκρίσεων των μυελοειδικών T λεμφοκυττάρων προς έναν ανοσορρυθμιστικό φαινότυπο και μείωσης της ευαισθησίας των ποντικών για την ΠΑΕ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα αντιγόνα μυελίνης που έχουν συζευχθεί με μαννάνη επάγουν ανοχή των πεπτίδο-ειδικών T λεμφοκυττάρων και προστατεύουν ή θεραπεύουν τα συμπτώματα της ΠΑΕ, όταν χορηγούνται προφυλακτικά (ως εμβόλιο) ή θεραπευτικά αντίστοιχα. Συγκεκριμένα το OM-MOG (δηλαδή MOG που έχει συζευχθεί μαννάνη στην οξειδωμένη της μορφή) , η μελέτη του οποίου θα απασχολήσει αυτήν την εργασία, έχει δειχθεί ότι προστατεύει από την ΠΑΕ, προλαμβάνοντας την ανάπτυξη φλεγμονωδών και απομυελινωτικών βλαβών στο νωτιαίο μυελό. Αυτό υποδεικνύει πως η λειτουργία των μυελοειδικών CD4 T λεμφοκυττάρων αναστέλλεται από την έκθεση σε OM-MOG. Ενδιαφέρον έχει ότι η προστασία αυτή δεν σχετίζεται με τη διαφοροποίηση και ωρίμανση των Th17, Th1 ή Tregs υποπληθυσμών των CD4 T λεμφοκυττάρων, ή με διαφορετική απόκριση ως προς την απόπτωση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Αντίθετα, τα κύτταρα των ποντικών που έχουν δεχτεί εμβολιασμό με το OM-MOG φαίνεται να χαρακτηρίζονται από μειωμένη ικανότητα αντιγόνο-ειδικού πολλαπλασιασμού (Tseveleki et al. 2015). Ο προτεινόμενος μηχανισμός είναι η επαγωγή αντιγόνο-ειδικής T κυτταρικής ανοχής και ενδεχόμενης ανέργειας στα μυελοειδικά T λεμφοκύτταρα, δηλαδή ενός φαινοτύπου που χαρακτηρίζεται από περιορισμένη απόκριση αυτών στην επαφή με το αντιγόνο. (Valdor, Macian 2013)

## Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας η διερεύνηση του εάν η μειωμένη ικανότητα αντιγονοειδικού πολλαπλασιασμού των μυελοειδικών T λεμφοκυττάρων, που οφείλεται στην έκθεση σε OM-MOG, επιδρά και στην ικανότητα αυτών να μεταναστεύουν στο ΚΝΣ και να πυροδοτούν την ανάπτυξη απομυελινωτικών βλαβών και την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων της νόσου. Εν συντομία, δημιουργήθηκαν χμιαρικά ποντίκια χρησιμοποιώντας συνισογενή CD45.1/2 C57BL/6 στελέχη ποντικών, με την μεταφορά σημασμένων με φθορίζουσα χρωστική T λεμφοκυττάρων από ποντικούς δότες, οι οποίοι έχουν εκτεθεί σε OM-MOG ή PBS (ομάδα ελέγχου) και ανοσοποιηθεί για την ανάπτυξη ΠΑΕ, σε ποντικούς δέκτες στους οποίους είχε επαχθεί ΠΑΕ. Με αυτόν τον τρόπο μπορέσαμε να εντοπίσουμε τα κύτταρα των δοτών που έχουν ή δεν έχουν εκτεθεί σε OM-MOG μέσα στους δέκτες, και συγκρίναμε τη συμβολή τους στην επαγωγή της νόσου. Συγκεκριμένα, θυσιάσαμε τους ποντικούς δέκτες όταν εκδήλωσαν τα συμπτώματα της ΠΑΕ, απομονώσαμε τα T λεμφοκύτταρα και συγκρίνουμε την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και στο ΚΝΣ, αλλά και τη μεταναστευτική τους δραστηριότητα στους ιστούς του ΚΝΣ, με χρήση κυτταρομετρίας ροής και χρώσης για ειδικά αντισώματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η φυσιολογική πολλαπλασιαστική ικανότητα των T λεμφοκυττάρων που είχαν εκτεθεί σε OM-MOG ανακτάται στο περιβάλλον της ΠΑΕ του δέκτη και πως η μετανάστευτική τους ικανότητα δε μεταβάλλεται αλλά καθυστερεί σε σχέση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου.



## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Περιγραφή της πειραματικής πορείας

Ποντικοί δότες (με λευκοκυτταρικό αντιγόνο CD45.2 ή CD45.1), υποβλήθηκαν σε ένα πρωτόκολλο εμβολιασμού μέσω της ενδοδερμικής οδού με OM-MOG διαλυμένου σε ή μόνο με PBS (ομάδα ελέγχου). Χρησιμοποιήθηκαν ποντικοί δέκτες, με διαφορετικό λευκοκυτταρικό αντιγόνο (CD45.1 ή CD45.2) που δεν εμβολιάστηκαν. Κατόπιν έγινε ανοσοποίηση με το πεπτίδιο MOG35-55 και στις δύο ομάδες. (Βλ. παρακάτω). Πριν την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων (που αναμένεται μετά τη 10<sup>η</sup> μέρα από την ανοσοποίηση) απομονώθηκαν τα T λεμφοκύτταρα από τους ποντικούς δότες, σημάνθηκαν με τη φθορίζουσα χρωστική (CFSE) για τη μέτρηση του πολλαπλασιασμού, και στη συνέχεια μεταμοσχεύθηκαν στους ποντικούς δέκτες ενδοφλεβίως. Μετά την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων έγινε θυσία των δεκτών και απομόνωση διαφόρων ιστών, για να συλλεχθούν τα μονοπύρρηνα κύτταρα που έχουν διηθήσει σε αυτούς, προκειμένου να συγκριθεί η μεταναστευτική δραστηριότητα και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων των ποντικών-δοτών οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με το OM-MOG ή το PBS.

Το αναλυτικό χρονοδιάγραμμα του πειραματικού πρωτοκόλλου φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

| Ημέρες πριν/μετά την ανοσοποίηση | Διαδικασία   |
|----------------------------------|--|
| -45                              | 1ος Εμβολιασμός των δοτών (CD45.2) με OM-MOG ή PBS   |
| -30                              | 2ος Εμβολιασμός των δοτών (CD45.2) με OM-MOG ή PBS   |
| -15                              | 3ος Εμβολιασμός των δοτών (CD45.2) με OM-MOG ή PBS   |
| 0                                | Ανοσοποίηση δοτών (CD45.2) και δεκτών (CD45.1) για την ανάπτυξη ΠΑΕ<br>Χορήγηση της τοξίνη <i>Bordetella pertussis</i> στους δέκτες (CD45.1) |
| 2                                | Χορήγηση της τοξίνη <i>Bordetella pertussis</i> στους δέκτες (CD45.1)  |
| 9                                | Απομόνωση T λεμφοκυττάρων από τους δότες (CD45.2) και <i>in vitro</i> επαναδιέγερση με MOG35-55  |
| 10                               | Σήμανση με CFSE και μεταμόσχευση στους δέκτες (CD45.1)   |
| 13-19                            | Θυσία δεκτών (CD45.1) για απομόνωση T λεμφοκυττάρων από τους ιστούς και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής  |

Επίσης προκειμένου να εκτιμηθεί η ευπάθεια στο θάνατο των ανοσοκυττάρων που έχουν εκτεθεί σε OM-MOG έγινε μελέτη του θανάτου μέσω ενεργοποίησης. Ποντικοί C57BL/6 εμβολιάστηκαν με OM-MOG ή PBS (ομάδα ελέγχου). Δεκαπέντε ημέρες

μετά τον τελευταίο εμβολιασμό έγινε ανοσοποίηση με MOG35-55. Μετά από διάστημα 14 ημερών οι ποντικοί θυσιάστηκαν και έγινε απομόνωση των σπληνοκυττάρων τους και σε αυτά προστέθηκαν PMA και Ionomycin που ενεργοποιούν τα T λεμφοκύτταρα. Η εκτίμηση του θανάτου των T λεμφοκυττάρων έγινε με κυτταρομετρία ροής.

### **Ποντικοί: Σειρές, συνθήκες και γενοτύπηση**

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν χιμαιρικοί ποντικοί που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας C57BL/6 ποντικούς που ήταν συνισογενείς για το αλληλόμορφο CD45 (ειδικό λευκοκυτταρικό αντιγόνο). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν ποντικοί αγρίου τύπου C57BL/6 (CD45.2) και συνισογενή (congenic) στελέχη ποντικών CD45.1 C57BL/6 αλλά και διαγονιδιακοί ποντικοί C57BL/6-Tg (TCRa2D2, TCRb2D2)1Kuch/J (CD45.2, 2D2) προκειμένου να διευκολυνθεί η ανίχνευση των MOG35-55 ειδικών T λεμφοκυττάρων *in vivo*. Τα T λεμφοκύτταρα του στελέχους 2D2 έχουν TCR ειδικό για το πεπτίδιο MOG35-55. Πάνω του 90% των T λεμφοκυττάρων τους εκφράζουν διαγονιδιακές Vα και Vβ αλυσίδες, που είναι ειδικές για τον εγκεφαλιτογόνο επίτοπο MOG35-55 και εμφανίζουν την ΠΑΕ αυθόρμητα σε χαμηλό ποσοστό μεταξύ 4 και 15%. Το στέλεχος αυτό αγοράστηκε από το Jackson Laboratory. Τα congenic CD45.1 C57BL/6 στελέχη ήταν μία ευγενική προσφορά των Burkhard Becker και Melanie Greter (Πανεπιστήμιο Ζυρίχης).

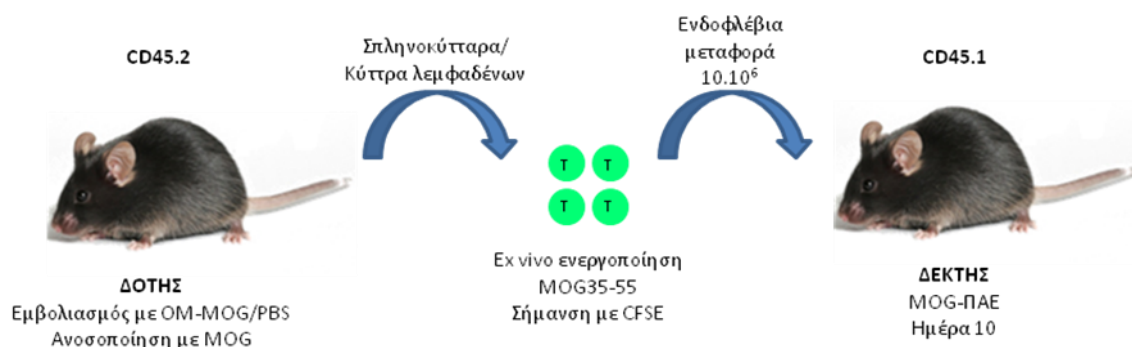
Οι ποντικοί διατηρήθηκαν υπό συνθήκες ελεύθερες συγκεκριμένων παθογόνων (SPF – Standard Pathogen Free) στη μονάδα πειραματοζώων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Όλες οι πειραματικές δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν με τρόπο τέτοιο ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο πόνος και σε πλήρη συμμόρφωση με τις αρχές των τριών R (Replacement, Refinement and Reduction) ακολουθώντας τις κατευθυντήριες γραμμές της οδηγίας 2010/63/EU της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την έρευνα σε πειραματόζωα. Οι άδειες πειραματισμού χορηγήθηκαν από τη Γενική Γραμματεία Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής του Ελληνικού κράτους σύμφωνα με το προεδρικό διάταγμα 160/91. Η αναφορά των πειραμάτων σε αυτή τη μελέτη ακολουθεί τις οδηγίες ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments).

Ο προσδιορισμός του γενοτύπου των 2D2 ποντικών πραγματοποιήθηκε με την απομόνωση γενετικού υλικού (DNA) από ιστό ουράς και εκτέλεση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR – Polymerase Chain Reaction) με τη χρήση ειδικών εκκινητών (primers) για το συγκεκριμένο διαγονίδιο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο, ώστε να μπορεί το πολλαπλασιασμένο DNA να γίνει ορατό κάτω από το υπεριώδες φως με τη μορφή φωτεινής ζώνης.

Για τον προσδιορισμό του γονοτύπου των congenic CD45.1 και η διάκριση τους από τους C57BL/6 CD45.2 ποντικούς πραγματοποιήθηκε αιμοληψία από την ουρά των ποντικών, λύση των ερυθροκυττάρων και απομόνωση των λευκοκυττάρων που εκφράζουν τους επιφανειακούς δείκτες CD45. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε 2% παραφορμαδεΰδη σε PBS. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση με αντισώματα ειδικά για τα αλληλόμορφα CD45.1 και CD45.2, τα οποία φέρουν τα φθοροχρώματα φυκοερυθρίνη (PE) και αλλοφυκοκυανίνη (APC). Τα δείγματα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS).

## Δημιουργία Χιμαιρικών Ποντικών

Ακολουθεί ένα παράδειγμα όπου απεικονίζεται σχηματικά η δημιουργία των χιμαιρικών ποντικών ως προς το δείκτη του ειδικού λευκοκυτταρικού αντιγόνου. Ο οργανισμός που θα προκύψει θα περιλαμβάνει εκτός από τα δικά του λευκοκύτταρα (με δείκτη CD45.1 στο παράδειγμα παρκάτω) και λευκοκύτταρα του δότη με διαφορετικό ειδικό λευκοκυτταρικό αντιγόνο (CD45.2). Έτσι είναι δυνατός ο διαχωρισμός και η ανίχνευση των κυττάρων που προέρχονται από τους δότες και τους δέκτες στους διάφορους ιστούς των δεκτών.



## Σύνθεση του πεπτιδίου μυελίνης MOG35-55 του ποντικού

Η σύνθεση του MOG35-55 (εφεξής MOG) πεπτιδίου και του συζευγμένου με μαννάνη πεπτιδίου MOG35-55 συντέθηκαν όπως έχει περιγραφεί πορηγουμένως από την Tseveleki et al. (2015) και ήταν διαθέσιμα σε εμάς μέσω της συνεργασίας μας με τον καθ.Θ. Τσέλιο του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών.

## Χορήγηση των συζευγμένων με μαννάνη πεπτιδίων στους ποντικούς

Ποντικοί αγρίου τύπου C57BL/6, όπως επίσης 2D2 και congenic ποντικοί, οι οποίοι αποτελούσαν τους δότες, υποβλήθηκαν σε ένα προφυλακτικό πρωτόκολλο εμβολιασμού με το συζευγμένο με μαννάνη πεπτίδιο OM-MOG. Η χορήγηση του πεπτιδίου έγινε μέσω της διαδερμικής οδού (i.d.) με ένεση στην περιοχή του μηρού, η

οποία περιείχε δόση 30μg OM-MOG σε διάλυμα όγκου 100μl. Ποντικοί αντίστοιχης ηλικίας (3-4 μηνών) και γονοτύπου εμβολιάστηκαν διαδερμικά με 100μl PBS ως ομάδες ελέγχου. Τρεις διαδοχικές δόσεις χορηγήθηκαν στα πειραματόζωα ανά χρονικά διαστήματα 15 ημερών και η ανοσοποίηση για την επαγωγή της ΠΑΕ πραγματοποιήθηκε 15 ημέρες μετά την τελευταία δόση.

### **Επαγωγή της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας**

Η επαγωγή της ΠΑΕ πραγματοποιήθηκε τόσο στους δότες (C57BL6, 2D2 και congenic) όσο και σε δέκτες ηλικίας 3-4 μηνών: congenic CD45.1 (για δότες C57BL6 και 2D2, CD45.2) και C57BL6 CD45.2 (για δότες congenic CD45.1) με τον ίδιο τρόπο, 15 ημέρες μετά τον τελευταίο εμβολιασμό των δοτών. Η ανοσοποίηση έγινε με υποδόρια ένεση στη βάση της ουράς με 37μg MOG35-55 διαλυμένα σε 100 μl PBS και γαλακτοποιημένα σε ίσο όγκο πλήρους ανοσοενισχυτικού του Freud (CFA, Complete Freud's Adjuvant). Το πρωτόκολλο επαγωγής της ΠΑΕ προβλέπει επίσης και την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση (i.p.) 200 ng τοξίνης *Bordetella pertussis* (PTx) (Sigma-Aldrich), την ημέρα της ανοσοποίησης και 48 ώρες αργότερα. Η χορήγηση της PTx έγινε μόνο στους δέκτες και σε κάποιους από τους congenic δότες. Το CFA που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα, είχε προηγουμένως ενισχυθεί με το στέλεχος H37Ra του *Mycobacterium tuberculosis* (Difco) σε δόση 400 μg/ποντίκι. Οι ποντικοί παρακολουθούνταν καθημερινά για την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων της ΠΑΕ και αξιολογούνταν με βάση την ακόλουθη κλίμακα:

0: φυσιολογική κινητικότητα

1: παράλυση ουράς

2: αδυναμία οπίσθιων άκρων

3: παράλυση οπίσθιων άκρων

4: παράλυση πρόσθιων άκρων

5: ετοιμοθάνατο ή νεκρό

Οι διαβαθμίσεις 0,5 αντιπροσωπεύουν τις ενδιάμεσες καταστάσεις. Ποντικοί με βαθμολογία 4,5 και άνω υπέστησαν ευθανασία και έλαβαν κλινικό βαθμό 5 για τις υπόλοιπες ημέρες του πειράματος. Τα πειραματόζωα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

### **Θυσία των δοτών και απομόνωση των κυττάρων από τη σπλήνα και τους λεμφαδένες**

Κατά την 9<sup>η</sup> ημέρα μετά την ανοσοποίηση, χρονικό στάδιο κατά το οποίο δεν είχαν εκδηλωθεί τα κλινικά συμπτώματα της ΠΑΕ, οι ποντικοί δέκτες θυσιάστηκαν και απομονώθηκαν και έγινε εξαγωγή της σπλήνας και των μασχαλαίων, βουβωνικών

και μεσεντέριων λεμφαδένων τους. Τα όργανα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία petri που περιλάμβαναν θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies) ενισχυμένο με 10% FBS και 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη (Sigma). Ακολούθησε ομογενοποίηση με έμβολο σύριγγας και μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε σωλήνα ειδικό για φυγοκέντρηση, καθώς και πλύση του τρυβλίου με RPMI για να συλλεχθούν και τα εναπομείναντα κύτταρα. Κατόπιν ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία 4 °C σε ταχύτητα 1200 στροφές/λεπτό. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης τα κύτταρα βρίσκονταν τον πάτο του σωλήνα με τη μορφή ιζήματος και έγινε απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε PBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και ξανά απόρριψη του υπερκειμένου. Στη συνέχεια έγινε επαναιώρηση του ιζήματος σε διάλυμα Gey's , που είναι διάλυμα ειδικό για την λύση των ερυθροκυττάρων. Για την διακοπή της αντίδρασης του Gey's προστέθηκε διπλάσιος όγκος RPMI και το διάλυμα των κυττάρων διηθήθηκε με φίλτρο μεγέθους πόρων 70  $\mu\text{m}$  προκειμένου να απομακρυνθούν θραύσματα μεγαλύτερου μεγέθους. Ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω και το προκύπτον ίζημα που περιλάμβανε μόνο τα λευκά κύτταρα επαναδιαλύθηκε σε 10 ml RPMI για να ακολουθήσει ο προσδιορισμός του τελικού αριθμού των κυττάρων. Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων έγινε με τη μέτρηση μικρής ποσότητας αυτών στο οπτικό μικροσκόπιο με τη βοήθεια της πλάκας Neubauer. Συγκεκριμένα μεταφέρθηκαν 10  $\mu\text{l}$  εναιωρήματος κυττάρων σε σωλήνα erpendorf και προστέθηκαν 90  $\mu\text{l}$  RPMI, έγινε καλή ανάδευση και μικρή ποσότητα του διαλύματος τοποθετήθηκε στην πλάκα και έγινε μέτρηση. Ο αριθμός των κυττάρων πολλαπλασιάστηκε με συντελεστή  $10^4$  , καθώς και με τον συντελεστή αραιώσης που ήταν 10 στη συγκεκριμένη περίπτωση. Ο αριθμός που προέκυψε αποτελούσε τη συγκέντρωση των κυττάρων ανά ml. Επιπλέον πολλαπλασιασμός επί 10 (όσα ml ήταν το αρχικό διάλυμα κυττάρων) έδωσε τον ολικό αριθμό των κυττάρων. Η επιθυμητή συγκέντρωση των κυττάρων προς καλλιέργεια ήταν  $5 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml οπότε έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις ή συμπυκνώσεις (μέσω φυγοκέντρησης και επαναιώρησης) των δειγμάτων για να προσαρμοστούν οι συγκεντρώσεις τους σε αυτήν την τιμή. Εξασφαλίστηκε όγκος διαλύματος κυττάρων τουλάχιστον 18 ml / ποντίκι δότη και τοποθετήθηκαν 3 ml κυττάρων/πηγαδάκι σε πιάτο καλλιέργειας με 6 πηγαδάκια (6 well plates ). Προστέθηκαν επίσης 10 $\mu\text{g/ml}$  MOG35-55 και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες σε επωαστικό κλίβανο (37 °C, υγρασία 95%, CO<sub>2</sub> 5%).

### **Χρώση με φθορίζον CFDA-SE και μεταφορά στους ποντικούς δέκτες**

Μετά το πέρας των 16 ωρών έγινε συλλογή των κυττάρων από τα πιάτα καλλιέργειας και μεταφορά τους σε σωλήνα φυγοκέντρου. Έγινε επίσης πλύση του πιάτου με RPMI για τη συλλογή κυττάρων που πιθανόν έχουν παραμείνει στον πάτο του. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις συνθήκες που έχουν περιγραφεί παραπάνω, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε PBS. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το

ίζημα επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα PBS που περιείχε Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFDA-SE) σε συγκέντρωση 7 $\mu$ M, της εταιρείας Molecular Probes. Το προϊόν αυτό διαπερνά εύκολα την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Είναι άχρωμο και μη φθορίζον μέχρι οι ακετομάδες του να υδρολυθούν από τις ενδοκυτταρικές εστεράσες, με αποτέλεσμα τη δημιουργία του ισχυρά φθορίζοντος CFSE που αντιδρά με τις ενδοκυτταρικές αμινομάδες σχηματίζοντας σταθερά φθορίζοντα σύμπλοκα. Επιτρέπεται έτσι η παρατήρηση των σημασμένων κυττάρων για αρκετές μέρες μετά τη χρώση, καθώς και η οπτικοποίηση του πολλαπλασιασμού τους, με βάση την ένταση του φθορισμού. Τα κύτταρα επώαστηκαν στο διάλυμα του CFDA-SE για 9 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι. Στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος 4% FBS / PBS για να σταματήσει η αντίδραση και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά, στις 1200 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία 4 °C. Ακολούθησαν 2 πλύσεις με 2% FBS / PBS για την απομάκρυνση της περίσσειας χρωστικής που δεν αντέδρασε. Κατά τη 2<sup>η</sup> πλύση προσδιορίστηκε ο αριθμός των κυττάρων, με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω ώστε μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το ίζημα των λευκοκυττάρων να επαναδιαλυθεί στον κατάλληλο όγκο PBS, ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι 50\*10<sup>6</sup> κύτταρα/ml.

Στη συνέχεια έγινε η χορήγηση των σημασμένων κυττάρων των δοτών στους δέκτες. Στις περιπτώσεις όπου οι δότες ήταν 2D2 ή C57BL6 (CD45.2) οι δέκτες ήταν congenic (CD45.1). Στην περίπτωση όπου οι δότες ήταν congenic (CD45.1) οι δέκτες ήταν C57BL6 (CD45.2). Κάθε ποντικός δέκτης έλαβε 10 εκατομμύρια κύτταρα σε όγκο 200 $\mu$ l μέσω της ενδοφλέβιας οδού (i.v.).

### **Παρακολούθηση και θυσία των δεκτών**

Στο διάστημα των επόμενων ημερών οι δέκτες των ανοσοκυττάρων παρακολούθηθηκαν για την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων της ΠΑΕ, βαθμολογήθηκαν σύμφωνα με την προαναφερθείσα κλίμακα. Η θυσία των δεκτών πραγματοποιήθηκε κατά χρονικό διάστημα 13-19 ημερών μετά την ανοσοποίηση, οπότε και εκδηλώθηκαν τα κλινικά συμπτώματα της ΠΑΕ. Το χρονικό διάστημα αυτό επιτρέπει παράλληλα την παρακολούθηση των CFSE κυττάρων των δοτών, καθώς δεν θα έχουν προβεί σε τόσες διαιρέσεις, ώστε να έχει μειωθεί η ένταση του φθορισμού τόσο, όσο να μην ανιχνεύεται με κυτταρομετρία ροής. Η θυσία έγινε με τη χρήση χλωροφορμίου και όχι με αυχενική παρεκτόπιση, προκειμένου να μην καταστραφούν οι ιστοί του νωτιαίου μυελού. Από τους δέκτες απομονώθηκαν η σπλήνα, οι μασχαλιαίοι, βουβωνικοί και μεσεντέριοι λεμφαδένες, οι μήνιγγες του εγκεφάλου καθώς και οι μήνιγγες και το παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού, με σκοπό την ανάλυσή τους στο FACS.

### **Απομόνωση κυττάρων από τις μήνιγγες του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού**

Η απομόνωση των μηνίγγων τόσο του νωτιαίου μυελού, όσο και του εγκεφάλου έγινε με τη βοήθεια στερεοσκοπίου. Αφού απομονώθηκαν οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε

μικρό τρυβλίο με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε HBSS 5 mM HEPES και 2 mM EDTA, και παρέμειναν για μία ώρα στους 4 °C. Μετά το πέρας της μίας ώρας ακολούθησε ομογενοποίηση του ιστού με έμβολο μικρής σύριγγας από καουτσούκ μέσα στο μικρό τρυβλίο. Έγινε διήθηση εναιωρήματος των κυττάρων με φίλτρο μεγέθους πόρων 70 μm προκειμένου να απομακρυνθούν θραύσματα μεγαλύτερου μεγέθους, μεταφορά του σε σωλήνα φυγοκέντρου των 15 ml και πλύση του τρυβλίου για να απομακρυνθούν τα εναπομείναντα κύτταρα από τον πάτο του. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία δωματίου, 1200 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά, απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα ειδικό για κυτταρομετρία ροής (FACS buffer), το οποίο περιείχε 3% v/v FBS σε PBS 1x. Το διάλυμα κυττάρων μεταφέρθηκε σε σωληνάκια erpendorf και ακολούθησε φυγοκέντρωση στους 4 °C, 1200 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα αντισωμάτων (CD45.1, CD45.2) προκειμένου να ακολουθήσει η χρώση των κυττάρων και η ανάλυση στο κυτταρόμετρο (FACSCalibur, BD biosciences).

#### **Απομόνωση κυττάρων από το παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού**

Η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων που έχουν διηθήσει στο παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού έγινε με φυγοκέντρωση κλίσης πυκνότητας. Από τους δέκτες που θυσιάστηκαν έγινε εξαγωγή του ιστού και τοποθέτηση του πάνω σε φίλτρο μεγέθους πόρων 70 μm και σε τρυβλίο με RPMI. Ακολούθησε ομογενοποίηση του ιστού πάνω στο φίλτρο, με το έμβολο από καουτσούκ μικρής σύριγγας, προκειμένου να μην περάσουν στο εναιώρημα θραύσματα μεγαλύτερου μεγέθους. Έγινε μεταφορά του εναιωρήματος σε μικρό σωλήνα φυγοκέντρωσης (15 ml) και πλύση του τρυβλίου. Κατόπιν τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, 1400 στροφές/λεπτό, για 15 λεπτά. Το ίζημα που προέκυψε επαναδιαλύθηκε σε RPMI όγκου 4,6 ml. Στο εναιώρημα προστέθηκαν 2 ml Stock Isotonic Percoll (SIP) το οποίο περιείχε 1 μέρος PBS 10x και 9 μέρη Percoll (GE, Healthcare, Sigma-Aldrich). Το προκύπτον εναιώρημα περιείχε περιεκτικότητα σε Percoll 30% v/v. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε κάτω από το εναιώρημα με πιπέττα Pasteur διάλυμα με 70% v/v περιεκτικότητα Percoll σε PBS 1x. Η τοποθέτηση του διαλύματος έγινε πολύ αργά και προσεκτικά ώστε να μην αναμειχθεί με το εναιώρημα των κυττάρων και να σχηματιστούν δύο διακριτές φάσεις. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 2300 στροφές/λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου, για 20 λεπτά με επιτάχυνση 1 και επιβράδυνση 0. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης προέκυψαν η άνω φάση που περιείχε τη μυελίνη και η ενδιάμεση φάση που περιείχε τα μονοπύρηνια κύτταρα. Έγινε συλλογή της ενδιάμεσης φάσης και προστέθηκε RPMI. Ακολούθησαν άλλες δύο πλύσεις με RPMI, επαναιώρηση των κυττάρων σε FACS buffer, φυγοκέντρωση και επαναδιάλυση του ιζήματος στο διάλυμα των αντισωμάτων για να ακολουθήσει η χρώση και η ανάλυση στο FACS.

#### **Απομόνωση και μονιμοποίηση των κυττάρων των λεμφαδένων και της σπλήνας**

Η απομόνωση των κυττάρων από τις σπλήνες και τους λεμφαδένες των δεκτών έγινε με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω. Μετά τον προσδιορισμό του αριθμού των ανοσοκυττάρων (βλέπε παραπάνω) ακολούθησε φυγοκέντρηση στις συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε όγκο 1 ml PBS για τους λεμφαδένες και 10 ml για τις σπλήνες. 1ml διάλυμα των κυττάρων των σπληνών και όλο το διάλυμα κυττάρων των λεμφαδένων τοποθετήθηκαν σε σωλήνες erpendorf προς μονιμοποίηση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επαναιώρηση του ιζήματος σε 400μl διάλυμα PBS. Στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος 4% v/v παραφορμαλδεΐδης ( PFA) με ταυτόχρονη ανάδευση του διαλύματος. Το διάλυμα που προέκυψε περιείχε 2% PFA και τα ανοσοκύτταρα παρέμειναν 20 λεπτά μέσα σε αυτό, σε σκοτάδι και στους 4 °C. Ακολούθησε προσθήκη ίσου όγκου PBS για να σταματήσει η μονιμοποίηση και φυγοκέντρηση στις προαναφερθείσες συνθήκες. Τέλος το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε κατάλληλο όγκο PBS και αποθηκεύτηκε στους 4 °C μέχρι να γίνει η χρώση και ανάλυση τους στο FACS. Πριν τη χρώση προηγήθηκε πλύση με FACS buffer. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και το ίζημα επαναιωρήθηκε στο διάλυμα των αντισωμάτων για να ακολουθήσει η χρώση και η ανάλυση στο FACS.

### **Χρώση των λευκοκυττάρων με φθορίζοντα αντισώματα έναντι των αντιγόνων CD45.1 και CD45.2**

Τα κύτταρα που απομονώθηκαν από τις μήνιγγες, το παρέγχυμα, τους λεμφαδένες και τους σπλήνες υποβλήθηκαν σε χρώση με τα φθορίζοντα αντισώματα PE Mouse Anti-Mouse CD45.1 (Clone A20, BD Biosciences) και APC Mouse anti-Mouse CD45.2 (Clone 104, BD Biosciences) που έχουν ως στόχο τα ειδικά λευκοκυτταρικά αντιγόνα CD45.1 και CD45.2 αντίστοιχα. Τα λευκοκύτταρα από τους διάφορους ιστούς επώαστηκαν στο διάλυμα των αντισωμάτων σε σκοτάδι και σε θερμοκρασία 4 °C. Το διάλυμα των αντισωμάτων περιείχε FACS buffer και τα αντισώματα σε αραιώση 1/250 και για κάθε δείγμα (με περίπου  $10^5$ - $10^6$  κύτταρα) χρησιμοποιήθηκε όγκος 100 μl. Ακολούθησε επώαση για 10 ακόμη λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη FACS buffer (800 μl) και φυγοκέντρηση στις συνθήκες που έχουν προαναφερθεί. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε κατάλληλο όγκο FACS buffer και το εναιώρημα μεταφέρθηκε σε σωλήνες κατάλληλους (FACS tubes) για το FACS. Ακολούθησε η ανάκτηση των δεδομένων και η ανάλυση στον υπολογιστή του FACS.

### **Ανάλυση των δειγμάτων στο FACS**

Η Κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική για τη μέτρηση και τον χαρακτηρισμό μικροσκοπικών σωματιδίων σε ρέον υγρό. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών παραμέτρων των φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων τα οποία ρέουν διαμέσου μιας συσκευής οπτικής ή/και ηλεκτρονιακής ανίχνευσης. Μία δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού. Ένας



αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). (Givan 1992)

Μέρος του κυτταρόμετρου αποτελεί και ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής ο οποίος με ένα ειδικό λογισμικό ( στην προκειμένη περίπτωση CellQuest software της εταιρίας BD) επιτρέπει την οπτικοποίηση των δειγμάτων και την ανάκτηση των δεδομένων. Συνδυασμός μετρήσεων του FSC και SSC επιτρέπουν το διαχωρισμό διαφορετικών κυτταρικών τύπων από έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων. Οι κύριοι υποπληθυσμοί λευκοκυττάρων (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα) διαχωρίζονται χάρη στη διαφορετική τους θέση στο διάγραμμα FSC και SSC, και έτσι είναι εύκολη η επιλογή του πληθυσμού (gating) προς ανάκτηση και ανάλυση. Τα ανοσοκύτταρα είχαν επωαστεί με αντισώματα έναντι των CD45.1, CD45.2 αντιγόνων που φέρουν τα φθοριοχρώματα PE και APC αντίστοιχα, καθώς και με CFSE (στην περίπτωση των κυττάρων των δοτών) με μέγιστα μήκη κύματος εκπομπής/απορρόφησης 496 nm/578 nm 650 nm/660 nm και 492/517 nm αντίστοιχα. Έγιναν λοιπόν οι κατάλληλες ρυθμίσεις ανάκτησης ( όσον αφορά στο μήκος κύματος και την αλληλεπικάλυψη των φασμάτων εκπομπής των φθοριοχρωμάτων) για να έχουμε τη βέλτιστη δυνατή εικόνα στα διαγράμματα φθορισμού και να προσδιορίζονται οι πληθυσμοί που είναι θετικοί για τα αντισώματα αλλά και το CFSE. Για την ανάλυση του πολλαπλασιασμού επιλέχθηκαν οι πληθυσμοί θετικοί για CFSE, και ομαδοποιήθηκαν με βάση την ένταση του σήματος του φθορισμού τους. Ομάδες κυττάρων με την ισχυρότερη ένταση φθορισμού αντιπροσώπευαν κύτταρα που δεν προχώρησαν σε διαίρεση, ενώ ομάδες με την ασθενέστερη ένταση φθορισμού αντιπροσώπευαν κύτταρα που είχαν προχωρήσει σε πολλές διαιρέσεις. Έτσι αναλύθηκε ο αριθμός των κυττάρων στις διάφορες εντάσεις φθορισμού που αντιπροσώπευαν τις διαιρέσεις και έγινε σύγκριση ανάμεσα στην πειραματική και τη ομάδα ελέγχου. Όσον αφορά στην ανάλυση της μετανάστευσης επιλέχθηκαν τα κύτταρα που ήταν θετικά για τα αντιγόνα των δοτών (CD45.1 ή CD45.2), αναλύθηκε ο αριθμός τους στα δείγματα από τους διάφορους ιστούς και έγινε σύγκριση ανάμεσα στην πειραματική και την ομάδα ελέγχου.

### **Επαγωγή θανάτου μέσω ενεργοποίησης**

Για τη μελέτη της επαγωγής θανάτου μέσω ενεργοποίησης (Activation Induced Cell Death, AICD) αρσενικοί ποντικοί C57BL/6 εμβολιάστηκαν με OM-MOG ή PBS (ομάδα ελέγχου) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω. Δεκαπέντε ημέρες μετά τον τελευταίο εμβολιασμό έγινε ανοσοποίηση με MOG35-55 όπως περιγράφεται παραπάνω με τη διαφορά ότι δεν χορηγήθηκε η PTx ούτε την ημέρα της ανοσοποίησης αλλά ούτε και 48 ώρες αργότερα. Μετά από διάστημα 14 ημερών οι ποντικοί θυσιάστηκαν και έγινε απομόνωση των σπληνοκυττάρων τους (βλέπε παραπάνω). Τα σπληνοκύτταρα τοποθετήθηκαν σε πιάτο καλλιέργειας με 24 θέσεις σε συγκέντρωση  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml και σε κάθε θέση τοποθετήθηκε 1 ml εναιωρήματος κυττάρων. Σε αυτά προστέθηκε Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA, Sigma-Aldrich) σε συγκέντρωση 100 ng/ml καθώς και Ιονομυκίνη (Ionomycin, Sigma-Aldrich) σε συγκέντρωση 1 μg/ml. Το PMA ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) που οδηγεί στην απελευθέρωση του ενδοκυττάρου ασβεστίου και το μονοπάτι αυτό καταλήγει στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Η Ιονομυκίνη είναι ένα ιονοφόρο το οποίο αυξάνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου και την παραγωγή κυτταροκινών. Ο συνδυασμός των δύο αυτών παραγόντων οδηγεί στην ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων καθώς και στην παραγωγή κυτταροκινών από αυτά, αλλά υπό συνθήκες μπορεί να οδηγήσει και στον κυτταρικό θάνατο μέσω ενεργοποίησης. (Han, Tie et al. 2013). Τα κύτταρα παρέμειναν μέσα στον επωαστικό κλίβανο για 20 ώρες. Μετά το πέρας των 20 ωρών έγινε η συλλογή τους κατά τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 4 οC, 1200 rpm για 10 λεπτά. Κατόπιν έγινε επαναιώρηση του ιζήματος σε FACS buffer και μεταφορά σε erpendrof. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και επαναδιάλυση του ιζήματος σε διάλυμα που περιείχε το αντίσωμα APC anti-mouse CD4 (BD Biosciences). Η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο αντίσωμα ήταν 1/300 και η επώαση διήρκησε 20 λεπτά στους 4 οC και 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε προσθήκη επιπλέον FACS buffer για τη διακοπή της επώασης και φυγοκέντρηση. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για χρώση ένατι της Αννεξίνης A5 (Annexin V), κυτταρική πρωτεΐνη που παράγεται από τα αποπτωτικά κύτταρα. Το διάλυμα αυτό (Annexin V binding buffer) περιείχε 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 0,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> και pH 7,4. Αυτό βοηθάει τη σύζευξη του αντισώματος και αννεξίνης A5. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επαναιώρηση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα αννεξίνης που περιείχε το αντίσωμα Annexin V (BD Biosciences) συζευγμένο με το φθορόχρωμα ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) σε αραιώση 1/70. Η επώαση διήρκησε 20 λεπτά στους 4 οC και 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε προσθήκη επιπλέον ρυθμιστικού διαλύματος αννεξίνης, φυγοκέντρηση, επαναιώρηση σε ρυθμιστικό διάλυμα, μεταφορά σε σωλήνες για FACS και ανάλυση στο FACS.

### **Στατιστική Ανάλυση**

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό Sigma Stat 3,5 , Sigma Plot 11 και το Microsoft Excel. Τα δεδομένα δόθηκαν ως μέση τιμή +/- τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (Standard Error Mean, SEM). Για τις συγκρίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία Student's (Student's t test). Οι διαφορές θεωρούνται στατιστικά σημαντικές όταν  $p < 0,05$ .

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι τα αντιγόνα μυελίνης που έχουν συζευχθεί με OM επάγουν ισχυρή πεπτιδο-ειδική περιφερειακή ανοχή των T λεμφοκυττάρων και προστατεύουν ποντικούς και αρουραίους από την ανάπτυξη ΠΑΕ, όταν χορηγούνται είτε θεραπευτικά είτε προφυλακτικά. Οι μελέτες αυτές απέκλεισαν ότι το OM-MOG επάγει ανοχή μέσω των κλασικών μηχανισμών όπως η ανοσολογική εκτροπή (Th1/Th2) ή η επαγωγή των T ρυθμιστικών κυττάρων, αλλά έδειξαν ότι επάγει την ανέργια των αντιγόνο-ειδικών T λεμφοκυττάρων, που εκδηλώνεται με μειωμένη ικανότητα αντιγονοειδικού πολλαπλασιασμού και μειωμένη παραγωγή IL-2 (αυξητικός παράγοντας T λεμφοκυττάρων) και του υποδοχέα της (CD25) από τα T λεμφοκύτταρα. (Tseveleki et al 2015). Σε αυτή τη μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της ανέργιας των T λεμφοκυττάρων στη μετανάστευση τους στον ιστό στόχο, το ΚΝΣ. Διερευνήθηκε επίσης η πιθανότητα η ανοχή να οφείλεται σε αυξημένη ευπάθεια των T λεμφοκυττάρων στην απόπτωση.

**Τα MOG-ειδικά CD4 T λεμφοκύτταρα που έχουν εκτεθεί σε OM-MOG εκδηλώνουν καθυστερημένη είσοδο στο ΚΝΣ αλλά στη συνέχεια έντονη διήθηση στο παρέγχυμα του ΚΝΣ κατά την ΠΑΕ**

Για τη μελέτη της μετανάστευσης των ενεργοποιημένων MOG-ειδικών T λεμφοκυττάρων προς τους ιστούς του ΚΝΣ κατά τη διάρκεια της ΠΑΕ και της διερεύνησης του εάν το OM-MOG μεταβάλλει αυτή τη διαδικασία., ποντικοί congenic (CD45.1) εμβολιάστηκαν με OM-MOG ή PBS και ανοσοποιήθηκαν με MOG, όπως περιγράφεται παραπάνω. Την ίδια χρονική στιγμή ανοσοποιήθηκαν με MOG<sub>35-55</sub>/CFA/PTx και ποντικοί αγρίου τύπου (C57BL/6, CD45.2) για την ανάπτυξη της ΠΑΕ. Πριν την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων (8-10 ημέρες μετά την ανοσοποίηση) έγινε θυσία και απομόνωση των MOG-ειδικών κυττάρων από τους congenic δότες (CD45.1), ενεργοποίηση *ex vivo* με MOG<sub>35-55</sub>, χρώση με CFSE και μεταφορά στους C57BL/6 ποντικούς δέκτες (CD45.2). Σύντομα μετά την εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων στους δέκτες (13-19 ημέρες μετά την ανοσοποίηση, λίγο μετά την έναρξη) έγινε θυσία απομονώθηκαν οι μήνιγγες και το παρέγχυμα του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, καθώς και οι σπλήνες και οι λεμφαδένες. Έγινε χρώση με φθορίζοντα αντισώματα έναντι των επιφανειακών δεικτών των κυττάρων του δότη (αντίσωμα anti-CD45.1) αλλά και των κυττάρων του δέκτη (anti-CD45.2) και ακολούθησε ανάλυση των κυττάρων που ήταν CD45.1<sup>+</sup>.

Τα αποτελέσματα ανάλυσης των κυττάρων των δοτών στους διαφορετικούς ιστούς των δεκτών συνοψίζονται στο παρακάτω διάγραμμα. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση των CD45.1<sup>+</sup> στους ιστούς των δεκτών που είχαν εκτεθεί σε OM-MOG ή PBS (ομάδα ελέγχου) και σύγκριση μεταξύ τους. Στον κάθετο άξονα απεικονίζεται ο αριθμός των

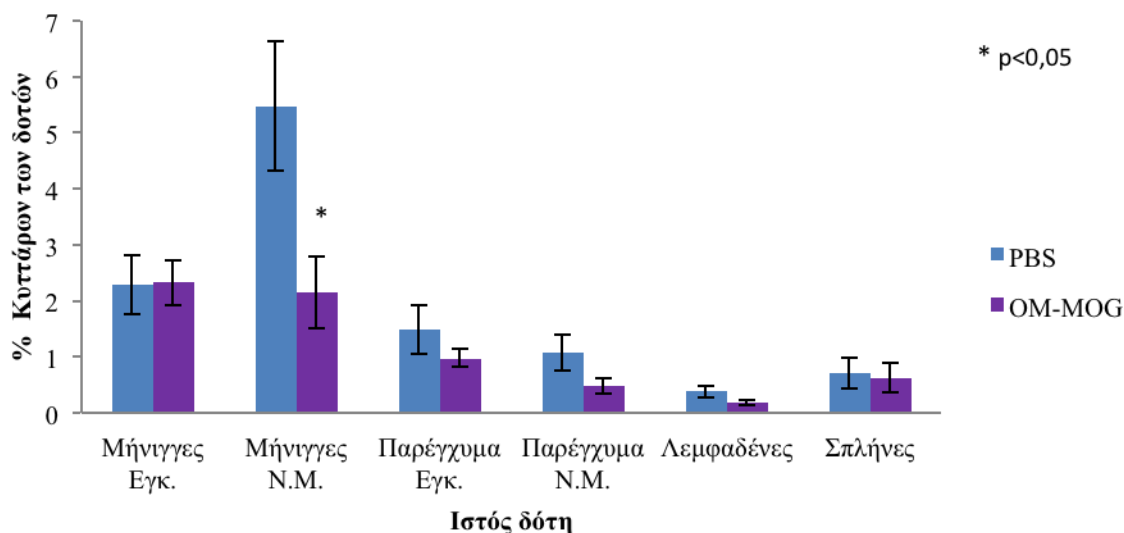
ανοσοκυττάρων των δοτών ως ποσοστό, ενώ στον οριζόντιο άξονα ο ιστός προέλευσης τους. (Βλ. Διάγραμμα 1)

Σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων έδειξε μικρότερο αριθμό κυττάρων που είχαν εκτεθεί σε OM-MOG σε σχέση με αυτά που είχαν εκτεθεί σε PBS. Υπενθυμίζεται πως ο αρχικός αριθμός των κυττάρων που είχαν εισαχθεί στους δέκτες ήταν ίδιος και για τις δύο ομάδες. Από αυτά τα αποτελέσματα ενδιαφέρον έχει η στατιστικά μικρότερη παρουσία των ανοσοκυττάρων που είχαν εκτεθεί σε OM-MOG στις μήνιγγες του νωτιαίου μυελού, ή οποία συνοδεύεται και με μικρότερη (όχι στατιστικά σημαντική ωστόσο) παρουσία των κυττάρων αυτών στο παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού από τα ίδια ζώα. (Διάγραμμα 2)

Η σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων όσον αφορά στα κύτταρα των δεκτών (CD45.2+) έδειξε ότι οι ποντικοί που δέχτηκαν κύτταρα από PBS ποντικούς είχαν μικρότερους αριθμούς δικών τους κυττάρων στις μήνιγγες και στο παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού σε σχέση με τους ποντικούς που δέχτηκαν OM-MOG κύτταρα. Έτσι λοιπόν στους δύο αυτούς ιστούς των δεκτών οι ποντικοί που δέχτηκαν OM-MOG κύτταρα έχουν περισσότερα δικά τους και λιγότερα κύτταρα δοτών, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. (Διάγραμμα 3) Ωστόσο η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική.

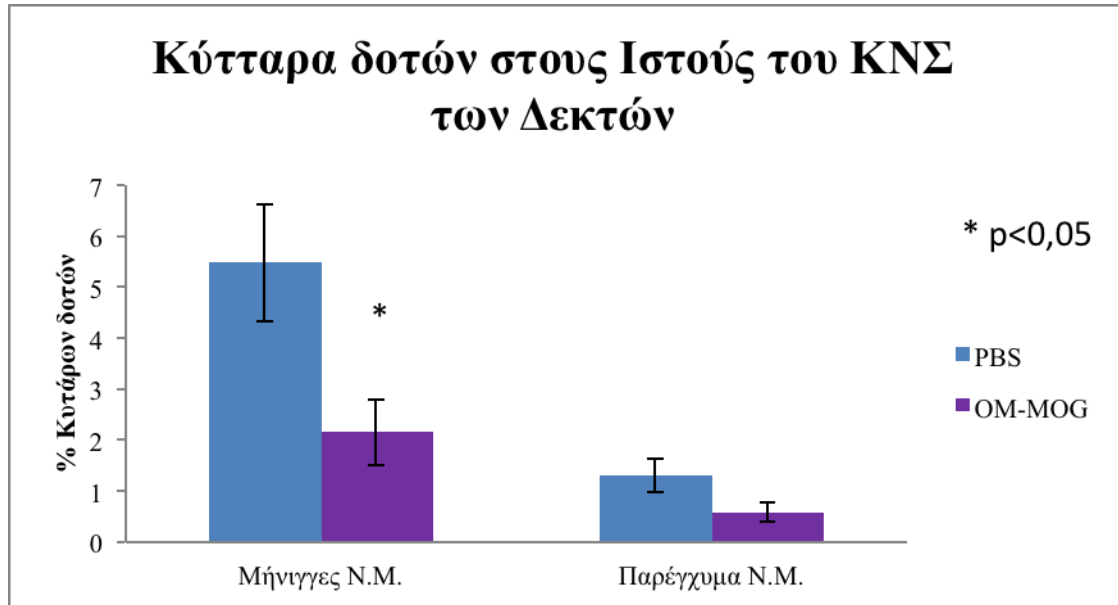
Τα αποτελέσματα αποτελούν μέσους όρους από ποντικούς με διαφορετική βαθμολογία παράλυσης μέσα σε κάθε πειραματική αλλά με παρόμοια βαθμολογία μεταξύ των δύο ομάδων (OM-MOG και PBS).

## Κύτταρα Δοτών στους Ιστούς των Δεκτών

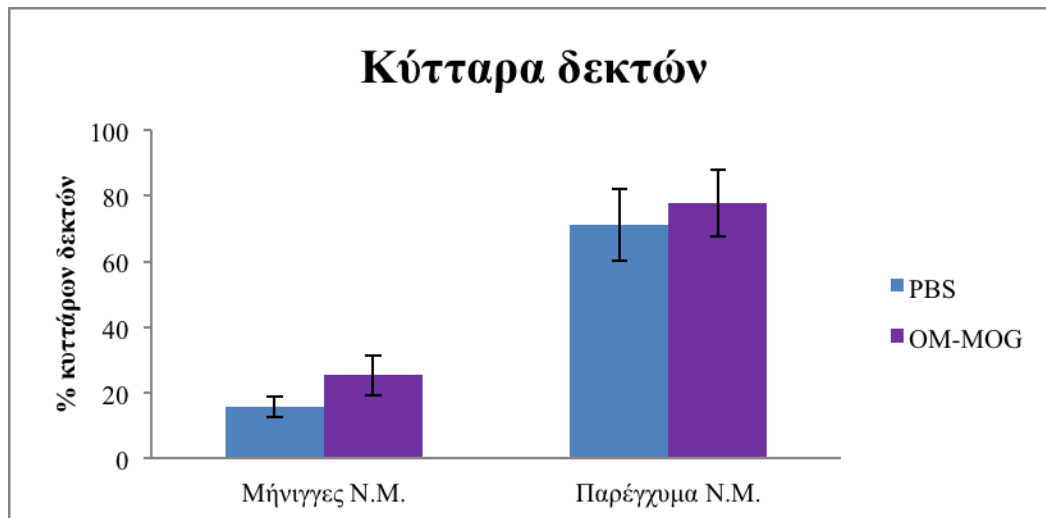


Διάγραμμα 1: Το OM-MOG καθυστερεί αλλά δεν μεταβάλλει τη μετανάστευση ενεργοποιημένων MOG-ειδικών T λεμφοκυττάρων προς τους ιστούς του ΚΝΣ. Οι στήλες απεικονίζουν τον μέσο όρο (Μ.Ο.) των ποσοστών των κυττάρων του δότη που ανιχνεύθηκαν με ανάλυση FACS που απομονώθηκαν από διαφορετικούς ιστούς του

δέκτη σύντομα μετά την έναρξη της ΠΑΕ. Τα ποντίκια-δότες της ομάδας ελέγχου και της πειραματικής ομάδας εμβολιάστηκαν διαδερμικά με PBS ή OM-MOG, αντίστοιχα, και οι μέσες τιμές τους απεικονίζονται με γαλάζιες ή μωβ στήλες, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 2: Το OM-MOG καθυστερεί αλλά δεν μεταβάλλει τη μετανάστευση ενεργοποιημένων MOG-ειδικών T λεμφοκυττάρων προς τους ιστούς του ΚΝΣ. Οι στήλες απεικονίζουν τον μέσο όρο (Μ.Ο.) των ποσοστών των κυττάρων του δότη που ανιχνεύθηκαν με ανάλυση FACS που απομονώθηκαν από μήνιγγες και παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού του δέκτη σύντομα μετά την έναρξη της ΠΑΕ. Τα ποντίκια-δότες της ομάδας ελέγχου και της πειραματικής ομάδας εμβολιάστηκαν διαδερμικά με PBS ή OM-MOG, αντίστοιχα, και οι μέσες τιμές τους απεικονίζονται με γαλάζιες ή μωβ στήλες, αντίστοιχα. Για κάθε μια από τις 2 ομάδες ποντικών, n=4.



Διάγραμμα 3: Το OM-MOG δεν μεταβάλλει αλλά καθυστερεί τη μετανάστευση ενεργοποιημένων MOG-ειδικών T λεμφοκυττάρων προς τους ιστούς του ΚΝΣ επιτρέποντας στα κύτταρα των δεκτών να φτάσουν πρώτα σε αυτούς τους ιστούς. Οι στήλες απεικονίζουν τον Μ.Ο. των ποσοστών των κυττάρων του δέκτη που ανιχνεύθηκαν με ανάλυση FACS που απομονώθηκαν από μήνιγγες και παρέγχυμα του νοτιαίου μυελού του σύντομα μετά την έναρξη της ΠΑΕ. Τα ποντίκια-δέκτες της ομάδας ελέγχου και της πειραματικής ομάδας δέχτηκαν κύτταρα από ποντικούς που είχαν εμβολιαστεί διαδερμικά με PBS ή OM-MOG, αντίστοιχα, και οι μέσες τιμές τους απεικονίζονται με γαλάζιες ή μωβ στήλες, αντίστοιχα. Για κάθε μια από τις 2 ομάδες ποντικών, n=4.

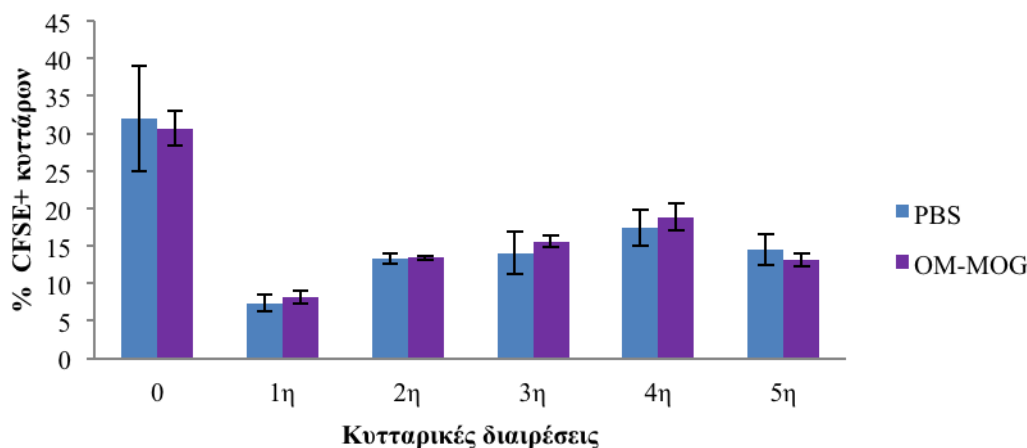
**Τα ενεργοποιημένα MOG-ειδικά T λεμφοκύτταρα δεν διατηρούν την μειωμένη ικανότητα αντιγόνο-ειδικού πολλαπλασιασμού όταν μεταφέρονται σε μη εμβολιασμένους δέκτες**

Για τη μελέτη του πολλαπλασιασμού των MOG ειδικών T λεμφοκυττάρων ποντικοί αγρίου τύπου C57BL/6, όπως επίσης 2D2 και congenic ποντικοί, οι οποίοι αποτελούσαν τους δότες, δέχθηκαν διαδερμικό εμβολιασμό OM-MOG ή PBS. Κατόπιν ανοσοποιήθηκαν με MOG<sub>35-55</sub>/CFA/PTx μαζί με τους ποντικούς δέκτες [congenic (CD45.1) για δότες C57BL/6 και 2D2 (CD45.2), C57BL/6 (CD45.2) για δότες congenic (CD54.1)]. Κατόπιν ακολούθησε η θυσία των δοτών, η ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων με MOG, η χρώση τους με CFSE και η μεταφορά τους στους δέκτες. Στο χρονικό διάστημα 13-25 ημερών μετά την ανοσοποίηση και ανεξάρτητα από την εκδήλωση ή όχι των κλινικών συμπτωμάτων στους δέκτες, έγινε η θυσία των δεκτών και η απομόνωση των σπληνοκυττάρων και των κυττάρων των λεμφαδένων τους. Ακολούθησε η ανάλυση στο FACS των CFSE+ κυττάρων τα οποία εμφανίζουν διαφορετικές εντάσεις φθορισμού που αντικατοπτρίζει τον αριθμό των διαιρέσεων που έχουν υποστεί καθώς η ένταση φθορισμού της χρωστικής μειώνεται στο μισό.

Η ανάλυση των CFSE+ κυττάρων από τις σπλήνες των δεκτών του πειράματος μεταφοράς ανοσοκυττάρων από CD45.1 congenic ποντικών σε CD45.2 ποντικούς αγρίου τύπου συνοψίζεται στο διάγραμμα 4. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζεται ο αριθμός των διαιρέσεων (1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup>, 3<sup>η</sup> κ.ο.κ.) που αντιστοιχούν σε διαφορετική ένταση του σήματος του φθορισμού της χρωστικής και στον κάθετο άξονα το ποσοστό των κυττάρων των δοτών σε κάθε μία από τις διαιρέσεις. Στην περίπτωση που θα υπήρχε μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού θα περίμενε κανείς να συναντήσει μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων στην πρώτη στήλη (διαίρεση 0) όπου αντιπροσωπεύει τα κύτταρα τα οποία δεν έχουν διαιρεθεί και μικρότερο αριθμό κυττάρων στις περαιτέρω διαιρέσεις. Ωστόσο, όπως φαίνεται στο διάγραμμα οι δύο ομάδες (OM-MOG και PBS) εμφανίζουν παρόμοια ποσοστά κυττάρων, τόσο στην πρώτη στήλη όσο και στις υπόλοιπες διαιρέσεις. Αυτό σημαίνει πως όταν τα κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε OM-MOG στους δότες μεταφέρονται στους δέκτες που δεν έχουν εμβολιαστεί παρουσιάζουν παρόμοια πολλαπλασιαστική ικανότητα με τα κύτταρα που δεν έχουν εκτεθεί σε OM-MOG.

Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στις σπλήνες και τους λεμφαδένες και από τα πειράματα με δότες C57BL/6 και 2D2 (CD45.2) και δέκτες congenic ποντικού (CD45.1). Ωστόσο λόγω απουσίας ή/και ανομοιογένειας των κλινικών συμπτωμάτων των δεκτών ανάμεσα στις δύο ομάδες, η ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτών δεν συμπεριλαμβάνεται στην παρούσα εργασία.

### Κύτταρα των δοτών στις σπλήνες των δεκτών



Διάγραμμα 4: Τα κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε OM-MOG παρουσιάζουν παρόμοια πολλαπλασιαστική ικανότητα με την ομάδα ελέγχου, όταν μεταφέρονται σε μη εμβολιασμένους δέκτες. Οι στήλες απεικονίζουν τον μέσο όρο (Μ.Ο.) των ποσοστών των κυττάρων του δότη απομονώθηκαν τις σπλήνες του δέκτη και αναλύθηκαν με FACS ως προς την ένταση του σήματος του CFSE σύντομα μετά την έναρξη της ΠΑΕ. Τα ποντίκια-δότες της ομάδας ελέγχου και της πειραματικής ομάδας



εμβολιάστηκαν διαδερμικά με PBS ή OM-MOG, αντίστοιχα, και οι μέσες τιμές τους απεικονίζονται με γαλάζιες ή μωβ στήλες, αντίστοιχα. Για κάθε μια από τις 2 ομάδες ποντικών,  $n=4$ .

#### Δείκτες πολλαπλασιαστικού δυναμικού των κυττάρων

Εκτός από τα ποσοστά των κυττάρων σε κάθε διαίρεση και τις συγκρίσεις μεταξύ τους ανάμεσα στις δύο ομάδες, υπάρχουν και άλλα χρήσιμα μεγέθη για τον υπολογισμό του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των κυττάρων με βάση τον πραγματικό αριθμό των κυττάρων. Τα μεγέθη αυτά είναι ο δείκτης διαίρεσης, ο δείκτης πολλαπλασιασμού και ο δείκτης επέκτασης όπως ορίζονται από το λογισμικό FlowJo.

**Δείκτης διαίρεσης (Division Index, DI):** Αποτελεί το μέσο αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων που έχει πραγματοποιήσει ένα κύτταρο στην αρχική καλλιέργεια. Είναι ένας μέσος όρος ακόμα και για τα κύτταρα που δεν προχώρησαν ποτέ σε διαίρεση (που ανήκουν δηλαδή στη στήλη 0 διαιρέσεων). Για αυτό το δείκτη χρειάζεται να υπολογιστεί όχι μόνο το μέγεθος του εναρκτήριου πληθυσμού, αλλά επίσης ο συνολικός αριθμός διαιρέσεων που έλαβαν χώρα από τη στιγμή της χρώσης μέχρι την ανάλυση FACS (βλέπε παρακάτω). Ο δείκτης διαίρεσης αποτελεί το πηλίκο του συνολικού αριθμού διαιρέσεων προς το μέγεθος του αρχικού πληθυσμού.

**Δείκτης πολλαπλασιασμού (Proliferation Index, PI):** Ο δείκτης πολλαπλασιασμού είναι το πηλίκο του συνολικού αριθμού των διαιρέσεων προς τον αριθμό των κυττάρων που προχώρησαν σε διαίρεση. Ο δείκτης αυτός λαμβάνει υπόψη του μόνον τα κύτταρα τα οποία πραγματοποίησαν τουλάχιστον μία διαίρεση, δίνοντας έτσι μία εικόνα για τα κύτταρα που ανταποκρίνονται σε αντίθεση με το δείκτη διαίρεσης που λαμβάνει υπόψη και τα κύτταρα που δεν έχουν διαιρεθεί.

**Δείκτης επέκτασης (Expansion Index, EI):** Ο δείκτης αυτός προσδιορίζει το πόσες φορές έχει διευρυνθεί ο αρχικός πληθυσμός των κυττάρων. Για παράδειγμα αν ο αρχικός αριθμός των κυττάρων είναι 1 εκατομμύριο και ο EI είναι 3, τότε ο τελικός αριθμός των κυττάρων αφού πολλαπλασιαστούν θα είναι 3 εκατομμύρια. Υπολογίζεται ως το πηλίκο του τελικού αριθμού κυττάρων προς το μέγεθος του αρχικού πληθυσμού.

Για τον υπολογισμό των παραπάνω μεγεθών προϋπόθεση είναι να υπολογισθούν ο αριθμός των κυττάρων στον αρχικό πληθυσμό, ο συνολικός αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων, ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που προχώρησαν σε διαίρεση και ο αριθμός των κυττάρων στον τελικό πληθυσμό.

Ο αριθμός των κυττάρων στον αρχικό πληθυσμό υπολογίζεται διαιρώντας τον αριθμό κυττάρων της 0ης, 1ης, 2ης, ..., νιοστής διαίρεσης με τον παράγοντα  $2^0, 2^1, \dots, 2^v$ , αντίστοιχα, και αθροίζοντας τα πηλικά που προκύπτουν.

Ο αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων υπολογίζεται ως εξής: αν  $v$  είναι ο αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων, τότε διαιρούμε τον αριθμό κυττάρων της 1ης, 2ης, ...,

νιοστής διαίρεσης με  $2^1, \dots, 2^n$ , αντίστοιχα, και πολλαπλασιάζουμε καθένα από τα προκύπτοντα πηλίκα με τον παράγοντα  $1, 2, \dots, n$ . Τέλος, αθροίζουμε όλα τα προκύπτοντα γινόμενα.

Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που προχώρησαν σε διαίρεση υπολογίζεται αφαιρώντας από τον αριθμό των κυττάρων στον αρχικό πληθυσμό τον αριθμό των κυττάρων που δεν έχουν διαιρεθεί, δηλαδή της 0ης διαίρεσης.

Ο τελικός αριθμός των κυττάρων αποτελεί το άθροισμα των κυττάρων από κάθε κυτταρική διαίρεση.

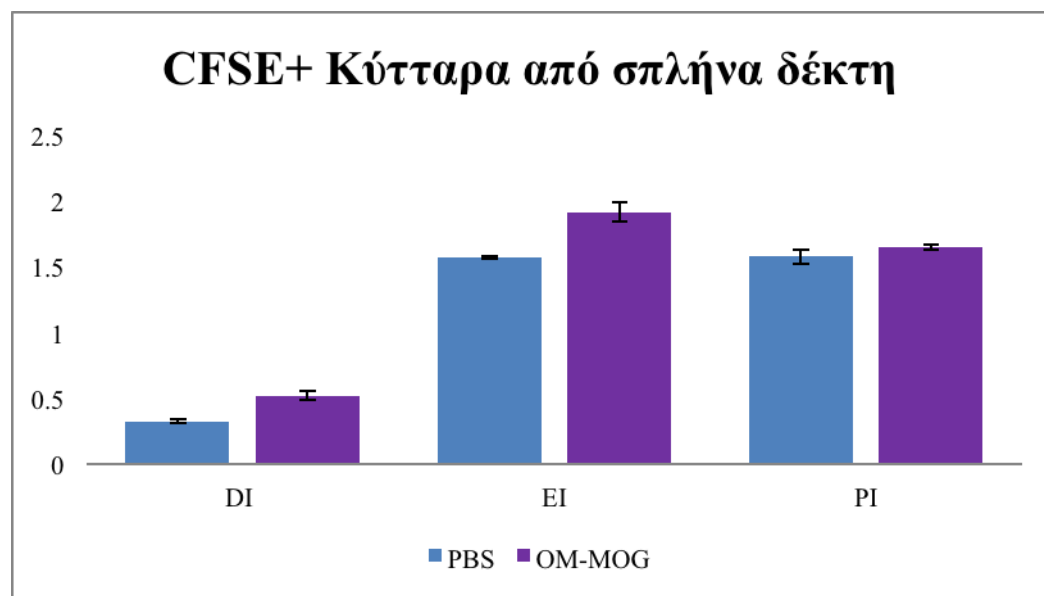
Συνοψίζονται λοιπόν:

DI= συνολικός αριθμός διαιρέσεων/ αριθμός κυττάρων στον αρχικό πληθυσμό

PI= συνολικός αριθμός διαιρέσεων/ αριθμός κυττάρων που προχώρησαν σε διαίρεση

EI= αριθμός κυττάρων στον τελικό πληθυσμό/ αριθμός κυττάρων στον αρχικό πληθυσμό

Παρακάτω στο διάγραμμα απεικονίζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα όπου έχουν υπολογιστεί οι παραπάνω δείκτες. Όπως ήταν επόμενο δεν παρατηρήθηκε διαφορά ούτε σε αυτούς τους δείκτες, ανάμεσα στην πειραματική και στην ομάδα ελέγχου, εφόσον δεν είχαν παρατηρηθεί ούτε διαφορές στα ποσοστά των κυττάρων στις κυτταρικές διαιρέσεις.



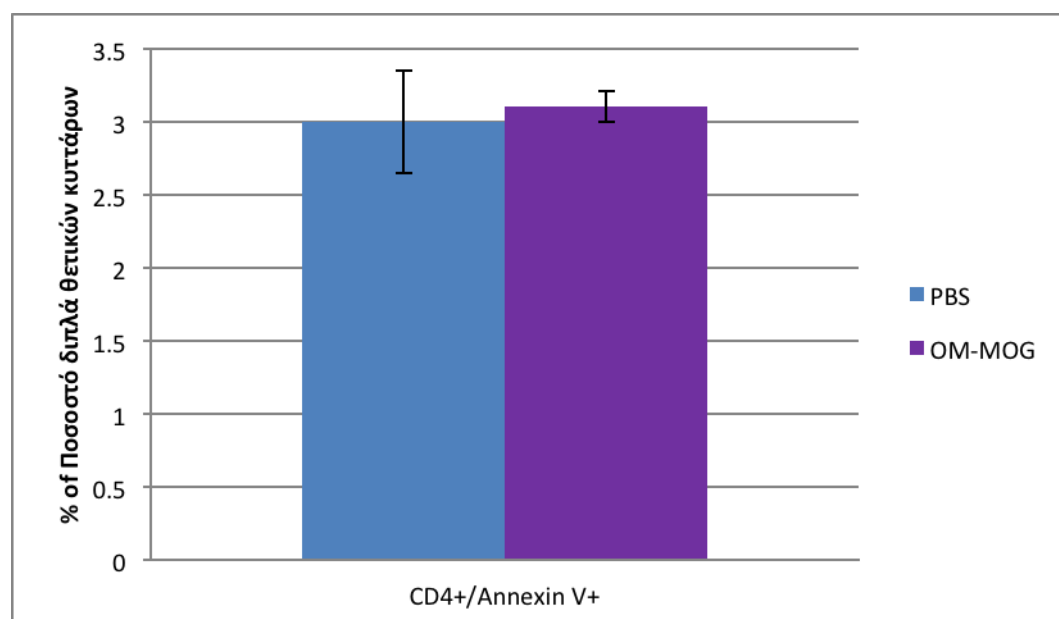
Διάγραμμα 5: Τα κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε OM-MOG παρουσιάζουν παρόμοια πολλαπλασιαστική ικανότητα με την ομάδα ελέγχου, όταν μεταφέρονται σε μη εμβολιασμένους δέκτες. Απεικονίζεται ο Δείκτης Διαίρεσης (DI), Επέκτασης (EI) και Πολλαπλασιασμού (PI) εκτεθειμένων σε OM-MOG (ή PBS), σημασμένων με CFSE, MOG-ειδικών  $2D2$   $CD45.2^+$  κυττάρων που μεταφέρθηκαν σε  $CD45.1^+$  ποντικούς δέκτες την 10η ημέρα μετά την ανοσοποίηση με  $MOG_{35-55}/CFA/Ptx$ . Για κάθε μία

από τις δύο ομάδες ποντικών  $n=2$ . Σε συνδυασμό με τα προηγούμενα αποτελέσματα δείχνουν ότι το OM-MOG επάγει μία μορφή ανοχής των T λεμφοκυττάρων η οποία μπορεί να αντιστραφεί στο φλεγμονώδες περιβάλλον της ΠΑΕ των μη εμβολιασμένων δεκτών.

### Το OM-MOG δεν καθιστά τα MOG- ειδικά κύτταρα επιρρεπή σε απόπτωση

Προκειμένου να μελετηθεί αν το OM-MOG επάγει ανοχή και μέσω της αύξησης της απόπτωσης στα ενεργοποιημένα αντιγόνο-ειδικά T λεμφοκύτταρα, απομονώθηκαν σπληνοκύτταρα από ποντικούς εμβολιασμένους με OM-MOG και ανοσοποιημένους με MOG, τα οποία υποβλήθηκαν σε δοκιμασία θανάτου μέσω ενεργοποίησης (AICD) *in vitro*. Ποντικοί C57BL/6 εμβολιάστηκαν με OM-MOG ή PBS (ομάδα ελέγχου). Δεκαπέντε ημέρες μετά τον τελευταίο εμβολιασμό έγινε ανοσοποίηση με MOG35-55. Μετά από διάστημα 14 ημερών οι ποντικοί θυσιάστηκαν και έγινε απομόνωση των σπληνοκυττάρων τους και σε αυτά προστέθηκαν PMA και Ionomycin που ενεργοποιούν τα T λεμφοκύτταρα. Μετά από 24 ώρες έγινε χρώση τους με αντισώματα έναντι της Αννεξίνης A5, που αποτελεί δείκτη της απόπτωσης των κυττάρων και έναντι του  $CD4^+$  που αποτελεί τον επιφανειακό δείκτη των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων. Ακολούθησε ανάλυση στο FACS των κυττάρων που ήταν θετικά και για τους δύο δείκτες.

Η ανάλυση Annexin  $V^+$ / $CD4^+$  κυττάρων συνοψίζεται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 6). Οι στήλες αντιστοιχούν στο ποσοστό των κυττάρων που ήταν θετικά και για τους δύο δείκτες. Όπως φαίνεται οι δύο ομάδες έχουν παρόμοιο ποσοστό Annexin  $V^+$ / $CD4^+$  κυττάρων γεγονός που υποδεικνύει ότι το OM-MOG δεν καθιστά τα MOG-ειδικά T λεμφοκύτταρα ευπαθή σε απόπτωση. Τα αποτελέσματα αποτελούν μέσους όρους των ποσοστών και για κάθε μία από τις 2 ομάδες  $n=4$ . Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως το OM-MOG δεν επάγει ανοχή αυξάνοντας την απόπτωση των ενεργοποιημένων αντιγόνο-ειδικών T λεμφοκυττάρων.



Διάγραμμα 6: Το OM-MOG δεν καθιστά τα MOG –ειδικά T λεμφοκύτταρα επιρρεπή σε απόπτωση. Ποντικοί αγρίου τύπου (C57BL/6) εμβολιάστηκαν με OM-MOG ή PBS και ανοσοποιήθηκαν με MOG<sub>35-55</sub>/CFA. Κατόπιν έγινε απομόνωση των σπληνοκυττάρων τους, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία θανάτου μέσω ενεργοποίησης (AICD) και η ανάλυση στο FACS για τα Annexin V<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> κύτταρα. Οι στήλες απεικονίζουν τους μέσους όρους των ποσοστών των κυττάρων που εκτέθηκαν σε PBS (γαλάζια) ή OM-MOG (μωβ) και για κάθε ομάδα n=4.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο της εισαγωγής, η ερευνητική μας ομάδα σε πρόσφατη εργασία της έδειξε ότι τα πεπτίδια συζευγμένα με οξειδωμένη μαννάνη (OM) προστατεύουν από την ΠΑΕ όταν χορηγούνται θεραπευτικά και ανακουφίζουν από τα συμπτώματα της όταν χορηγούνται ως θεραπεία. Στη συγκεκριμένη εργασία δείχθηκε πως το OM-MOG επάγει ισχυρή πεπτιδο-ειδική ανοχή των T λεμφοκυττάρων, ακόμα και όταν χρησιμοποιούνται ισχυρά ανοσοενισχυτικά, όπως η τοξίνη Pertussis για την επαγωγή της ΠΑΕ. Η σύζευξη με τη μαννάνη αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο στόχευσης των πεπτιδίων μυελίνης στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και δείχθηκε πως η πρόσδεση της στο MOG35-55 τόσο και στην PLP139-151 προστατεύει τους ποντικούς από την επαγωγή της χρόνιας ΠΑΕ που επάγεται με MOG/CFA/Ptx σε ποντικούς C57BL/6 και της υποτροπιάζουσας -διαλείπουσας ΠΑΕ που επάγεται με PLP/CFA σε ποντικούς SJL/J αντίστοιχα. (Tseveleki et al. 2015)

Η προστασία από το OM-MOG σχετίζεται με μειωμένη ικανότητα αντιγόνο-ειδικού πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων, όπως αυτή μελετήθηκε σε σπληνοκύτταρα από εμβολιασμένους ποντικούς 25 μέρες μετά την ανοσοποίηση τους με MOG/CFA/PTx, με τη μέθοδο ενσωμάτωσης της <sup>3</sup>H θυμιδίνης (Thymidine Incorporation Assay) και εκφράστηκε ως δείκτης ενεργοποίησης (Stimulation Index, SI). Η ίδια μειωμένη απόκριση, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, παρατηρήθηκε και σε κύτταρα λεμφοκυττάρων που απομονώθηκαν από εμβολιασμένους ποντικούς 10 ημέρες μετά την ανοσοποίηση τους. (Tseveleki et al. 2015) Η μέθοδος αυτή είναι η πιο κοινή μέθοδος μέτρησης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, καθώς εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι η ραδιενεργός θυμιδίνη που προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας θα ενσωματωθεί στις νέες αλυσίδες του χρωμοσωμικού DNA, όταν το κύτταρο πραγματοποιεί μιτωτική διαίρεση.

Υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί επαγωγής περιφερειακής ανοχής όπως η κλωνική απαλοιφή των T λεμφοκυττάρων, η επαγωγή των T ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs), η εκτροπή των ανοσιακών αποκρίσεων προς ένα ανοσορυθμιστικό προφίλ και η ανέργια των T λεμφοκυττάρων. (Tisch 2010) Η ανέργια αποτελεί έναν μηχανισμό λειτουργικής απενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων μετά από αναγνώριση του αντιγόνου σε συνθήκες που υπάρχει απουσία του σήματος από το συνδιεγερτικό μόριο CD28. Υπό αυτές τις συνθήκες τα T λεμφοκύτταρα αποτυγχάνουν να ενεργοποιηθούν πλήρως και μπαίνουν σε μία κατάσταση υπολειτουργίας και δεν ανταποκρίνονται σε επαναδιέγερση από το αντιγόνο. (Valdor, Macian 2013) Η σηματοδότηση από το CD28 οδηγεί στην παραγωγή της κυτταροκίνης Ιντερλευκίνης-2 (IL-2) και του υποδοχέα της από τα T λεμφοκύτταρα. Η παραγωγή των μορίων αυτών είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αυτοκρινή τους

σηματοδότηση που καταλήγει στον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων. Τα ανεργικά T λεμφοκύτταρα αποτυγχάνουν να πολλαπλασιαστούν μετά από επαναδιέγερση από το αντιγόνο, λόγω της μειωμένης ικανότητας παραγωγής της IL-2. (Colombetti, Benigni et al. 2002) Ο ανεργικός φαινότυπος είναι αντιστρέψιμος εάν γίνει διέγερση των T λεμφοκυττάρων με εξωγενή προσθήκη IL-2. (Boussiotis, Barber et al. 1994) Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα δεδομένα του εργαστηρίου μας καθώς η τοποθέτηση δενδριτικών κυττάρων στα οποία έχει φορτωθεί το OM-MOG και T λεμφοκυττάρων στην ίδια καλλιέργεια, απουσία της IL-2 οδηγεί σε μειωμένες αποκρίσεις πολλαπλασιασμού από τα T λεμφοκύτταρα. Όταν χορηγήθηκε εξωγενώς IL-2 ο πολλαπλασιασμός έφτασε τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου. (Tseveleki et al. 2015)

Η μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων δεν συνοδεύεται από τροποποιημένη διαφοροποίηση τους σε υποπληθυσμούς Th1 και Th17 και η παραγωγή των κυτταροκινών από αυτούς τους πληθυσμούς δεν παρουσίαζε διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Παράλληλα δεν παρατηρήθηκε η επαγωγή των Tregs ή εκτροπή των ανοσοσυστημικών αποκρίσεων προς ένα ανοσορρυθμιστικό προφίλ (Th1 προς Th2 μετατροπή). (Tseveleki et al. 2015) Μη δημοσιευμένα δεδομένα έχουν δείξει πως T λεμφοκύτταρα που έχουν εκτεθεί σε OM-MOG παρουσιάζουν μειωμένη παραγωγή της IL-2 και του υποδοχέα της (IL-Ra ή CD25). Το γεγονός ότι ο μειωμένος πολλαπλασιασμός δεν συνδέεται με αλλαγές στην παραγωγή κυτταροκινών υποδεικνύει πως η αντιγονοπαρουσίαση του OM-MOG από τα ΑΠΚ συμβαίνει με διαφορετική σηματοδότηση μέσω του TCR στα MOG –ειδικά T λεμφοκύτταρα σε σχέση με του MOG και καταλήγει στην λειτουργική ανέργια τους. (Tseveleki et al. 2015)

Στην παρούσα εργασία σκοπός ήταν η επιβεβαίωση του ευρήματος μειωμένου πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων που έχουν εκτεθεί σε OM-MOG *in vivo* και να μελετήσουμε αν αυτό επηρεάζει τη μετανάστευση τους και την διήθηση τους στο ΚΝΣ. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν χιμαιρικοί ποντικοί μέσω μεταφοράς των κυττάρων αυτών που είχαν σημανθεί με το φθορίζον CFSE σε ποντικούς που δεν είχαν εμβολιαστεί. Αυτό επέτρεπε τη μελέτη των αποκρίσεων των T ανεργικών λεμφοκυττάρων σε ένα περιβάλλον με ενεργό ΠΑΕ, όπως αυτό των ποντικών δεκτών. Υπενθυμίζεται πως οι ποντικοί που έχουν εμβολιαστεί δεν εκδηλώνουν τα κλινικά συμπτώματα της ΠΑΕ και έτσι απαραίτητο ήταν οι δέκτες των κυττάρων να μην έχουν εμβολιαστεί. Για τη δημιουργία χιμαιρικών ποντικών χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη ποντικών με διαφορετικό αλληλόμορφο του κοινού λευκοκυτταρικού αντιγόνου CD45: οι CD45.1 congenic ποντικοί και οι CD45.2 ποντικοί είτε αγρίου τύπου (C57BL/6) είτε διαγονιδιακοί με MOG-ειδικό TCR. Αυτά τα δύο αλληλόμορφα είναι λειτουργικά πανομοιότυπα και το σύστημα του χιμαιρικού ποντικού επιτρέπει τον εντοπισμό λευκοκυττάρων που προέρχονται από άλλο άτομο με FACS με τη χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων έναντι αυτών.

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων που είχαν εκτεθεί σε OM-MOG, όπως αυτός μετρήθηκε από την ένταση του CFSE με FACS δεν παρουσίασε διαφορές σε σχέση

με την ομάδα ελέγχου, όπως θα περιμέναμε. Φαίνεται λοιπόν πως η μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών δεν διατηρείται όταν αυτά μεταφέρονται στους δέκτες με την ενεργό ΠΑΕ. Αντιθέτως αναστρέφεται και τα κύτταρα αυτά φαίνονται να έχουν παρόμοια πολλαπλασιαστική ικανότητα σε σχέση με τα κύτταρα που προέρχονταν από δότες εμβολιασμένους με PBS, καθώς τα ποσοστά των κυττάρων σε κάθε ένταση φθορισμού ήταν παρόμοια για τις δύο ομάδες. Αυτό υποδηλώνει πως η επίδραση του OM-MOG στα T λεμφοκύτταρα είναι αναστρέψιμη όταν αυτά μεταφέρονται στο περιβάλλον των δεκτών. Το διαφορετικό σε σχέση με τα προηγούμενα ευρήματα του εργαστηρίου είναι ότι οι ποντικοί δέκτες δεν έχουν εκτεθεί ποτέ σε OM-MOG και πιθανόν είναι αυτό που χρειάζεται για να εκδηλώσουν τα κύτταρα το φαινότυπο του μειωμένου πολλαπλασιασμού. Στα προηγούμενα ευρήματα είχε γίνει προφυλακτικός εμβολιασμός σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στο 2<sup>ο</sup> κεφάλαιο και ακολούθησε η μελέτη του πολλαπλασιασμού *in vitro*. Επίσης είχε δείχτει πως τα MOG- ειδικά κύτταρα από μη εμβολιασμένους δότες σε εμβολιασμένους δέκτες δεν αποκτούν τον ανεργικό φαινότυπο. Τα δεδομένα αυτά μαζί με τα παρόντα δεδομένα δείχνουν πως η αντιγονοπαρουσίαση του OM-MOG στα T λεμφοκύτταρα είναι απαραίτητη για την μακροχρόνια επαγωγή μείωσης του αντιγόνο-ειδικού πολλαπλασιασμού τους και της διατήρησης αυτής και ότι η επαγωγή της ανοχής ή η μεταφορά αυτής δεν είναι εφικτή απουσία του OM-MOG. (Tseveleki et al. 2015) Πιθανόν η απουσία αντιγονοπαρουσίασης του OM-MOG από τα ΑΠΚ του δέκτη να είναι αυτή που ευθύνεται για την μη εκδήλωση της μειωμένης ικανότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε OM-MOG, που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία. Προηγούμενα δεδομένα του εργαστηρίου που έδειξαν πως δενδριτικά κύτταρα τα οποία έχουν φορτωθεί με OM-MOG *in vitro* και συνεπώς το παρουσιάζουν στα T λεμφοκύτταρα, είναι δυνατόν να μεταφέρουν την ανοχή σε ανοσοποιημένους ποντικούς με ενεργό ΠΑΕ και να μειώνουν τις αποκρίσεις πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων, υποστηρίζουν ότι η αντιγονοπαρουσίαση του OM-MOG είναι απαραίτητη για την επαγωγή του ανεργικού φαινοτύπου των T λεμφοκυττάρων και της περιφερειακής ανοχής. Επομένως είναι απαραίτητη η χορήγηση του OM-MOG είτε διαδερμικά είτε μέσω των δενδριτικών κυττάρων για την εκδήλωση του ανεργικού φαινοτύπου των T λεμφοκυττάρων. (Tseveleki et al. 2015)

Η μειωμένη απόκριση πολλαπλασιασμού είναι ένα χαρακτηριστικό που μπορεί να αναστραφεί σε ένα περιβάλλον το οποίο δεν έχει εκτεθεί ποτέ σε OM-MOG. Πράγματι η εξωγενής προσθήκη IL-2 στην καλλιέργεια των κυττάρων αυτών, επαναφέρει τη μειωμένη πολλαπλασιαστική τους ικανότητα στα φυσιολογικά επίπεδα. (Tseveleki et al. 2015) Όταν απουσιάζει το αντιγόνο που επάγει την ανέργεια των T λεμφοκυττάρων, αυτά επανακτούν το φυσιολογικό τους φαινότυπο σε χρονικό διάστημα λίγων εβδομάδων. (Chan, Stark et al. 2005) Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκαν παρόμοια επίπεδα πολλαπλασιασμού μεταξύ ανεργικών και μη ανεργικών T λεμφοκυττάρων επιβεβαιώνοντας ότι ο ανεργικός φαινότυπος είναι αντιστρέψιμος, κατά την απουσία του OM-MOG.

Εκτός από τη μειωμένη απόκριση πολλαπλασιασμού, προηγούμενα δεδομένα έδειξαν πως υπάρχει μειωμένη διήθηση του παρεγχύματος του ΚΝΣ από CD3<sup>+</sup> κύτταρα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Σύμφωνα με τη θεωρία ότι το OM-MOG δρα μειώνοντας την ικανότητα των MOG-ειδικών T λεμφοκυττάρων να επανενεργοποιούνται από τα ενδογενή αντιγόνα, είναι και το εύρημα ότι υπάρχει συγκέντρωση των CD3<sup>+</sup> κυττάρων στις μήνιγγες και στον περιαγγειακό χώρο αλλά μειωμένη διήθηση τους στο παρέγχυμα του ΚΝΣ μετά από επαγωγή ενεργού ΠΑΕ. Οι ιστοπαθολογικές μελέτες έδειξαν πως στο παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού χημικών ποντικών εμβολισμένων με OM-MOG που δεν εμφάνισαν κλινικά συμπτώματα οι απομυελινωτικές βλάβες ήταν πολύ περιορισμένες σε σχέση με αυτές της ομάδας ελέγχου και CD3<sup>+</sup> κύτταρα βρέθηκαν μόνο στις περιοχές γύρω από αυτές και στις λεπτομήνιγγες. Ο αριθμός των ανοσοκυττάρων στο παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού εμβολιασμένων ποντικών με ενεργό ΠΑΕ χωρίς συμπτώματα ήταν τόσο περιορισμένος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, που δεν ήταν εφικτή η απομόνωση τους με τη διαδικασία που περιγράφηκε στο 2<sup>ο</sup> κεφάλαιο και η ανάλυση τους με FACS. Στους PBS ποντικούς βρέθηκε πως μερικά CD3<sup>+</sup> του παρεγχύματος κοντά στις βλάβες ήταν θετικά για τον δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67. Τα παθογενετικά κύτταρα που μεταναστεύουν προς τους ιστούς του ΚΝΣ συναντούν το αντιγόνο που παρουσιάζεται από τα ΑΠΚ στις μήνιγγες και στον περιαγγειακό χώρο, πολλαπλασιάζονται και αποκτούν την ικανότητα να περάσουν τον φραγμό των αστροκυττάρων και εισβάλουν στο παρέγχυμα. (Lodygin, Odoardi et al. 2013; Mues, Bartholomaeus et al. 2013) Στους OM-MOG ποντικούς ωστόσο δεν βρέθηκαν θετικά κύτταρα για το Ki67 στο παρέγχυμα αλλά μόνο ελάχιστα στις μήνιγγες υποδηλώνοντας έτσι πως τα κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε OM-MOG εμφανίζουν αδυναμία να γίνουν πλήρως παθογενετικά. (Tseveleki et al. 2015)

Οι ποντικοί που έχουν υποστεί προφυλακτικό πρωτόκολλο εμβολιασμού με OM-MOG δεν εκδηλώνουν τα κλινικά συμπτώματα της ΠΑΕ και είναι επόμενο τα ανοσοκύτταρα τους να μην μπορούν να εντοπιστούν στους ιστούς του ΚΝΣ. Προκειμένου όμως να μελετήσουμε τη μεταναστευτική δραστηριότητα των κυττάρων αυτών σε ποντικούς με ενεργό ΠΑΕ που εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα κάναμε το πείραμα μεταφοράς κυττάρων από εμβολιασμένους δότες και ανοσοποιημένους (με MOG/CFA) σε μη εμβολιασμένους αλλά ανοσοποιημένους (με MOG/CFA/PTx) δέκτες. Έτσι είναι δυνατή η μελέτη των κυττάρων των δοτών και των δεκτών μέσα στους ιστούς του ΚΝΣ των δεκτών και η αξιολόγηση του κατά πόσον τα κύτταρα των δοτών αναγνωρίζουν τον στόχο τους και μεταναστεύουν προς αυτόν. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως πράγματι τα κύτταρα των δοτών αναγνωρίζουν το στόχο τους καθώς εντοπίζονται τόσο στις μήνιγγες όσο και στο παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού των δεκτών. Πιθανόν η αντιγονοπαρουσίαση του OM-MOG στις μήνιγγες και στον περιαγγειακό χώρο είναι αυτή που παίζει ρόλο στην αδυναμία των T λεμφοκυττάρων που βρίσκονται να εκδηλώσουν επαρκείς αποκρίσεις πολλαπλασιασμού και να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό επιτυχώς και να επάξουν τη δημιουργία απομυελινωτικών βλαβών στους ποντικούς που έχουν εμβολιαστεί με OM-MOG. Η απουσία του OM-MOG όμως από τους ποντικούς



δέκτες στην παρούσα εργασία είναι αυτή που επιτρέπει στα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν και να εισβάλουν στο παρέγχυμα.

Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί πως τόσο στις μήνιγγες όσο και στο παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού οι αριθμοί των κυττάρων που προέρχονται από OM-MOG ποντικούς ήταν πολύ λιγότεροι σε σχέση με αυτούς που προέρχονται από PBS ποντικούς. Αυτό υποδηλώνει πως τα κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε OM-MOG πιθανόν να παρουσιάζουν μία καθυστέρηση στο να φτάσουν στους ιστούς στόχους. Αξίζει μάλιστα να σημειωθεί πως η διαφορά μεταξύ OM-MOG κυττάρων και PBS κυττάρων αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική. Το γεγονός ότι στους ιστούς από τους ίδιους ποντικούς τα OM-MOG κύτταρα είναι λιγότερα τόσο στις μήνιγγες που αποτελούν το χώρο στον οποίον καταφθάνουν τα κύτταρα για να επανενεργοποιηθούν και να εισβάλουν στο παρέγχυμα, αλλά και στο παρέγχυμα που αποτελεί τον τελικό σταθμό των κυττάρων δείχνει πως αυτά δεν είχαν φτάσει στο στόχο τους όσο γρήγορα είχαν φτάσει τα PBS κύτταρα, τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή της θυσίας. Στους δέκτες που χορηγήθηκαν κύτταρα από OM-MOG ποντικούς παρατηρήθηκαν επίσης μεγαλύτεροι αριθμοί δικών τους κυττάρων στις μήνιγγες και στο παρέγχυμα σε σχέση με αυτούς που δέχτηκαν κύτταρα από PBS ποντικούς. Αυτό δείχνει πως η πιθανή καθυστέρηση των OM-MOG κυττάρων των δοτών να φτάσουν στους ιστούς στόχους άφησε το περιθώριο στα κύτταρα των δεκτών να φτάσουν πρώτα και γι' αυτό να εμφανίζουν μεγαλύτερους αριθμούς σε σχέση με τους δέκτες που έλαβαν PBS κύτταρα. Ωστόσο τα συγκεκριμένα δεδομένα προέρχονται από ένα μόνο πείραμα μεταφοράς όπου ικανός αριθμός ποντικών εκδήλωσαν κλινικά συμπτώματα, επομένως χρειάζονται επιπλέον πειράματα για να επιβεβαιωθεί το εύρημα αυτό.

Η μειωμένη παρουσία των OM-MOG κυττάρων στους ιστούς των δεκτών σε σχέση με τα PBS κύτταρα μας κίνησε το ενδιαφέρον να μελετήσουμε εάν αυτά τα κύτταρα είναι επιρρεπή σε απόπτωση, καθώς αυτό θα εξηγούσε τους μειωμένους αριθμούς τους. Η επαγωγή θανάτου μέσω ενεργοποίησης αποτελεί έναν μηχανισμό περιφερειακής αντιγόνο-ειδικής ανοχής σε συνδυασμό με άλλους μηχανισμούς όπως η ανέργια των T λεμφοκυττάρων και να οδηγήσει στην απαλοιφή ενός κλώνου T λεμφοκυττάρων. (Arnold, Schönrich et al. 1993; D'Adamio, Awad et al. 1993; Kabelitz, Pohl et al. 1993) Η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων μέσω του TCR τους από αντιγόνα ή από μιτογόνες λεκτίνες μπορεί να οδηγήσει στον πολλαπλασιασμό τους και την παραγωγή κυτταροκινών ή να επάξει τη διαδικασία της απόπτωσης. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι μία ενεργός διαδικασία που μεσολαβείται από κυτταρική σηματοδότηση. (Kabelitz, Pohl et al. 1993) Ο συνδυασμός των PMA/Ionomycin ενεργοποιεί την PKC η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί παράγοντες όπως ο NF κB και ο NFAT1. Ο τελευταίος ενεργοποιεί γονίδια όπως ο Fas ligand (FasL) που η πρόσδεση του στον Fas ενεργοποιεί το μονοπάτι της απόπτωσης στο κύτταρο. (Han, Tie et al. 2013)

Μετά το τέλος της δοκιμασίας θανάτου μέσω ενεργοποίησης τα αποτελέσματα μας έδειξαν πως τα CD4+ λεμφοκύτταρα που έχουν εκτεθεί σε OM-MOG παρουσιάζουν

παρόμοια ποσοστά θανάτου, όπως αυτά μετρήθηκαν με τον δείκτη απόπτωσης Annexin V με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου. Η μετατόπιση της αννεξίνης στην επιφάνεια των CD4<sup>+</sup> αποτελεί ένα πρώιμο γεγονός του κυτταρικού θανάτου που προκύπτει μετά από ενεργοποίηση. (Tseveleki et al. 2015) Τα παρόμοια ποσοστά αυτού του δείκτη στα CD4<sup>+</sup> κύτταρα μεταξύ των δύο ομάδων δείχνουν ότι το OM-MOG δεν δρα καθιστώντας τα κύτταρα πιο επιρρεπή στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο λόγω ενεργοποίησης. Σε προηγούμενα ευρήματα του εργαστηρίου μας είχε δειχθεί πως σε καλλιέργειες δενδριτικών κυττάρων φορτωμένων με OM-MOG (ή MOG) και T λεμφοκυττάρων δεν είχε βρεθεί αυξημένο ποσοστό του δείκτη Annexin V στα CD4<sup>+</sup> κύτταρα σε σχέση με τα δενδριτικά κύτταρα φορτωμένα με PBS (ή OM) όταν αυτός μετρήθηκε σε ορισμένες χρονικές στιγμές μέσα στην καλλιέργεια. (Tseveleki et al. 2015) Επομένως επιβεβαιώνεται ότι το OM-MOG δεν αυξάνει την απόπτωση των MOG- ειδικών T λεμφοκυττάρων.

Μέχρι πρόσφατα επικρατούσε η αντίληψη ότι η ανέργια των T λεμφοκυττάρων ήταν λειτουργικά συνώνυμο με το τελευταίο στάδιο στο οποίο βρίσκεται το κύτταρο πριν προχωρήσει στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η μελέτη των ανεργικών κυττάρων *in vitro* έδειξε πως πράγματι υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των δύο φαινομένων (της ανέργιας και της απόπτωσης) αλλά αποτελούν δύο διακριτές διαδικασίες αποτέλεσμα της μερικής ενεργοποίησης του T λεμφοκυττάρου. (Lechler, Chai et al. 2001) Έχει δειχθεί πως μετά από αντιγονοπαρουσίαση οι κλώνοι T λεμφοκυττάρων που παραμένουν ζωντανοί αλλά χωρίς αποκρίσεις (ανεργικοί) είναι διαφορετικοί από αυτούς που προχωρούν σε απόπτωση. (Hargreaves, Borthwick et al. 1997) Επίσης ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων με ακινητοποιημένο αντίσωμα anti-CD3, απουσία ΑΠΚ οδηγεί σε αποπτωτικό θάνατο του 40% των κυττάρων, ενώ τα εναπομείναντα T λεμφοκύτταρα εμφανίζουν ανεργικό φαινότυπο και αποκρίνονται ισχυρά στην εξωγενή χορήγηση IL-2. (Chai, Lechler 1997) Δεν αποτελεί λοιπόν έκπληξη το αποτέλεσμα ότι τα ανεργικά T λεμφοκύτταρα δεν εκδηλώνουν αυξημένη τάση για προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Η μελέτη της μετανάστευσης των T λεμφοκυττάρων στους ιστούς του ΚΝΣ είναι εφικτή όταν οι ποντικοί εκδηλώνουν τα κλινικά συμπτώματα της ΠΑΕ. Στο πείραμα μεταφοράς κυττάρων από 2D2 (CD45.2) δότες σε congenic (CD45.1) δέκτες παρατηρήθηκε αδυναμία των δεκτών να εκδηλώσουν τα κλινικά συμπτώματα που αναμέναμε. Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και στο πείραμα μεταφοράς από C57BL/6 (CD45.2) δότες σε congenic (CD45.1) δέκτες όπου μικρός αριθμός ατόμων εκδήλωσε κλινικά συμπτώματα από την ομάδα ελέγχου και κανένα άτομο από την πειραματική ομάδα. Είναι σύνηθες η επαγωγή της ΠΑΕ να μην είναι 100% επιτυχής και κάποια άτομα να μην εκδηλώνουν ποτέ κλινικά συμπτώματα. (Bittner, Afzali et al. 2014) Στο παρόν πρωτόκολλο η επαγωγή πιθανόν επηρεάζεται από τη μεταφορά κυττάρων άλλον οργανισμό. Ένα τρόπος να ξεπεραστεί αυτή η δυσκολία θα ήταν να χρησιμοποιηθεί ένα ισχυρότερο πρωτόκολλο επαγωγής της ΠΑΕ (μεγαλύτερη δόση του πεπτιδίου MOG ή ανοσοενισχυτικών) ή να δοθεί συμπληρωματική δόση του γαλακτώματος και της τοξίνης pertussis λίγες μέρες μετά την πρώτη δόση. Επίσης

ένας μεγαλύτερος αριθμός ατόμων (περισσότερα των 5-6 που χρησιμοποιήθηκαν ανά ομάδα) θα αύξανε τις πιθανότητες εκδήλωσης της ΠΑΕ.

Ο μηχανισμός δράσης με τον οποίο το OM-MOG μειώνει την εγκεφαλιτογόνο δράση των T λεμφοκυττάρων φαίνεται να διαφέρει από αυτούς που έχουν περιγραφεί στο παρελθόν για την επαγωγή ανοχής μέσω στόχευσης των ΑΠΚ, όπως η μείωση της παραγωγής IL-17 από τα Th17 λεμφοκύτταρα και η αύξηση των Tregs (Stern, Keskin et al. 2010) ή εκτροπή των ανοσιακών αποκρίσεων προς ένα ανοσορυθμιστικό προφίλ (Apostolopoulos, Pietersz et al. 1995; Apostolopoulos, Pietersz et al. 2000). Προσομοιάζει στην ανοχή που επάγεται από το μαννοζυλιωμένο πεπτίδιο PLP139-151 περιγράφηκε από την ερευνητική ομάδα του Nagelkerken. Το πεπτίδιο αυτό όπως και το OM-MOG επάγουν μειωμένες αποκρίσεις αντιγονοειδικού πολλαπλασιασμού χωρίς διαφορές στην παραγωγή κυτταροκινών. (Luca, Kel et al. 2005; Kel, Oldenampsen et al. 2007) Η κλωνική ανέργια των T λεμφοκυττάρων που μπορεί να χαρακτηρίζεται από μείωση των αντιγονοειδικών αποκρίσεων πολλαπλασιασμού αλλά όχι απαραίτητα από αλλαγές στην παραγωγή κυτταροκινών έχει περιγραφεί ως μηχανισμός ανοχής που επάγεται από τη δια στόματος χορήγηση MBP (Whitacre, Gienapp et al. 1991; Chen, Inobe et al. 1996) και PLP139-151 (Karpus, Kennedy et al. 1996). Στην δια στόματος ανοχή χαμηλές δόσεις του αντιγόνου οδηγούν στη δημιουργία Tregs ενώ υψηλές δόσεις επάγουν ανέργια ή απαλοιφή των T λεμφοκυττάρων. Η χορήγηση του OM-MOG φαίνεται οδηγεί στην ισχυρή ενεργοποίηση των αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μέσω ενός συνδυασμού σηματοδότησης από τον MOG-ειδικό TCR και σημάτων της φυσικής ανοσίας που προέρχονται από τον υποδοχέα μαννόζης, η οποία στη συνέχεια καταλήγει σε μερική ανέργια. Η ανέργια επιβεβαιώθηκε και από το εύρημα ότι η κατάσταση μη απόκρισης αναστρέφεται με την εξωγενή χορήγηση IL-2. (Tseveleki et al. 2015) Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως η συνεχής έκθεση σε OM-MOG ή η επανέκθεση τους έξω από το περιβάλλον των εμβολιασμένων ποντικών είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ανοχής. Επιβεβαιώνεται ότι η παρουσία του OM-MOG είναι σημαντική για την παρεμπόδιση της επανενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων στο χώρο πριν εισέλθουν στο ΚΝΣ, όπου συνήθως λαμβάνουν το σήμα για να επάξουν την ΠΑΕ, καθώς τα ανεκτικά T λεμφοκύτταρα μπόρεσαν να αναστρέψουν την μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και να διηθήσουν επιτυχώς στους ιστούς του ΚΝΣ κατά την ΠΑΕ, παρά την αρχική καθυστέρηση τους στις μήνιγγες. Δεν μπορούμε ωστόσο να αποκλείσουμε την πιθανότητα ότι το OM-MOG επάγει τη δημιουργία ενός ενεργού κατασταλτικού πληθυσμού κυττάρων στους δότες και ότι η απουσία αυτού από τους δέκτες με την ενεργό ΠΑΕ, να είναι αυτή που επιτρέπει στα T λεμφοκύτταρα των δοτών να χάσουν την ανοχή τους. Χρειάζονται λοιπόν επιπλέον πειράματα για τη διερεύνηση αυτής της υπόθεσης.

Τα πεπτίδια συζευγμένα με OM όταν χορηγούνται προφυλακτικά ως εμβόλια ή μετά την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων ως θεραπεία είναι ικανά να επάγουν ισχυρή προστασία στους ποντικούς από τα συμπτώματα της ΠΑΕ, ακόμα και παρουσία

ισχυρών ερεθισμάτων που επάγουν την ωρίμανση των ΑΠΚ. (Tseveleki et al. 2015) Αξίζει να σημειωθεί πως η προστασία είναι μακροχρόνια και τα πρωτόκολλα θεραπείας και προστασίας έχουν δοκιμαστεί και σε ανθρωποποιημένους ποντικούς που φέρουν ανθρώπινα γονίδια ευπάθειας για την ΣΚΠ (DR2b ποντικοί που φέρουν το ανθρώπινο αλληλό DRB1501 των μορίων MHC τάξης II) (μη δημοσιευμένα δεδομένα). Η προστατευτική επίδραση του OM-MOG είναι πολύ σημαντική αν σκεφτεί κανείς πως συμβαίνει παρουσία ισχυρών ανοσοενισχυτικών που έχουν το ρόλο να ανατρέπουν την ανοχή του ανοσοποιητικού. Αυτό δείχνει πως μπορεί να αποτελεί μία ισχυρή στρατηγική για την αποσιώπιση της αυτοανοσίας στον ανθρώπινο οργανισμό όπου η αντιμετώπιση μικροβιακών αντιγόνων από το ανοσοποιητικό φαίνεται να έχει ρόλο κλειδί στην κατάρρευση της ανοχής σε εαυτά αντιγόνα. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να χαρακτηριστεί πλήρως ο μοριακός μηχανισμός ανέργειας που πυροδοτείται από τη διέγερση του TCR μέσω της δράσης των συζευγμένων με μαννάνη πεπτιδίων καθώς αποτελούν πολλά υποσχόμενους στόχους για θεραπευτική παρέμβαση στην ΣΚΠ. Η θεραπεία με τα συγκεκριμένα πεπτίδια θα διέφερε από τις καθιερωμένες προσεγγίσεις οι οποίες είναι ανοσοκατασταλτικές και μη ειδικές και θα μπορούσε να είναι ένα βήμα πιο κοντά στο σχεδιασμό εξατομικευμένων θεραπειών για τους διαφορετικούς ανοσοκυρίαρχους πεπτιδικούς επιτόπους που απαντώνται σε αυτοαντιγόνο-ειδικές ανοσολογικές αντιδράσεις στην ΣΚΠ και σχετικές απομυελινωτικές διαταραχές. (Tseveleki et al. 2015) Ελπιδοφόρο είναι το γεγονός πως αυτή τη χρονιά έχει προγραμματιστεί να λάβει χώρα μία κλινική δοκιμή φάσης I με το συζευγμένο με μαννάνη πεπτίδιο MOG35-55. (Dargahi, Katsara et al. 2017)

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

**Apostolopoulos, V., Pietersz, G. A., et al. (1995). "Oxidative/reductive conjugation of mannan to antigen selects for T1 or T2 immune responses." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(22): 10128-10132.**

**Apostolopoulos, V., Pietersz, G. A., et al. (2000). "Aldehyde-mannan antigen complexes target the MHC class I antigen-presentation pathway." European Journal of Immunology 30(6): 1714-1723.**

**Arnold, B., Schönrich, G. et al. (1993). "Multiple levels of peripheral tolerance." Immunology Today 14(1): 12-14.**

**Ascherio, A. Munger, K. L. (2007). "Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection." Annals of Neurology 61(4): 288-299.**

**Ascherio, A., Munger K. L. (2007). "Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors." Annals of Neurology 61(6): 504-513.**

**Bannerman, P. G., Hahn, A., et al. (2005). "Motor neuron pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis: studies in THY1-YFP transgenic mice." Brain 128(8): 1877-1886.**

**Bar-Or, A., Pachner, A., et al. (2014). "Teriflunomide and Its Mechanism of Action in Multiple Sclerosis." Drugs 74(6): 659-674.**

**Bassoe, P., Grinker, R. R. (1930). "Human rabies and rabies vaccine encephalomyelitis: A clinicopathologic study." Archives of Neurology & Psychiatry 23(6): 1138-1160.**

**Belbasis, L., Bellou, V., et al. (2015). "Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses." The Lancet Neurology 14(3): 263-273.**

**Berge, T. Leikfoss, I.S., Brorson, I.S., et al. (2016) "The multiple sclerosis susceptibility genes TAGAP and IL2RA are regulated by vitamin D in CD4+ T cells. " Genes and Immunity 17(2):118-127.**

**Bettelli, E., Pagany, M., et al. (2003). "Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-specific T Cell Receptor Transgenic Mice Develop Spontaneous Autoimmune Optic Neuritis." The Journal of Experimental Medicine 197(9): 1073-1081.**

**Bielekova, B., Goodwin, B., et al. (2000). "Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: Results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand." Nature Medicine 6(10): 1167-1175.**

**Bitar, D. M., Whitacre, C. C. (1988). "Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by the oral administration of myelin basic protein." Cellular Immunology 112(2):364-70.**

- Bittner, S., Afzali, A. M., et al. (2014). "Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG(35-55)) Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 Mice." *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (86): 51275.**
- Boussiotis, V., Barber, D. et al. (1994). "Prevention of T cell anergy by signaling through the gamma c chain of the IL-2 receptor." *Science* 266(5187): 1039-1042.**
- Burness, C. B., Deeks, E. D. (2014). "Dimethyl Fumarate: A Review of Its Use in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis." *CNS Drugs* 28(4): 373-387.**
- Burstein, H. J., Shea, C. M., et al. (1992). "Aqueous antigens induce in vivo tolerance selectively in IL-2- and IFN-gamma-producing (Th1) cells." *The Journal of Immunology* 148(12): 3687-3691.**
- Chai, J. G., Lechler, R. I., (1997). "Immobilized anti-CD3 mAb induces anergy in murine naive and memory CD4+ T cells in vitro." *International Immunology* 9(7):935-44.**
- Chan, C., Stark, J. et al. (2005). "The impact of multiple T cell-APC encounters and the role of anergy." *Journal of Computational and Applied Mathematics* 184(1): 101-120.**
- Chen, Y., Inobe, J., et al. (1996). "Oral tolerance in myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice: suppression of autoimmune encephalomyelitis and dose-dependent induction of regulatory cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(1): 388-391.**
- Colombetti, S., Benigni, F., et al. (2002). "Clonal Anergy Is Maintained Independently of T Cell Proliferation." *The Journal of Immunology* 169(11): 6178-6186.**
- Compston, A., Coles, A. (2002). "Multiple sclerosis." *Lancet* 359(9313): 1221-1231.**
- Compston, A., Coles, A. (2008). "Multiple sclerosis." *Lancet* 372(9648): 1502-1517.**
- Confavreux, C., Hutchinson, M., et al. (1998). "Rate of Pregnancy-Related Relapse in Multiple Sclerosis." *New England Journal of Medicine* 339(5): 285-291.**
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., et al. (2011). "Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)." *British Journal of Pharmacology* 164(4): 1079-1106.**
- Critchfield, J., Racke, M., et al. (1994). "T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis." *Science* 263(5150): 1139-1143.**
- Croxford, A. L., Kurschus, F. C., et al. (2011). "Mouse models for multiple sclerosis: Historical facts and future implications." *Biochimica et Biophysica Acta* 1812(2): 177-183.**
- D'Adamio, L., Awad, K. M., et al. (1993). "Thymic and peripheral apoptosis of antigen-specific T cells might cooperate in establishing self tolerance." *European Journal of Immunology* 23(3): 747-753.**
- Dargahi, N., Katsara, M., et al. (2017). "Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update." *Brain Sciences* 7(7): 78.**

**Day, M. J. (2005). Histopathology of EAE. Experimental Models of Multiple Sclerosis. E. Lavi and C. S. Constantinescu. Boston, MA, Springer US: 25-43.**

**Dendrou, C. A., Fugger, L., et al. (2015). "Immunopathology of multiple sclerosis." Nature Reviews Immunology 15(9): 545-558.**

**DiPiro, J. T. (2011). "Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach." New York, McGraw-Hill Medical.**

**Ellmerich, S., Mycko, M., et al. (2005). "High Incidence of Spontaneous Disease in an HLA-DR15 and TCR Transgenic Multiple Sclerosis Model." The Journal of Immunology 174(4): 1938-1946.**

**Engering, A. J., Cella, M., et al. (1997). "The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells." European Journal of Immunology 27(9): 2417-2425.**

**Ferraro, A., Jervis, G. A. (1940). "Experimental disseminated encephalopathy in the monkey." Archives of Neurology & Psychiatry 43(2): 195-209.**

**Fischer, M.T., Sharma, R., et al. (2012). "NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury." Brain 135(Pt 3): 886-899.**

**Fitzner, D., Simons, M. (2010). "Chronic Progressive Multiple Sclerosis – Pathogenesis of Neurodegeneration and Therapeutic Strategies." Current Neuropharmacology 8(3): 305-315.**

**Freedman, M. S., Kaplan, J. M., et al. (2013). "Insights into the Mechanisms of the Therapeutic Efficacy of Alemtuzumab in Multiple Sclerosis." Journal of clinical & cellular immunology 4(4): 1000152.**

**Friese, M. A., Jakobsen, K. B., et al. (2008). "Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis." Nature Medicine 14(11): 1227-1235.**

**Frischer, J. M., Bramow, S., et al. (2009). "The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains." Brain 132(5): 1175-1189.**

**Garg, N., Smith, T. W. (2015). "An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis." Brain and Behavior 5(9): e00362.**

**Gaur, A., Wiers, B., et al. (1992). "Amelioration of autoimmune encephalomyelitis by myelin basic protein synthetic peptide-induced anergy." Science 258(5087): 1491-1494.**

**Giovannoni, G., Cutter, G. R., et al. (2006). "Infectious causes of multiple sclerosis." The Lancet Neurology 5(10): 887-894.**

**Givan, A. L. (1992). "Flow cytometry: First principles." Trends in Cell Biology 3(9): 320-321.**

**Gold, R., Linington, C. et al. (2006). "Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research." Brain 129(8): 1953-1971.**

Gold, R., Wolinsky, J. S., et al. (2010). "Evolving expectations around early management of multiple sclerosis." *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 3(6): 351-367.

Goldberg, P. (1974). "Multiple sclerosis: vitamin D and calcium as environmental determinants of prevalence." *International Journal of Environmental Studies* 6(1): 19-27.

Goldenberg, M. M. (2012). "Multiple Sclerosis Review." *Pharmacy and Therapeutics* 37(3): 175-184.

Goudarzvand, M., Javan, M., Mirnajafi-Zadeh J., et al. (2010). "Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide." *Cellular and Molecular Neurobiology* 30(2):289-99.

Goverman, J., Woods, A., et al. (1993). "Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity." *Cell* 72(4): 551-560.

Gran, B., O'Brien, K., et al. (2008). "Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neuroimmunology*. A. Lajtha, A. Galoyan and H. O. Besedovsky. Boston, MA, Springer US: 355-377.

Gronseth, G.S., Ashman, E.J. (2000). "Practice parameter: the usefulness of evoked potentials in identifying clinically silent lesions in patients with suspected multiple sclerosis (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology." *Neurology*. 9;54(9):1720-5.

Han, S., Tie, X., et al. (2013). "PMA and Ionomycin Induce Glioblastoma Cell Death: Activation-Induced Cell-Death-Like Phenomena Occur in Glioma Cells." *PloS\_One* 8(10): e76717.

Handel, A. E., Williamson, A. J., et al. (2011). "Smoking and Multiple Sclerosis: An Updated Meta-Analysis." *PLoS One* 6(1):e16149

Hargreaves, R. G., Borthwick, N. J., et al. (1997). "Dissociation of T cell anergy from apoptosis by blockade of Fas/Apo-1 (CD95) signaling." *The Journal of Immunology* 158(7): 3099-3107.

Hauser, S. L., Oksenberg, J. R. (2006). "The Neurobiology of Multiple Sclerosis: Genes, Inflammation, and Neurodegeneration." *Neuron* 52(1): 61-76.

Hawiger, D., Masilamani, R.F., Bettelli, E. et al. (2004). "Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo." *Immunity* 20(6):695-705.

Hernán, M. A., Jick, S. S., et al. (2005). "Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis." *Brain* 128(6): 1461-1465.

Høglund, R. A., Maghazachi, A. A. (2014). "Multiple sclerosis and the role of immune cells." *World Journal of Experimental Medicine* 4(3), 27–37.



Kabelitz, D., Pohl, T., et al. (1993). "Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes." *Immunology Today* 14(7): 338-339.

Kamen, D. L., Tangpricha, V. (2010). "Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity." *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 88(5): 441-450.

Kappos, L., Antel, J., et al. (2006). "Oral Fingolimod (FTY720) for Relapsing Multiple Sclerosis." *New England Journal of Medicine* 355(11): 1124-1140.

Kappos, L., Comi, G., et al. (2000). "Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial." *Nature Medicine* 6(10): 1176-1182.

Karpus, W. J., Kennedy, K. J. et al. (1996). "Inhibition of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice by feeding the immunodominant PLP139-151 peptide." *Journal of Neuroscience Research* 45(4): 410-423.

Kel, J., Oldenampsen, J., et al. (2007). "Soluble Mannosylated Myelin Peptide Inhibits the Encephalitogenicity of Autoreactive T Cells during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *The American Journal of Pathology* 170(1): 272-280.

Kel, J. M., Slütter, B., et al. (2008). "Mannosylated self-peptide inhibits the development of experimental autoimmune encephalomyelitis via expansion of nonencephalitogenic T cells." *Journal of leukocyte biology* 84(1): 182-190.

Kent, S. C., Fukaura, H., et al. (1997). "Oral Administration of Myelin Induces Antigen-specific TGF- $\beta$ 1-secreting T Cells in Multiple Sclerosis Patients." *Annals of the New York Academy of Sciences* 815(1): 412-422.

Koritschoner, R., Schweinburg, F. (1925). "Klinische und experimentelle Beobachtungen über Lähmungen nach Wutschutzimpfung." *Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie* 42(217-283).

Lebrun, C., Bensa, C., et al. (2009). "Association between clinical conversion to multiple sclerosis in radiologically isolated syndrome and magnetic resonance imaging, cerebrospinal fluid, and visual evoked potential: Follow-up of 70 patients." *Archives of Neurology* 66(7): 841-846.

Lechler, R., Chai, J.G, et al. (2001). "The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance." *Immunology* 103(3): 262-269.

Leger, O. J., Yednock, T.A., Tanner, L. et al. (1997). "Humanization of a mouse antibody against human  $\alpha$ -4 integrin: a potential therapeutic for the treatment of multiple sclerosis." *Human Antibodies* 8(1):3-16.

Libbey, J. E., Fujinami, R. S. (2011). "Experimental Autoimmune Encephalomyelitis as a Testing Paradigm for Adjuvants and Vaccines." *Vaccine* 29(17): 3356-3362.

Lodygin, D., Odoardi, F., et al. (2013). "A combination of fluorescent NFAT and H2B sensors uncovers dynamics of T cell activation in real time during CNS autoimmunity." *Nature Medicine* 19(6): 784-790.

- Lossius, A., Johansen, J. N., et al. (2014). "High-throughput sequencing of TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8+ T cells." *European Journal of Immunology* 44(11): 3439-3452.
- Lublin, F. D., Reingold, S. C. (1996). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis." *Neurology* 46(4):907-11
- Lublin, F. D., Reingold, S. C., et al. (2014). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions." *Neurology* 83(3): 278-286.
- Luca, M. E., Kel, J. M., et al. (2005). "Mannosylated PLP(139-151) induces peptide-specific tolerance to experimental autoimmune encephalomyelitis." *Journal of Neuroimmunology* 160(1): 178-187.
- Lutterotti, A., Yousef, S., Sputtek, A., et al. (2013). "Antigen-Specific Tolerance by Autologous Myelin Peptide–Coupled Cells: A Phase 1 Trial in Multiple Sclerosis." *Science translational Medicine* 5(188):188ra75.
- Madsen, L. S., Andersson, E. C., et al. (1999). "A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor." *Nature Genetics* 23(3): 343-347.
- May, E., Asadullah, K., Zugel, U. et al. (2004). "Immunoregulation through 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogs." *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy* (4):377-93.
- Mazerski, J., Martelli, S., Borowski, E. et al. (1998). "The geometry of intercalation complex of antitumor mitoxantrone and ametantrone with DNA: molecular dynamics simulations." *Acta Biochimica Polonica* 45(1):1-11.
- McGinley, M. P., Moss, B. P., et al. (2017). "Safety of monoclonal antibodies for the treatment of multiple sclerosis." *Expert Opinion on Drug Safety* 16(1): 89-100.
- McGreal, E. P., Miller, J. L., et al. (2005). "Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors." *Current Opinion in Immunology* 17(1): 18-24.
- Miller, A., Lider, O., et al. (1992). "Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(1): 421-425.
- Miller, D., Barkhof, F., Montalban X., et al. (2005). "Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis." *Lancet Neurology* 4(5):281-8.
- Miller, D. H., Leary, S. M. (2007). "Primary-progressive multiple sclerosis." *The Lancet Neurology* 6(10): 903-912.
- Miller, S.D., Wetzig, R.P., et al. (1979). "The induction of cell-mediated immunity and tolerance with protein antigens coupled to syngeneic lymphoid cells." *The Journal of Experimental Medicine* 149(3): 758-773.

- Miller, S. D., Karpus, W. J., et al. (2007). "Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse." *Current protocols in immunology* / edited by John E. Coligan [et al.] Chapter: Unit-15.11.
- Morandi, E., Tarlinton, R. E., et al. (2015). "Multiple Sclerosis between Genetics and Infections: Human Endogenous Retroviruses in Monocytes and Macrophages." *Frontiers in Immunology* 6: 647.
- Mues, M., Bartholomäus, I., et al. (2013). "Real-time in vivo analysis of T cell activation in the central nervous system using a genetically encoded calcium indicator." *Nature Medicine* 19(6): 778-783.
- Müller, E. (1908). "Über akute Paraplegien nach Wuttschutzimpfungen." *Deutsche Zeitsch fuer Nerven- beilkunde* 34.
- Munger, K. L., Zhang, S.M., O'Reilly, E., et al. (2004). "Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis." *Neurology* 62(1):60-5.
- Muñoz-Culla, M., Irizar, H. et al. (2013). "The genetics of multiple sclerosis: review of current and emerging candidates." *The Application of Clinical Genetics* 6: 63-73.
- Na, S.Y., Cao, Y., et al. (2008). "Naïve CD8 T-cells initiate spontaneous autoimmunity to a sequestered model antigen of the central nervous system." *Brain* 131(9): 2353-2365.
- Oksenberg, J. R., Barcellos, L. F. (2005). "Multiple sclerosis genetics: leaving no stone unturned." *Genes and Immunity* 6(5): 375-387.
- Okuda, D. T., Mowry, E.M., Beheshtian, A et al. (2009). "Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome." *Neurology* 72(9):800-5
- Operskalski, E. A., Visscher, B.R., Malmgren, R.M., et al. (1989). "A case-control study of multiple sclerosis." *Neurology* 39(6):825-9.
- Pender, M. P., McCombe, P. A. (1995). "Autoimmune Neurological Disease. Cambridge." Cambridge University Press pp. 26–88.
- Perchellet, A., Stromnes, I., et al. (2004). "CD8+ T cells maintain tolerance to myelin basic protein by 'epitope theft'." *Nature Immunology* 5(6): 606-614.
- Pettinelli, C. B., McFarlin D. E. (1981). "Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes." *The Journal of Immunology* 127(4): 1420-1423.
- Pöllinger, B., et al. (2009): "Spontaneous Relapsing-Remitting EAE in the SJL/J Mouse: MOG-Reactive Transgenic T Cells Recruit Endogenous MOG-Specific B Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 206(6):1303–1316.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., et al. (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria." *Annals of Neurology* 58:840–846.
- Polman, C. H., Reingold, S. C., et al. (2011). "Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria." *Annals\_of\_Neurology* 69(2): 292-302.

**Popescu, B. F., Lucchinetti, C. F. (2012). "Pathology of demyelinating diseases." Annual Reviews Pathology 7: 185-217.**

**Popescu, B. F., Lucchinetti C. F. (2012). "Meningeal and cortical grey matter pathology in multiple sclerosis." BMC Neurology 12(1): 11.**

**Quandt, J. A., Baig, M., et al. (2004). "Unique Clinical and Pathological Features in HLA-DRB1\*0401–restricted MBP 111–129–specific Humanized TCR Transgenic Mice." The Journal of Experimental Medicine 200(2): 223-234.**

**Racke, M.K., Critchfield, J.M., Quigley, L., et al. (1996). "Intravenous antigen administration as a therapy for autoimmune demyelinating disease." Annals of Neurology 39(1):46-56.**

**Rashid, W., Miller, D.H. (2008). "Recent advances in neuroimaging of multiple sclerosis." Seminars in Neurology 28 (1): 46–55.**

**Rivers, T. M., Schwentker, F. F. (1935). "Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys." The Journal of Experimental Medicine 61(5): 689-702.**

**Rivers, T. M., Sprunt, D. H., et al. (1933). "Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys." The Journal of Experimental Medicine 58(1): 39-53.**

**Robinson, A. P., Harp, C. T., et al. (2014). "The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment." Handbook of clinical neurology 122: 173-189.**

**Rosati, G. (2001). "The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update." Neurological Sciences 22(2):117-39.**

**Sallusto, F., Cella, M., et al. (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." The Journal of Experimental Medicine 182(2): 389-400.**

**Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., et al. (2011). "Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis." Nature 476(7359):214-9.**

**Sheng, K.C., Pouniotis, D. S., et al. (2006). "Mannan derivatives induce phenotypic and functional maturation of mouse dendritic cells." Immunology 118(3): 372-383.**

**Siva, A., Saip, S., et al. (2009). "Multiple sclerosis risk in radiologically uncovered asymptomatic possible inflammatory-demyelinating disease." Multiple Sclerosis Journal 15(8): 918-927.**

**Smith, K.A., Gilbride, K. J, Favata, M. F., et al. (1980). "Lymphocyte activating factor promotes T-cell growth factor production by cloned murine lymphoma cells." Nature 287(5785):853-5.**

**Stadelmann, C., Bruck, W. (2004). "Lessons from the neuropathology of atypical forms of multiple sclerosis." Neurological\_Sciences\_25 Suppl 4: S319-322.**

- Steinman, R. M. (2008). "Dendritic Cells In Vivo: A Key Target for a New Vaccine Science." *Immunity* 29(3): 319-324.
- Stern, J. N. H., Keskin, D. B. et al. (2010). "Promoting tolerance to proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis through targeting dendritic cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(40): 17280-17285.
- Stromnes, I. M., Goverman, J. M. (2006). "Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis." *Nature Protocols* 1(4): 1952-1960.
- Tada, H., Nemoto, E., et al. (2002). "Saccharomyces cerevisiae- and Candida albicans-Derived Mannan Induced Production of Tumor Necrosis Factor Alpha by Human Monocytes in a CD14- and Toll-Like Receptor 4-Dependent Manner." *Microbiology and Immunology* 46(7): 503-512.
- Tan, M. C., Mommaas, A. M., et al. (1997). "Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells." *European Journal of Immunology* 27(9): 2426-2435.
- Tenenhouse, A., Warner, M., Commissiong, J. W., et al. (1991). "Neurotransmitters in the CNS of the vitamin D deficient, hypocalcemic rat." *Neurochemistry International* (2):249-55
- Tintore, M. (2008). "Rationale for early intervention with immunomodulatory treatments." *Journal of Neurology* 255 Suppl 1:37-43.
- Tisch, R. (2010). "Immunogenic Versus Tolerogenic Dendritic Cells: A Matter of Maturation." *International Reviews of Immunology* 29(2): 111-118.
- Tsang, B. K., Macdonell, R. (2011). "Multiple sclerosis- diagnosis, management and prognosis." *Australian Family Physician*.40(12):948-55.
- Tseveleki, V., Tselios, T., Kanistras ,I., Koutsoni, O., Karamita, M., Vamvakas, S.S., Apostolopoulos, V., Dotsika, E., Matsoukas, J., Lassmann, H., Probert, L. (2015). "Mannan-conjugated myelin peptides prime non-pathogenic Th1 and Th17 cells and ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis." *Experimental Neurology* 267: 254-267.
- Turley, D. M., Miller, S. D. (2010). "Prospects for Antigen-Specific Tolerance Based Therapies for the Treatment of Multiple Sclerosis." *Results and problems in cell differentiation* 51: 217-235.
- Valdor, R. , Macian, F. (2013). "Induction and stability of the anergic phenotype in T cells." *Seminars in Immunology* 25(4): 313-320.
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L., Hafler, D. A. (2004). "Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. " *The Journal of Experimental Medicine* 199(7), 971–979.
- Voumvourakis, K. I, Kitsos, D. K., et al. (2010). "Human Herpesvirus 6 Infection as a Trigger of Multiple Sclerosis." *Mayo Clinic Proceedings* 85(11): 1023-1030.

**Waksman B.H. (1959). "Experimental Allergic Encephalomyelitis and the 'Auto-Allergic' Diseases." International Archives of Allergy and Applied Immunology 14(Suppl.)(1-87).**

**Waldner, H., Whitters, M. J., Sobel, R. A., Collins, M., & Kuchroo, V. K. (2000). "Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. " Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(7), 3412–3417.**

**Whitacre, C. C. (2001). "Sex differences in autoimmune disease." Nature Immunology 2(9): 777-780.**

**Whitacre, C. C., Gienapp, I. E., et al. (1991). "Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy." The Journal of Immunology 147(7): 2155-2163.**

**Whitacre, C. C., Reingold, S. C., et al. (1999). "A Gender Gap in Autoimmunity." Science 283(5406):1277-8.**

**ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ**

[www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com)

<http://msassociationhellas.org/>

<http://www.nationalmssociety.org>

<https://www.accessdata.fda.gov>